

Aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Neurologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Mutationsdetektion im CLN3 Gen und
Genotyp-Phänotyp Relation bei Patienten mit
Juveniler Neuronaler Ceroidlipofuscinose**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité
– Universitätsmedizin Berlin

von
Akosua Sarpong
aus Wiamease (Ghana)

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. M. Schülke-Gerstenfeld
2. Prof. Dr. med. E. Boltshauser
3. Priv.-Doz. Dr. med. habil. S. Tinschert

Datum der Promotion: 04.04.2007

Meiner Familie, insbesondere

Maame Yaa Asantewaa und

Nana Paul Boakye und

Master Opoku-Manu

| | | |
|----------|------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 | Einleitung | 6 |
| 1.1 | Die Ceroidlipofuscinosen | 6 |
| 1.1.1 | Einführung | 6 |
| 1.1.2 | Klassifikation | 6 |
| 1.1.3 | Histopathologie und Biochemie | 9 |
| 1.1.4 | Pathophysiologie | 11 |
| 1.1.5 | Klinik | 12 |
| 1.1.6 | Vererbung | 13 |
| 1.1.7 | Diagnostik | 15 |
| 1.1.8 | Therapie | 17 |
| 1.1.9 | Prognose | 18 |
| 1.2 | Die juvenile Ceroidlipofuscinose (Spielmeyer-Vogt, Batten Disease) | 19 |
| 1.2.1 | Die Struktur des <i>CLN3</i> -Gens | 19 |
| 1.2.2 | Das Batten Disease Protein (Battenin, CLN3p) | 20 |
| 1.2.3 | Mutationen und Polymorphismen im <i>CLN3</i> -Gen | 21 |
| 1.2.4 | Genotyp-Phänotyp Relation | 22 |
| 1.3 | Ziel der vorliegenden Arbeit | 22 |
| 2 | Patienten | 23 |
| 2.1 | Kasuistiken | 23 |
| 3 | Material und Methoden | 28 |
| 3.1 | Verbrauchsmaterialien und Kits | 28 |
| 3.2 | Methoden | 28 |
| 3.2.1 | Molekulargenetische Methoden | 28 |
| 3.2.2 | DNA-Präparation | 28 |
| 3.2.3 | Polymerasenkettenreaktion (PCR) | 30 |
| 3.2.4 | Optimierung der PCR-Bedingungen (OptiTa ^q) | 33 |
| 3.2.5 | Agarose-Gelelektrophorese | 33 |
| 3.2.6 | Automatische Sequenzierung | 34 |
| 3.2.7 | Nachweis von Mutationen mittels RFLP Analyse | 38 |
| 3.2.8 | Züchtung von immortalisierten lymphoiden Zelllinien | 40 |
| 3.2.9 | RNA-Extraktion aus immortalisierten lymphoblastoiden Zelllinien (LCL) | 42 |
| 3.2.10 | Reverse Transkription in cDNA | 42 |
| 4 | Ergebnisse | 45 |
| 4.1 | Sicherung der Diagnose der Patienten mittels Elektronenmikroskopie | 45 |
| 4.2 | Agarose Gelelektrophorese der amplifizierten <i>CLN3</i> -Genfragmente | 45 |
| 4.3 | Ergebnisse der automatischen Sequenzierung | 46 |
| 4.4 | Ergebnisse der PIRA-RFLP-Analysen | 47 |
| 4.5 | Ergebnisse der cDNA-Analysen | 48 |
| 5 | Diskussion | 51 |
| 5.1 | Pathogenität der entdeckten Mutation | 51 |
| 5.2 | Mutationshotspots im <i>CLN3</i> -Gen | 51 |

| | | |
|-----|----------------------------------------------------------------------|----|
| 5.3 | Fehlender Nonsense Mediated Messenger Decay trotz Stopmutation | 53 |
| 5.4 | Genotyp-Phänotyp Relation bei Patienten mit CLN3..... | 54 |
| 6 | <i>Zusammenfassung</i> | 56 |
| 7 | <i>Verwendete Abkürzungen</i> | 57 |
| 8 | <i>Literaturverzeichnis</i> | 58 |
| 9 | <i>Danksagung</i> | 65 |
| 10 | <i>Lebenslauf</i> | 66 |
| 11 | <i>Erklärung</i> | 67 |

Zusammenfassung

Die juvenile Ceroidlipofuscinose (CLN3, MIM 204200) wird nach ihrem Erstbeschreiber auch „Morbus Batten“ genannt und gehört zu einer heterogenen Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen des Kindesalters, die eine intrazelluläre Speicherung von Ceroid und Lipofuscin aufweisen. Die Ceroidlipofuscinosen werden autosomal rezessiv vererbt. Die CLN3 wird in 81% der Fälle durch eine 1.02 kbp Deletion im *CLN3*-Gen verursacht. Die Krankheit beginnt mit Sehverlust im Schulalter. Später kommen epileptische Anfälle und parkinsonoide Symptome hinzu. Die fortschreitende geistige und körperliche Retardierung führt zum frühen Tod zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr.

