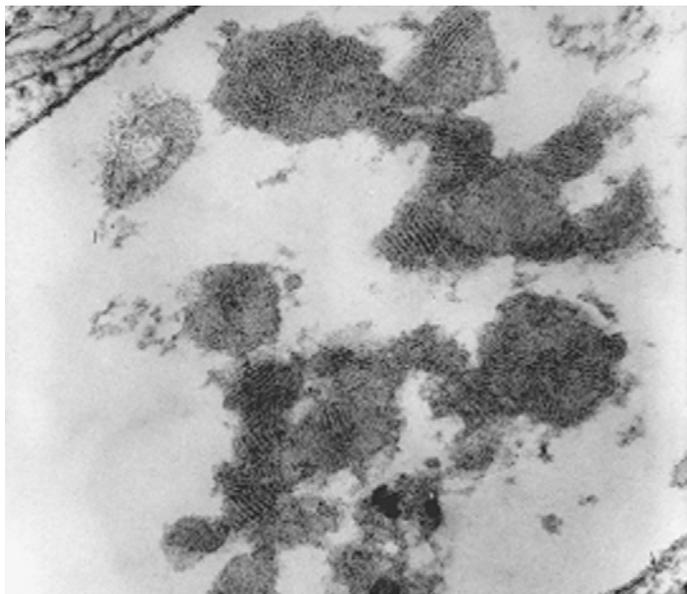


## 4 Ergebnisse

### 4.1 Sicherung der Diagnose der Patienten mittels Elektronenmikroskopie

Die Diagnose einer juvenilen neuronalen Ceroidlipofuscinose (CLN3) wurde bei den betroffenen Kindern durch Nachweis pathognomischer Fingerabdruck Profile in den Blutlymphozyten gesichert. Pathomorphologisch fand sich sowohl ein ähnliches Ausmaß als auch eine identische Morphologie des Speichermaterials aller betroffener Kinder (Stammbaum A.II:7-11). Ca. 50% der mononukleären Zellen aus den Präparationen wiesen intrazytoplasmatische Vakuolen auf. Bei höherer Vergrößerung in der Elektronenmikroskopie konnten die Fingerabdruckprofile des Speichermaterials dargestellt werden. (s. Abb.1 und 2)

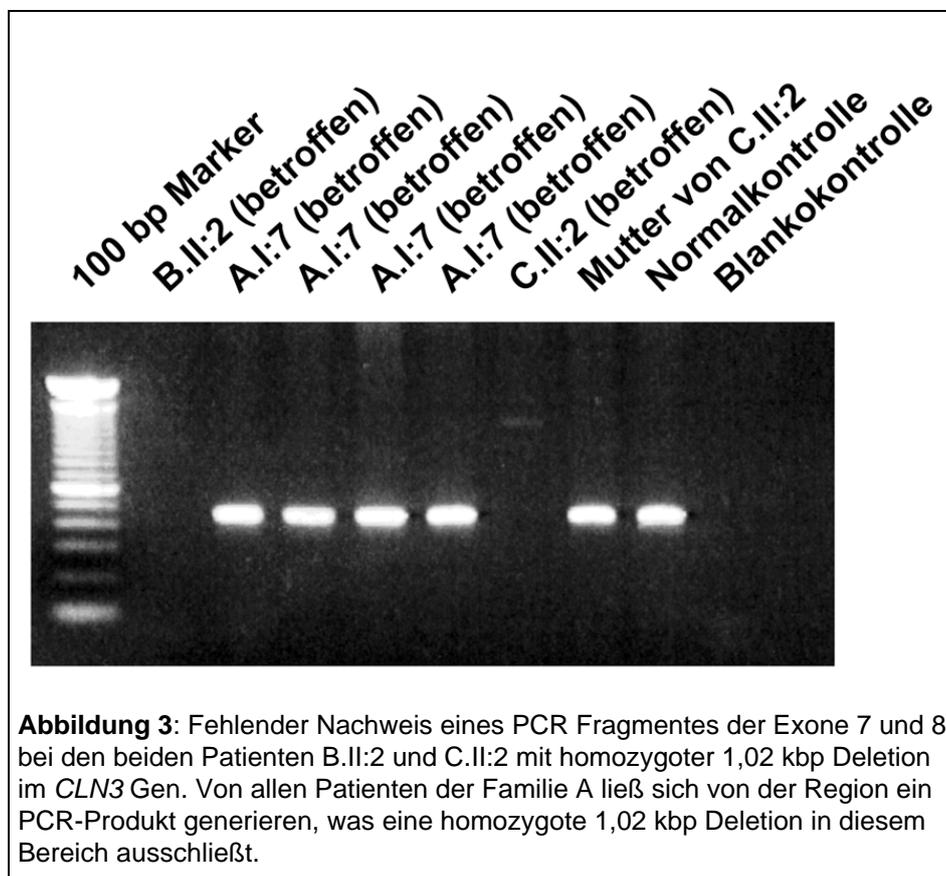


**Abbildung 2:** Pathognomonische Fingerabdruck Profile in den peripheren Lymphozyten des Patienten A.II:10. Vergrößerung x 50.000

