

### 3. Ergebnisse

Die bei den Patienten und zwei Standardkontrollen in den untersuchten Genabschnitten gefundenen Abweichungen von den in 2.2.3.5 genannten Referenzsequenzen werden im Folgenden tabellarisch dargestellt und jeweils im Anschluss beschrieben.

#### 3.1 EFSEC

Das Gen von EFSec liegt auf Chromosom 3 und enthält sieben Exons. Es wurden acht Produkte sequenziert: da das fünfte Exon im Vergleich zu den anderen länger ist (656 bp), wurde es zur Amplifikation zweigeteilt.

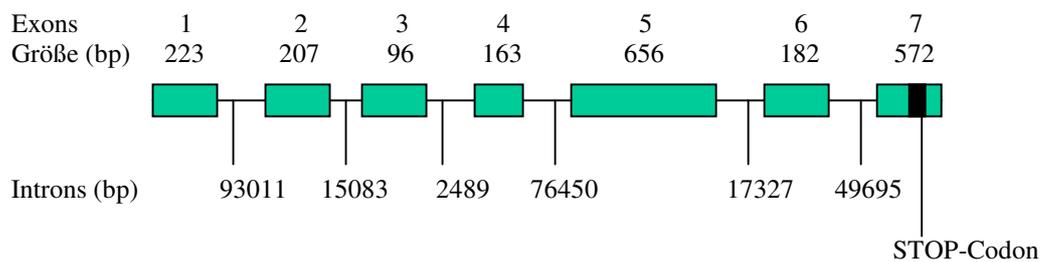


Abb. 8: Schematischer Aufbau von EFSEC auf Genlocus 3q21.3 (nicht maßstabsgetreu)

	1 (K)	2 (K)	3 (P)	4 (P)	5 (P)	6 (P)	7 (P)	8 (P)	9 (P)	10 (P)	11 (P)
<b>Produkt 1</b>			a*,b*		a*,b*	a*,b*					
<b>Produkt 2</b>											
<b>Produkt 3</b>											
<b>Produkt 4</b>		c*	c*		c*	c*, d*					
<b>Produkt 5.1</b>											
<b>Produkt 5.2</b>											
<b>Produkt 6</b>											
<b>Produkt 7</b>								e*			

**Tab. 7 : Abweichungen (a, b, c, d, e) im Vergleich zur Referenzsequenz bei Kontrollen (K) und Patienten (P) in EFSEC**

Abweichungen, die eine Veränderung der Aminosäuresequenz nach sich ziehen, sind durch

**Fettdruck** hervorgehoben; Heterozygotie ist durch \* gekennzeichnet.

a : C 85 T      b : A 191 G      c : C 586 T      d : C 597 T      e : G 19684 A

### 3.1.1 Produkt 1

Bei den Patienten 3, 5, 6 wurde in diesem Exon ein heterozygoter Basentausch an der Position 85 festgestellt (C 85 T) (a); die Aminosäure Glycin an der Position 25 der Polypeptidkette bleibt erhalten.

Bei denselben drei Patienten wurde ebenfalls im ersten Exon ein weiterer heterozygoter Basentausch an der Stelle 191 gefunden (A 191 G) (b). Auch hierbei handelt es sich um eine stille Mutation: es kommt zu keiner Veränderung der Aminosäure, Prolin, an der Position 57.

### 3.1.2 Produkt 4

Die gleichen Patienten 3, 5 und 6 sowie die Kontrolle 2 zeigen auch im vierten Exon einen heterozygoten Basentausch: an der Stelle 586 der Nukleotidsequenz steht ein Thymin statt eines Cytosins (c). Es handelt sich dabei um eine weitere stille Mutation; Aspartat bleibt an Position 192 der Polypeptidkette erhalten.