Für meine Promotionsarbeit untersuchte ich eine konsanguine Familie aus dem Libanon mit 13 Mitgliedern. Die fünf jüngsten Kinder waren von einer CLN3-ähnlichen Erkrankung betroffen. Klinisch und elektronenmikroskopisch war die Diagnose bereits gestellt worden. Da der Phänotyp der betroffenen Kinder aber sehr mild war, stand die Diagnose einer CLN3 in Frage.

Zur Sicherung der Diagnose mit molekulargenetischen Techniken analysierte ich das *CLN3*-Gen. Das Gen besteht aus 15 Exons. Die 1.02 kb Deletion konnte ich mittels PCR bei der libanesischen Familie ausschließen. Mittels automatischer Sequenzierung des gesamten offenen Leserasters bei allen Familienangehörigen, entdeckte ich bei den betroffenen Kindern eine homozygote, bisher in der Literatur nicht beschriebene 597C>A Transversion, die zu einem vorzeitigen Stopcodon hinter der 198. Aminosäure des Proteins führt und die alle nach Cotton und Scriver (1998) postulierten Pathogenitätskriterien erfüllt.

Verwendete Abkürzungen

| | |
|--------------------------------------|------------------------------------------------|
| A: Adenin | MgCl ₂ : Magnesiumchlorid |
| C: Cytosin | ml: Milliliter |
| G: Guanin | µl: Mikroliter |
| T: Thymin | µV: Mikrovolt |
| U: Uracil | NaCl: Natriumchlorid |
| Y: Tyrosin | NCL: neuronale Ceroidlipofuscinose |
| X: Stopcodon | NMD: nonsense mediated mRNA decay |
| APS: Ammonium-Peroxidsulfat | NTP: Nukleosidtriphosphat |
| ATP: Adenosin Triphosphat | PAS: Perjodsäure-Schiff-Färbung |
| Bp: Basenpaare | PBS: Phosphate-buffered Saline |
| BSA: Bovines Serumalbumin | PCR: polymerase chain reaction |
| CLN: Ceroid-Lipofuscinose | PEG: Polyethylenglycol |
| CO ₂ : Kohlendioxid | PIRA: primer induced restriction analysis |
| CVB: curvilinear bodies | PPT: palmitoyl protein thioesterase |
| cDNA: complementary DNA | RFLP: restriction fragment length polymorphism |
| DNA: desoxyribonucleic acid | RNA: ribonucleic acid |
| dNTP: Desoxy-Nucleosidtriphosphat | RLP: rectilinear profiles |
| EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure | Rpm: rounds per minute |
| EEG: Elektroenzephalogramm | <i>Rsa</i> : Rhodopseudomonas sphaeroides |
| ERG: Elektretinogramm | RT: reverse Transkription |
| FPP: fingerprint profiles | SDS: Sodiumdodecyl Sulfat |
| g: Gramm | Taq: Thermus aquaticus |
| GROD: granular osmiophilic deposits | TBE: Tris/Borsäure/EDTA |
| H ₂ O: Wasser | TE: Tris-EDTA |
| IE: internationale Einheiten | TEMED: N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamid |
| INCL: infantile NCL | TPP: tripeptidyl peptidase |
| JNCL: juvenile NCL | Tris: Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| kb: Kilobasenpaare | UV: Ultraviolett |
| KHCO ₃ : Kaliumbicarbonat | VEP: visuell evozierte Potentiale |
| LINCL: late-infantile NCL | ZNS: Zentrales Nervensystem |

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Danksagung

Dem Herrn Allmächtigen gebührt der größte Dank, dass er mir den Weg geebnet hat.

Vielen Dank an Prof. Dr. C. Hübner, der das Zustandekommen dieser Dissertation möglich gemacht hat. Seinem Interesse an der Molekulargenetik der CLN3 und seinem Einsatz verdanke ich die Datenerhebung.

Den Patienten und ihren Familien danke ich für die Bereitstellung der Proben und ihrer Zustimmung zur Veröffentlichung.

Bei Prof. Dr. med. Markus Schülke bedanke ich mich für seine Geduld und seine intensive Betreuung. Ich durfte von seinem großen Fachwissen profitieren und wurde professionell in das wissenschaftliche Arbeiten und Denken eingeführt.

Für die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit möchte ich mich bei Frau Angelika Zwirner bedanken, die mir im Labor mit Tat und Rat zur Verfügung stand.

Danken möchte ich auch allen Mitarbeitern der Klinik für Neuropädiatrie am Campus Virchow, die am Zustandekommen dieser Arbeit beteiligt waren.

Ich bedanke mich bei meinen Eltern, die das Unmögliche möglich gemacht haben. Meinen Geschwistern und Freunden bin ich dankbar für ihre Motivation, Unterstützung, Geduld und ihren Glauben an mich.

Erklärung

Ich, Akosua Sarpong, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „**Mutationsdetektion im CLN3 Gen und Genotyp-Phänotyp Relation bei Patienten mit Juveniler Neuronaler Ceroidlipofuscinose**“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den

Unterschrift