### 4.2 Agarose Gelelektrophorese der amplifizierten *CLN3*-Genfragmente

Die 15 codierenden Exons des *CLN3*-Gens wurden mittels PCR amplifiziert und gelelektrophoretisch analysiert. Bei der PCR der Exone 7 und 8 fehlten die Banden bei den Kindern (B.II:2 und C.II:2) mit der vermuteten 1.02 kbp Deletion. Das Fehlen der Banden konnte in einem unabhängigen zweiten Kontrollansatz bestätigt werden. Dies bes-

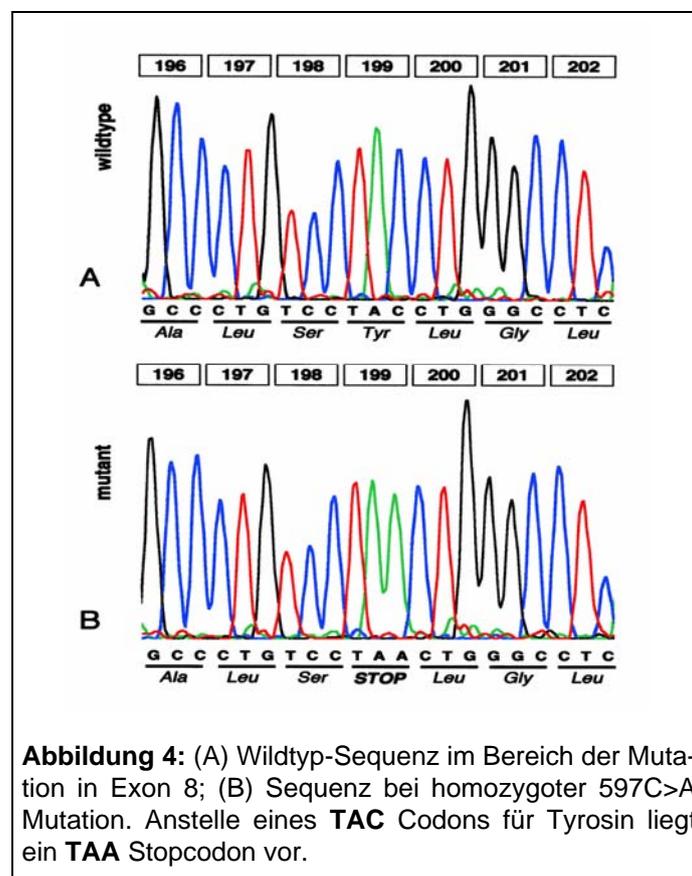
tätigte den Verdacht, dass bei diesen Kindern, die nicht Mitglieder der libanesischen Familie sind, die grosse 1,02 kbp Deletion in der genomischen DNA vorlag. Bei dieser Mutation fehlen die Exons 7 und 8 sowohl auf der genomischen DNA als auch im mRNA-Transkript. Aus diesem Grunde kann die PCR in diesem Bereich weder auf genomischer, noch auf cDNA-Ebene ein Produkt liefern, da die Sequenzen, auf die die Primer hybridisieren, nicht mehr vorhanden sind. Die PCR der libanesischen Familienmitglieder (Stammbaum A) zeigten sowohl bei betroffenen Familienangehörigen als auch bei nicht betroffenen jeweils ein eindeutiges Produkt, d.h. Exons 7 und 8 waren bei allen Familienmitgliedern vorhanden. Somit konnte eine homozygote 1,02 kbp Deletion in dieser Familie ausgeschlossen werden.