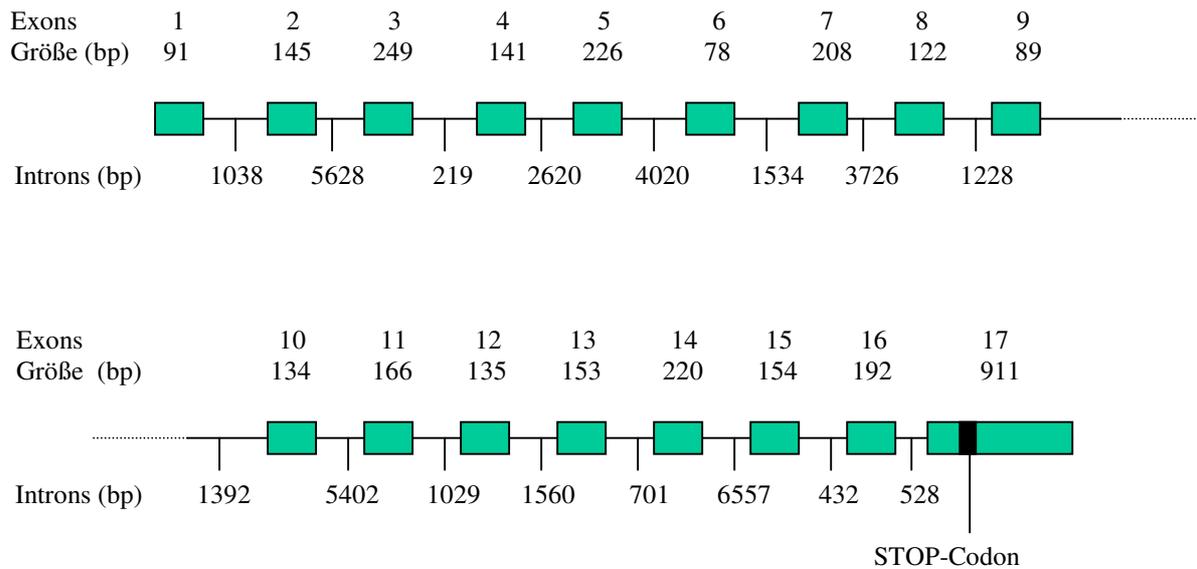
Bei Patient 6 wurde in diesem Exon außerdem ein weiterer heterozygoter Basentausch nachgewiesen (d): statt Cytosin steht an Position 597 Thymin und führt zu einer Änderung in der Aminosäuresequenz. Anstelle von Prolin wird so an Position 196 ein Leucin eingebaut. In beiden Fällen handelt es sich um aliphatische, hydrophobe Aminosäuren. Keine der insgesamt zehn sequenzierten Kontrollen (vgl. 2.2.3.5) weist diese Abweichung gegenüber der Referenzsequenz auf. In der SNP-Datenbank des NCBI wurde eine solche Variante nicht gefunden. Es handelt sich demnach um einen neuen, das heißt bisher unveröffentlichten Polymorphismus.

### *3.1.3 Produkt 7*

Patient 8 weist im achten Exon einen heterozygoten Basentausch (Adenosin statt Guanin) an Position 19684 der Nukleotidsequenz auf. Diese Stelle befindet sich außerhalb der kodierenden Sequenz.

### 3.2 SBP2

Das Gen für SBP2 liegt auf Chromosom 9 und besteht aus 17 Exons; dementsprechend wurden 17 Produkte sequenziert. Das siebzehnte Produkt enthält nicht das vollständige letzte Exon, sondern beschränkt sich auf dessen kodierenden Teil.



**Abb. 9: Schematischer Aufbau von SBP 2 auf Genlocus 2q37. 3 (nicht maßstabsgetreu)**

	1 (K)	2 (K)	3 (P)	4 (P)	5 (P)	6 (P)	7 (P)	8 (P)	9 (P)	10 (P)	11 (P)
Produkt 1										a*	
Produkt 2											
Produkt 3											
Produkt 4											
Produkt 5											
Produkt 6											
Produkt 7											
Produkt 8											
Produkt 9											
Produkt 10											
Produkt 11											
Produkt 12											
Produkt 13											
Produkt 14											
Produkt 15											
Produkt 16	b, c	b, c									
Produkt 17											

Tab. 8: Abweichungen (a, b, c) im Vergleich zur Referenzsequenz bei Kontrollen (K) und Patienten (P) in SBP2

Abweichungen, die eine Veränderung der Aminosäuresequenz nach sich ziehen, sind durch **Fettdruck** hervorgehoben; Heterozygotie ist durch \* gekennzeichnet.

