

**Molekulargenetische und biochemische
Untersuchungen zur Pathogenese der Spinalen
Muskelatrophie mit Atemnot Typ 1 (SMARD1)**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin
im November 2007

vorgelegt von

Dipl.-Biol. Ulf-Peter Günther

geboren in New Delhi (Indien)

Angefertigt am Institut für Humangenetik und dem Neurowissenschaftlichen
Forschungszentrum (NWFZ) der Charité, Charité-Universitätsmedizin Berlin.

Alles Wissen und alles Vermehren unseres Wissens endet nicht mit einem Schlußpunkt, sondern mit einem Fragezeichen.

Hermann Hesse

Gutachter:

1. Prof. Dr. Markus Schülke

Klinik für Pädiatrie m.S. Neurologie, CVK

Charité - Universitätsmedizin Berlin

Augustenburger Platz 1

D-13353 Berlin

2. Prof. Dr. Dietmar Kuhl

Institut für Biologie

Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

Freie Universität Berlin

Takustr. 6

14195 Berlin

Disputation am 05. Februar 2008

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	6
1.1	Spinale Muskelatrophien	6
1.2	Spinale Muskelatrophie mit Atemnot (SMARD)	7
1.2.1	Die Symptomatik der SMARD1	8
1.2.2	Unterschiede der klinischen Bilder zwischen Patienten mit „klassischem“ SMA-Typ I und SMARD1	10
1.3	Molekulare und pathophysiologische Grundlagen der Spinalen Muskelatrophien	10
1.3.1	Die „klassische“ Form der SMA	10
1.3.2	SMARD: Mutationen im <i>IGHMBP2</i> -Gen sind die genetische Ursache der SMARD1	12
1.3.3	Das Tiermodell der SMARD1: die <i>neuromuscular degeneration (nmd)</i> Maus	15
1.3.4	Unterschiede in der Neurodegeneration zwischen der SMARD1 und der SMA Typ I	16
1.4	Helikasen	16
1.4.1	Struktur-Funktion-Beziehung der Helikasen	17
1.4.2	Die Arbeitsweise der Helikasen	19
1.5	Ziel dieser Arbeit	22
2	PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN	24
2.1	Patienten	24
2.2	Material	24
2.2.1	Geräte	24
2.2.2	Software	26
2.2.3	Zellen	27
2.2.4	Vektoren	27
2.2.5	Primer	27
2.2.6	Antikörper	28
2.2.7	Enzyme	28
2.2.8	Kits	28
2.2.9	Säulen	29
2.2.10	Radioaktiv markierte Moleküle	29
2.2.11	Längen- und Größenstandards	29
2.2.12	Chemikalien	29
2.2.13	Zellkulturmedien	30
2.2.14	Verbrauchsmittel	30
2.2.15	Lösungen und Puffer	31
2.3	Methoden	34
2.3.1	Statistische Methoden	34
2.3.2	Molekularbiologische Methoden	35
2.3.3	Zellbiologische Methoden	42

2.3.4	Proteinbiochemische Methoden.....	42
3	ERGEBNISSE	50
3.1	Molekulargenetische Untersuchungen zur SMARD1	50
3.1.1	Identifikation von Mutationen im <i>IGHMBP2</i> -Gen in einem Kollektiv infantiler SMARD-Patienten.....	50
3.1.2	Hierarchische Clusteranalyse retrospektiv erhobener klinischer Daten eines SMARD-Kollektives	54
3.1.3	Genexpressionsstudie und Überprüfung der Pathogenität der c.1235+3A>G-Spleißstellenmutation.....	57
3.1.4	Southern Blot-Analyse bei putativen SMARD1-Patienten	60
3.1.5	Klinische Variabilität der SMARD1: Charakterisierung von Mutationen in juvenilen SMARD1-Patienten.....	64
3.1.6	Vergleich der IGHMBP2-Proteinmengen zwischen SMARD1-Patienten mit infantiler und mit juveniler Manifestation der Erkrankung.....	72
3.2	Biochemische Untersuchungen zur SMARD1	75
3.2.1	<i>In vitro</i> -Mutagenese.....	76
3.2.2	Proteinexpression.....	76
3.2.3	Charakterisierung der enzymatischen Aktivität des Wildtyp-IGHMBP2-Proteins	78
3.2.4	Charakterisierung der enzymatischen Aktivität mutanten IGHMBP2-Proteins.....	86
4	DISKUSSION	91
4.1	SMARD ist klinisch und genetisch heterogen: Indizien für zwei weitere genetisch bedingte Erkrankungen mit einem SMARD1-ähnlichen Phänotyp	91
4.2	SMARD1 ist klinisch und allelisch heterogen.	93
4.2.1	Klinische und genetische Beschreibung der infantilen Verlaufsform der SMARD1	93
4.2.2	Zwei juvenile Patienten mit Mutationen im <i>IGHMBP2</i> -Gen erweitern das klinische Spektrum der SMARD1 um eine juvenile Verlaufsform	96
4.3	Untersuchung zur Genotyp-Phänotyp-Beziehung der SMARD1.....	98
4.3.1	Genexpressionsstudie	98
4.3.2	Proteinmengenbestimmung.....	99
4.4	IGHMBP2 ist eine ATP-abhängige 5'-3'-RNA/DNA-Helikase	101
4.5	Die meisten SMARD1-bezogenen IGHMBP2-Varianten zeigen einen deutlichen Verlust der enzymatischen Aktivität.....	103
4.6	Der molekulare Pathomechanismus der SMARD1: Konsequenz einer Störung des zellulären Translationsapparates?	108
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	111
6	SUMMARY	113

7	LITERATURVERZEICHNIS	115
8	ANHANG	127
8.1	Abkürzungen.....	127
8.2	Eigene Publikationen	129
8.2.1	Originalarbeiten.....	129
8.2.2	Beiträge zu anderen Arbeiten	129
8.2.3	Tagungsbeiträge	130
8.3	Verwendete Oligonukleotide	130
8.4	Firmenverzeichnis	133
8.5	Lebenslauf.....	135
8.6	Danksagung	136