### 4.3 Ergebnisse der automatischen Sequenzierung

Die Sequenzen wurden mit einer speziellen Software ausgewertet, die einen Vergleich von Kontroll- und Patientensequenzen ermöglichte. Bis zum Exon 8 bestand eine vollständige Übereinstimmung des Wildtyps mit den Sequenzen der einzelnen betroffenen Familienmitglieder der Familie A. Am 5'-Ende des Exons 8 fiel bei allen Familienmitgliedern eine homozygote Sequenzvariation (582G>T) auf. Dieser Basenaustausch führt

aber zu keiner Veränderung auf Aminosäuresequenz. Sowohl das Triplet des Wildtyps (TTG) als auch das Triplet mit dem Polymorphismus (TGG) codieren für Tryptophan. Weiterhin entdeckte ich in der libanesischen Familie (Stammbaum A) eine bisher noch nicht beschriebene Nonsense-Mutation im Exon 8 (597C>A). Diese ließ sich bei Sequenzierung sowohl mit dem Vorwärts- als auch mit dem Rückwärtsprimer bestätigen. Durch diesen Basenaustausch kommt es auf Proteinebene anstelle eines Tyrosineinbaus (TAC) zu einem Stopcodon (TAA), welches die Translation an dieser Stelle vorzeitig terminiert (Y199X). Dabei entsteht ein C-terminal um 55% trunkiertes Protein, dem 239 Aminosäuren fehlten. Die restlichen Exons wiesen keine Auffälligkeiten auf.

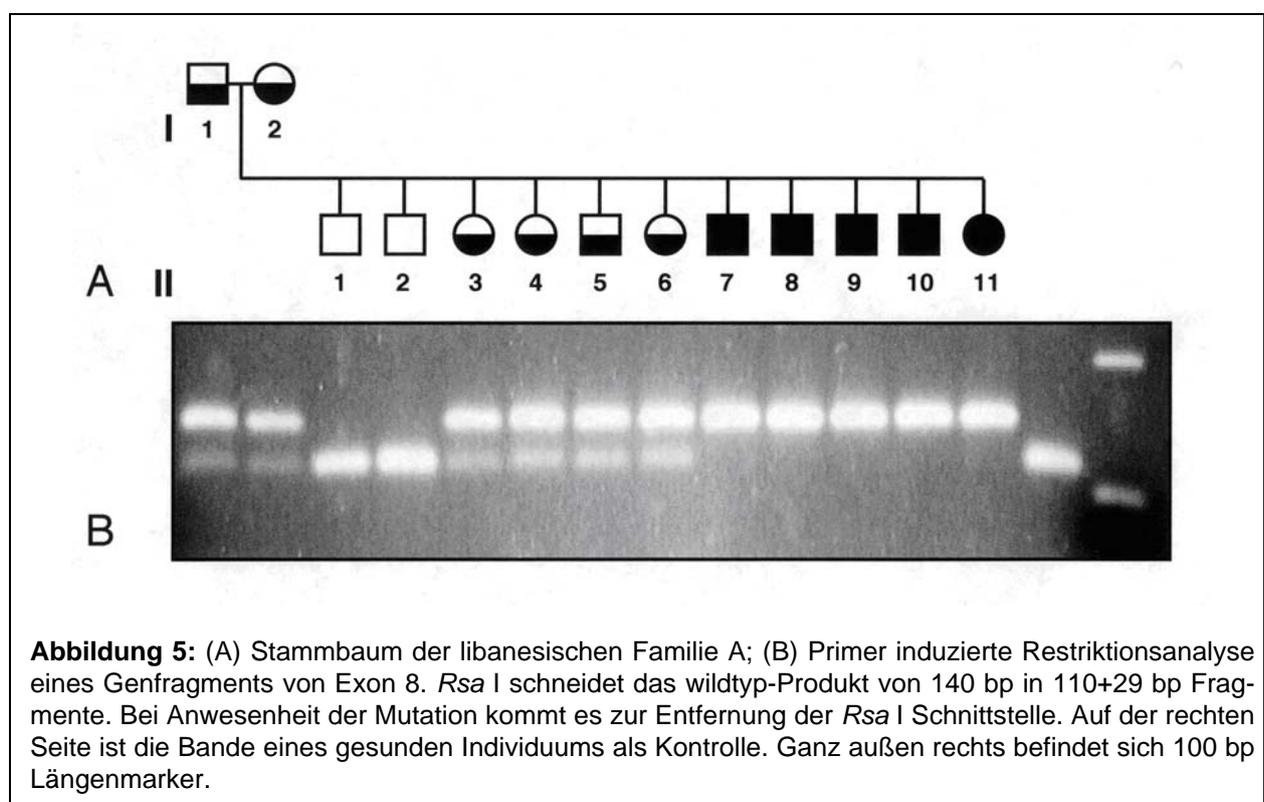


#### 4.4 Ergebnisse der PIRA-RFLP-Analysen

Die PIRA-RFLP-Analyse wurde durchgeführt als eine zweite, von der direkten DNA-Sequenzierung unabhängige Nachweismethode der Mutation. Die molekulargenetischen Ergebnisse waren vereinbar mit der Erkrankung der Patienten aus der libanesischen Familie (Stammbaum A). Alle für die Mutation 597C>A Homozygoten waren erkrankt. Somit segregiert der Genotyp in dieser großen Familie vollständig mit dem

Krankheitsphänotyp (Stammbaum A). Dies ist ein weiterer starker Hinweis für die Pathogenität der Mutation.