Das Produkt 13 konnte aus der DNA von Patient 9 nicht amplifiziert werden.

a: G 11 C

b: T 2447 C

c: T 2519 G

### 3.2.1 Produkt 1

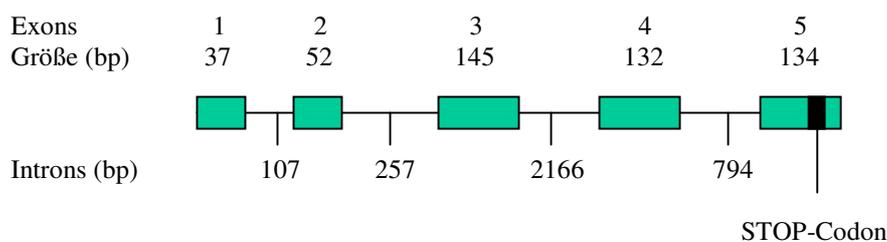
Im ersten Exon wurde bei einem Patienten, Nummer 10, ein heterozygoter Basenaustausch von Guanin zu Cytosin an Position 11 festgestellt. Die betreffende Stelle befindet sich noch im untranslatierten Bereich des Exons (5'UTR). Eine solche Variation ist nicht als SNP bekannt.

### 3.2.2 Produkt 16

Im sechzehnten Exon wurden bei allen Probanden, einschließlich der gesunden Kontrollen zwei homozygote Polymorphismen im Vergleich zur in 2.6.4. genannten Referenzsequenz im kodierenden Teil der Sequenz festgestellt: ein Basentausch von Thymin zu Cytosin an der Position 2447 (b) und ein weiterer Basentausch von Thymin zu Guanin an der Position 2519 (c) der DNA-Sequenz. Die erste Veränderung führt zu einem Aminosäureaustausch von Leucin durch Prolin (Position 797), letztere ebenfalls zu einem Aminosäureaustausch, in diesem Fall von Isoleucin durch Serin (Position 821). Keiner der beiden Polymorphismen ist in der SNP-Datenbank zu finden. Da sich diese Variante jedoch auch bei den Kontrollen findet, ist nicht mit einem Krankheitswert zu rechnen.

### 3.3 RPL30

Das Gen für RPL30 liegt auf Chromosom 8 und enthält fünf Exons; es wurden vier Produkte analysiert, wobei das erste davon zwei Exons enthält.



**Abb. 10:** Schematischer Aufbau von RPL30 auf Genlocus 8q22 (nicht maßstabsgetreu)

	1 (K)	2 (K)	3 (P)	4 (P)	5 (P)	6 (P)	7 (P)	8 (P)	9 (P)	10 (P)	11 (P)
<b>Produkt 1</b>											
<b>Produkt 2</b>											
<b>Produkt 3</b>											
<b>Produkt 4</b>							a*				

**Tab. 9: Abweichungen (a) im Vergleich zur Referenzsequenz bei Kontrollen (K) und Patienten (P) in RPL30**

Abweichungen, die eine Veränderung der Aminosäuresequenz nach sich ziehen, sind durch

**Fettdruck** hervorgehoben, Heterozygotie ist durch \* gekennzeichnet.

a : C 436 T

### 3.3.1 Produkt 4

Bei der bei Patient 7 gefundenen Abweichung in Produkt 4 handelt es sich um einen heterozygoten Basentausch C 436 T im 3'UTR, der nicht als SNP veröffentlicht ist.

## 3.4 SEPP

SEPP liegt auf Chromosom 5 und enthält fünf Exons, von denen allerdings nur vier kodierende Anteile besitzen. Es handelt sich um ein Schlüsselprotein des Selenstoffwechsels, das außerdem den Hauptanteil am Plasma-Selenspiegel ausmacht, welcher wiederum bei vier der Patienten erniedrigt war. Aus diesem Grund wurde - obwohl die Zielsetzung dieser Arbeit sich strenggenommen auf die Untersuchung des Offenen Leserasters der kodierenden Sequenz beschränkte - in diesem Fall auch das erste Exon, welches lediglich untranslatierte Regionen beinhaltet, analysiert.

Das letzte Exon mit dem 3'UTR ist 1447 bp lang, sodass es zum Zweck einer einfacheren Sequenzierung in vier Einzelprodukte mit jeweils eigenen Primerpaaren aufgeteilt wurde (vgl. 2.1.3).

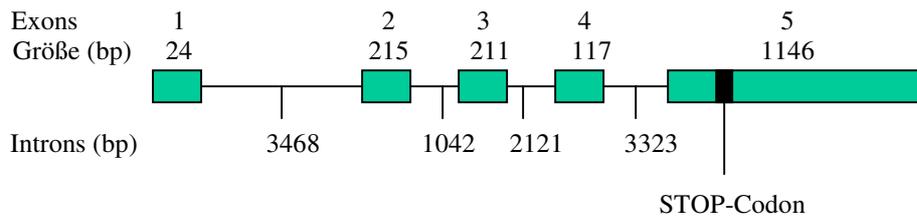


Abb. 11: Schematischer Aufbau von SEPP auf Genlocus 5q. 31 (nicht maßstabsgetreu)

Produkt 5.1 enthält den letzten Teil kodierender Region und die dazugehörige Splice-Stelle; in Produkt 5.2 befinden sich neun der zehn für Sec kodierenden TGAs (das zehnte liegt im zweiten Exon, also in Produkt 2); Produkt 5.3 beinhaltet das erste und Produkt 5.4 das zweite SECIS-Element sowie das Poly-A-Signal.

	1 (K)	2 (K)	3 (P)	4 (P)	5 (P)	6 (P)	7 (P)	8 (P)	9 (P)	10 (P)	11 (P)
<b>Produkt 1</b>											
<b>Produkt 2</b>											
<b>Produkt 3</b>											
<b>Produkt 4</b>											
<b>Produkt 5.1</b>										a*	
<b>Produkt 5.2</b>		c*		c*	c*	b*	b		b*	c*	b*
<b>Produkt 5.3</b>											
<b>Produkt 5.4</b>						d*	e		e*	d*	e*

Tab. 10: Abweichungen (a, b, c, d, e) im Vergleich zur Referenzsequenz bei Kontrollen (K) und Patienten (P) in SEPP

Abweichungen, die eine Veränderung der Aminosäuresequenz nach sich ziehen, sind durch **Fettdruck** hervorgehoben, Heterozygotie ist durch \* gekennzeichnet.

a: G 736 C      b : G 1196 A      c : C 1280 T      d : AGTA 1873 del-      e : ins- 1948 T

### 3.4.1 Produkt 5.1

Bei Patient 10 wurde ein Basentausch mit daraus folgendem Aminosäuretausch an Position 234 in heterozygoter Form gefunden (a). Dies ist ein bereits bekannter SNP (rs 3877899) mit einer mittleren Heterozygotenfrequenz von 0,228.

### 3.4.2 Produkt 5.2

Bei einigen der Patienten wurde in diesem Produkt ein Basenaustausch, G 1196 A, gefunden (b). Bei den Patienten 6, 9 und 11 gilt diese Veränderung nur für eines der Allele; für Patient 7 liegt sie in homozygoter Form vor. Es handelt sich um einen bekannten SNP (rs 7579) mit einer Heterozygotenfrequenz von 0,385.

Ein weiterer Basentausch, C 1280 T, der sowohl bei der Kontrolle 2 als auch bei den Patienten 4, 5 und 10 auf jeweils einem Allel auftritt (c), ist ebenfalls als SNP registriert (rs 6413428). Seine Heterozygotenfrequenz liegt bei 0,337.

Keine der beiden Stellen liegt im kodierenden Teil des Exons. Keines der neun für SEPP charakteristischen TGA-Codons, die in Produkt 5.2 enthalten und für die entsprechenden Sec-Insertionen zuständig sind, ist betroffen.

### 3.4.3 Produkt 5.4

Die Patienten 7, 9 und 11 zeigen eine T-Insertion (e) nach Position 1948, welche kurz nach dem Übergang des SECIS-Stemloop zum linearen mRNA-Teil liegt. Patient 7 ist im Hinblick auf diese Insertion homozygot; die Patienten 9 und 11 besitzen nur ein verändertes Allel. Diese T-Insertion ist als SNP rs 28919927 publiziert; ihre geschätzte Heterozygotenfrequenz beträgt 0,405.

Die Patienten 6 und 10 weisen in diesem Produkt die Deletion von vier Basen, AGTA, an den Positionen 1873-1876 auf (d). In beiden Fällen ist die Veränderung heterozygot. Sie liegt innerhalb des zweiten SECIS-Elements. Da eine solche Deletion nicht in der SNP-Datenbank zu finden war, wurden zusätzlich zu den beiden Standardkontrollen acht weitere Kontrollen für SEPP 5.4 sequenziert. Diese Kontrollen wurden auch im Hinblick auf SEPP 5.2 analysiert, um

die Relevanz einer Kombination von Polymorphismen, also von Compound Heterozygotie beurteilen zu können. Die Ergebnisse sind in folgender Tabelle dargestellt:

Kontrollen:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SEPP 5.2		c*			b*	b	b*		b*	
SEPP 5.4				d*	e*	e	e*		e*	d*