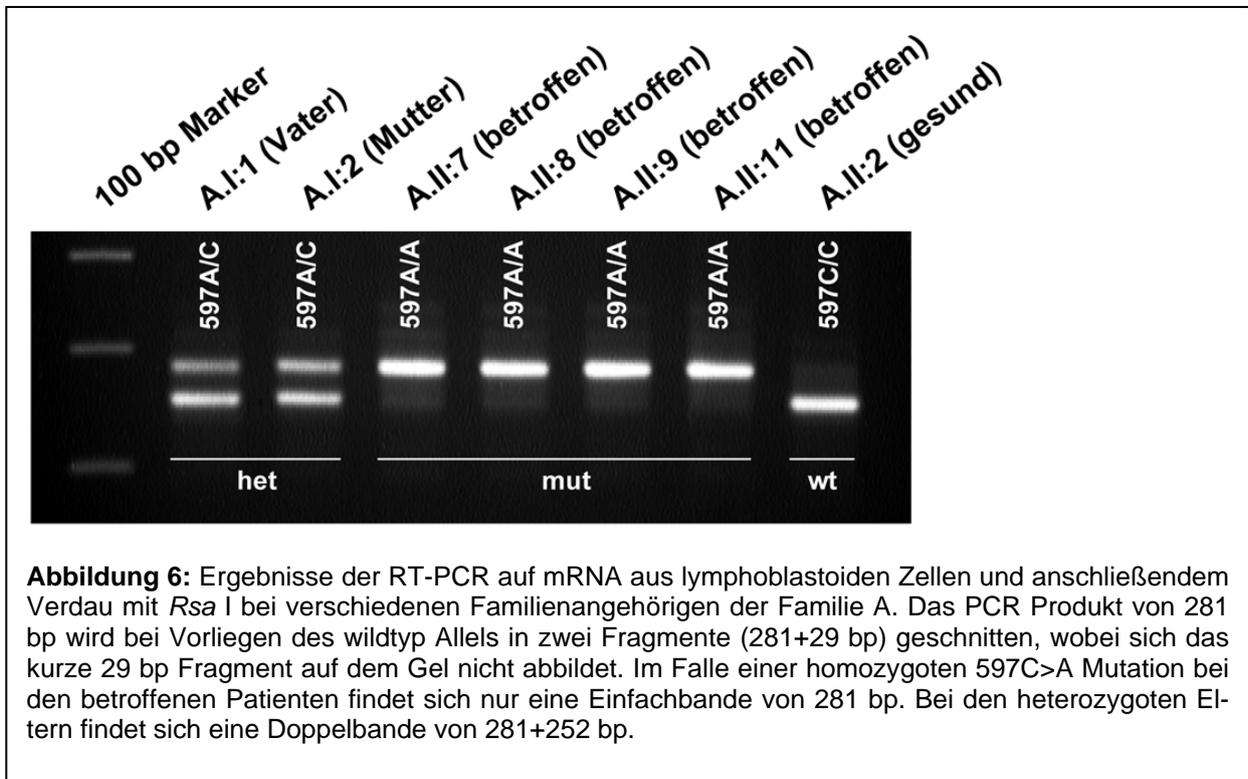
Test-DNA gesunder Kontrollpersonen lieferten eine Einzelbande bei 110 bp. Die Individuen A.II:1 und 2 sind daher beide genotypisch (homozygot wildtyp) als auch phänotypisch gesund. Die Proben der erkrankten Kinder (A.II:7-11) zeigten jeweils eine Einzelbande bei 139 bp. Dies beweist, dass sie homozygote Träger der Mutation im Exon 8 sind. Die Eltern (A.I:1 und 2) und die übrigen Geschwister (A.II:3-6) wiesen eine Doppelbande auf, je eine stärkere Bande bei 139 bp (mutant) und eine schwächere bei 110 bp (wildtyp).



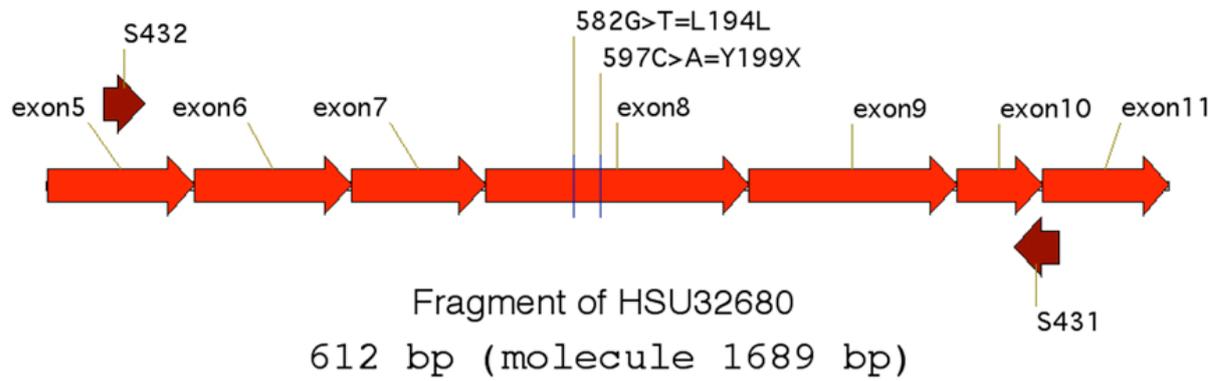
#### 4.5 Ergebnisse der cDNA-Analysen

Die RT-PCR mit dem PIRA-Vorwärtsprimer (GGG GAG CTG GGC TGC TGG GGG CCC TGT CGT A) und dem Rückwärtsprimer (CAG CAG ACC CTT GAA TAC TGT CCA) ergab ein Produkt von 281 bp bei allen Familienmitgliedern. Die 597C>A Mutation in der libanesischen Familie (Stammbaum A) konnte damit auch auf cDNA-Ebene mittels PIRA-RFLP-Analyse nachgewiesen werden. Die Verteilung der Banden entsprach den aus der genomischen DNA ermittelten Befunden. Die Heterozygoten (A.I:1 und A.II:3) wiesen zwei Banden bei ca. 281 bp und 252 bp auf. Die kranken Familienmitglie-

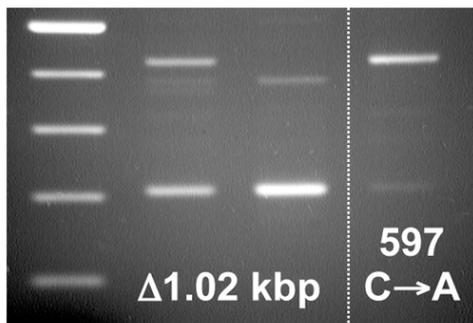
der (A.II:7-10) hatten eine Einfachbande bei ca. 281 bp. Die Kontrollprobe hatte eine Einfachbande bei ca. 252 bp.



Bei der cDNA-Analyse der Patienten mit der homozygoten 1,02 kb Deletion im *CLN3*-Gen fand ich sowohl eine um die Exons 7 und 8 (=217 bp) trunkierte Bande als auch eine schwache größere Bande um ca. 500 bp, welche einem fehlgespleißten Transcript des *CLN3* Gens entsprach. Die heterozygoten Eltern wiesen sowohl eine wildtyp- als auch eine mutierte Bande auf. Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, dass das trunkierte Transkript nicht über nonsense mediated messenger decay (NMD) abgebaut wird.



100 bp Marker  
 Vater von B.II.2  
 B.II.2 (homozygot)  
 A.II.7 (homozygot)



**Abbildung 7:** Vergleich der RT-PCR Befunde zwischen einem Patienten mit der 1,02 kbp Deletion, seinem Vater und dem Indexpatienten der Familie A. (A) Die Position der hierfür verwendeten RT-PCR Primer ist auf der maßstabgerechten Darstellung des mRNA Transkripts (oben) dargestellt. Die Position der Mutation in Exon 8 ist eingezeichnet. (B) Im Falle einer homozygoten 1,02 kbp fehlt die obere wt-Bande und es tritt eine schwache Bande von ca. 500 bp auf, welche einem fehlgespleißten Produkt entspricht. Die untere 295 bp mut-Bande entspricht einem mRNA Transkript ohne die Exons 7 und 8. Das um 217 bp trunkeierte Transkript wird nicht durch NMD abgebaut. Beim Vater des Patienten ist die wt-Bande von 512 bp vorhanden, allerdings nur halb so kräftig wie bei einem betroffenen Kind der Familie A. Dies legt nahe, dass weder das trunkeierte Transkript noch das Transkript mit der Punktmutation durch NMD abgebaut wird.