**Tab. 11: Abweichungen (b, c, d, e) im Vergleich zur Referenzsequenz bei Kontrollen 1-10 in SEPP 5.2 und 5.4**

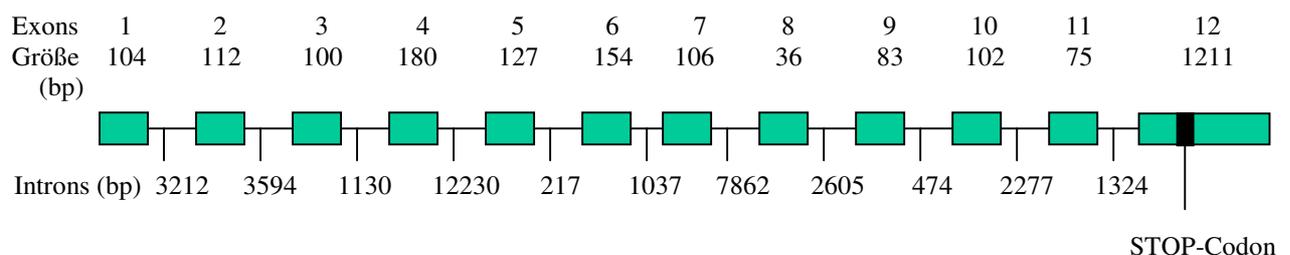
Heterozygotie ist durch \* gekennzeichnet.

b : G 1196 A      c : C 1280 T      d : AGTA 1873 del-      e : ins- 1948 T

Ein Krankheitswert kann für alle bei diesen gesunden Kontrollen vorkommenden Kombinationen ausgeschlossen werden. Somit bleibt noch die Bedeutung der Veränderungen bei den Patienten 6 und 10, die in ihrer jeweiligen Kombination so nicht bei den Kontrollen vorkommen, ungeklärt.

### 3.5 SCLY

SCLY liegt auf Chromosom 2 und besteht aus zwölf Exons; es wurden deswegen zwölf Produkte sequenziert. Das letzte Produkt enthält dabei, ähnlich wie bei SBP2, nicht das gesamte letzte Exon, sondern lediglich seinen kodierenden Anteil.



**Abb. 12: Schematischer Aufbau von SCLY auf Genlocus 2q37. 3 (nicht maßstabsgetreu)**

	1 (K)	2 (K)	3 (P)	4 (P)	5 (P)	6 (P)	7 (P)	8 (P)	9 (P)	10 (P)	11 (P)
<b>Produkt 1</b>											
<b>Produkt 2</b>											
<b>Produkt 3</b>											
<b>Produkt 4</b>											
<b>Produkt 5</b>		<b>a*</b>	<b>a</b>	<b>a</b>	<b>a</b>	<b>a*</b>		<b>a</b>	<b>a*</b>	<b>a</b>	<b>a*</b>
<b>Produkt 6</b>											
<b>Produkt 7</b>											
<b>Produkt 8</b>			<b>b*</b>	<b>b*</b>					<b>b*</b>		
<b>Produkt 9</b>											
<b>Produkt 10</b>											
<b>Produkt 11</b>											
<b>Produkt 12</b>				<b>c*</b>	<b>c*</b>			<b>c*</b>			

**Tab. 12: Abweichungen (a, b, c) im Vergleich zur Referenzsequenz bei Kontrollen (K) und Patienten (P) in SCLY**

Abweichungen, die eine Veränderung der Aminosäuresequenz nach sich ziehen, sind durch **Fettdruck** hervorgehoben, Heterozygotie ist als \* kodiert.

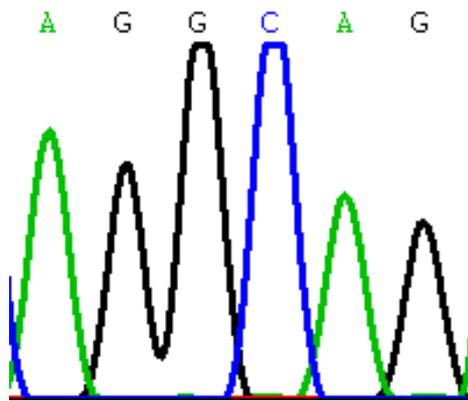
Das Produkt 1 konnte aus der DNA der Patienten 5 und 9 nicht amplifiziert werden; gleiches gilt für das Produkt 12 der Patienten 9 und 10.

**a** : A 539 G      **b** : T 925 C      **c** : C 1237 T

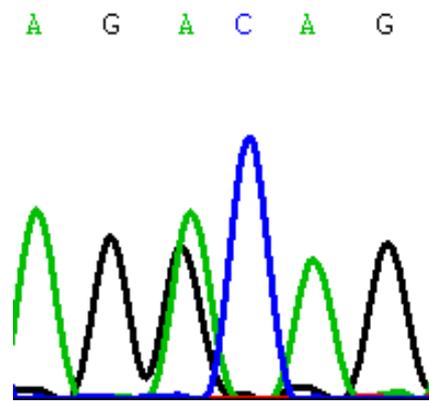
### 3.5.1 Produkt 5

In diesem Produkt wurde an Stelle 539 der Basenfolge im Vergleich zur Referenzsequenz ein Tausch von Adenosin zu Guanin bei mehreren Patienten festgestellt, der zum Teil in homozygoter, zum Teil in heterozygoter Form vorliegt. Es kommt zu einer Änderung der Aminosäuresequenz: statt Threonin (T) wird an der Position 175 Alanin (A) in die Polypeptidkette eingebaut. Dieser nicht-synonyme Basentausch ist als SNP bekannt (rs 3210400) und hat eine Heterozygotenfrequenz von 0,346.

Da es sich hier um eine aminosäurerelevante Änderung im kodierenden Teil des Exons handelt, soll sie im Folgenden beispielhaft als Bildsequenz dargestellt werden:



Patient 3 : GCA (Ala) - homozygot

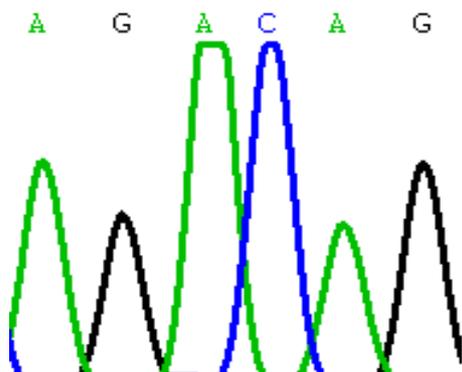


Patient 6: ACA/GCA (Thr/Ala) - heterozygot

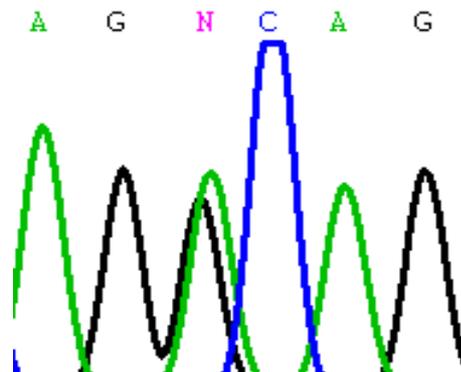
**Abb. 13: Beispiele für homo- und heterozygote Abweichung von der Referenzsequenz in SCLY**

Teilsequenz von SCLY (Basen 537-542) bei zwei der untersuchten Patienten

Bei einer der beiden Standardkontrollen (Nummer 2) wurde dieselbe Veränderung in heterozygoter Form gefunden:



Kontrolle 1: ACA (Thr) - homozygot



Kontrolle 2: ACA/GCA (Thr/Ala) - heterozygot

**Abb. 14: Beispiele für homo- und heterozygote Abweichung von der Referenzsequenz für SCLY**

Teilsequenz von SCLY (Basen 537-542) bei den Standardkontrollen 1 und 2

### 3.5.2 *Produkt 8*

Bei den Patienten 3, 4 und 9 wurde an der Position 925 ein heterozygoter Basentausch von Thymin zu Cytosin festgestellt, der jedoch nicht zu einer Änderung der entsprechenden Aminosäure - Alanin an der Position 303 - führt. Er ist als SNP mit einer Heterozygotenfrequenz von 0,476 veröffentlicht (rs 1128552).

### 3.5.3 *Produkt 12*

Die Patienten 4, 5 und 8 weisen an der Position 1237 einen Basentausch in heterozygoter Form auf: Cytosin wird auf einem der Allele durch Thymin ersetzt. Auch hier bleibt die Primärstruktur des Proteins - Phenylalanin an der Position 407 – unverändert. Es handelt sich um einen weiteren bekannten SNP (rs 12993309) mit bislang noch unbestimmter Heterozygotenfrequenz