

3 Ergebnisse

3.1 Molekulargenetische Untersuchungen zur SMARD1

3.1.1 Identifikation von Mutationen im *IGHMBP2*-Gen in einem Kollektiv infantiler SMARD-Patienten

In den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte die genetische Ursache der SMARD1 identifiziert werden (Grohmann *et al.*, 2001 und 2003). Dabei wurden auch Patienten mit einem SMARD1-ähnlichen, klinischen Bild entdeckt, die keine *IGHMBP2*-Genmutationen aufwiesen. Dies machte deutlich, dass das Krankheitsbild der Spinalen Muskelatrophie mit Atemnot genetisch heterogen ist. Um das klinische Spektrum der SMARD1 und die klinischen Unterschiede zwischen SMARD1 und nonSMARD1-Patienten besser bestimmen zu können, war es nötig, möglichst zahlreiche SMARD1-Patienten zu diagnostizieren. So würde die Genetik der SMARD1 auf eine breitere Basis gestellt werden und die Verteilung der gefundenen Missense-Mutationen in dem Protein böte möglicherweise Arbeitshypothesen für funktionelle Studien.

In einem Patientenkollektiv (n=70) mit infantiler SMARD habe ich deshalb eine molekulargenetische Untersuchung der kodierenden Abschnitte des *IGHMBP2*-Gens durchgeführt, um die Verdachtsdiagnose der SMARD1 zu bestätigen oder auszuschließen. Die Ergebnisse sind in *Tabelle 35* zusammengefasst.

Dabei wurden bei 15 (21%) Patienten 26 *IGHMBP2*-Mutationen gefunden, die den klinischen Verdachtsmoment der SMARD1 bestätigten. In 10 Proben konnte ich 15 bisher nicht beschriebene Veränderungen im *IGHMBP2*-Gen entdecken.

Die meisten SMARD1-Patienten (93%) waren „*compound*“-heterozygote Träger. Ich habe die Segregation der Mutationen überprüft, sofern DNA der Eltern zur Verfügung stand. Ungefähr die Hälfte (7/15) der hier erstmals beschriebenen Mutationen waren kurze Deletionen, die den Leserahmen verschoben, oder Nonsense-Mutationen, die zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation führten.

Des Weiteren entdeckte ich zwei (14%) neue Mutationen (c.1060+1G>T, c.1235+3A>G) innerhalb der Spleißstellen des *IGHMBP2*-Gens. Während bei der c.1060+1G>T-Mutation eindeutig das invariable Guanidin der Spleißdonorstelle durch Thymin ersetzt war (*Abbildung 7*), verändert die c.1235+3A>G-Mutation das Adenin an Position +3 zu Guanidin. Da beide Basen durch die Konsensussequenz

vorhergesagt werden (Shapiro und Senapathy, 1987), war die Pathogenität der Veränderung unklar.

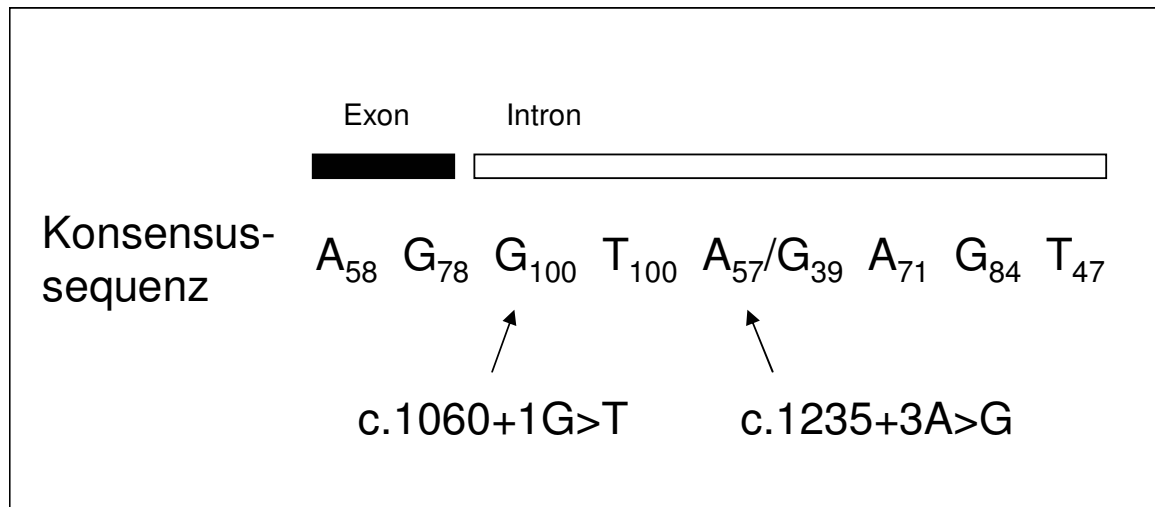


Abbildung 7: Lage der identifizierten Spleißdonorstellenmutationen in der Konsensussequenz der 5'-Spleißstellen. Die tiefgestellten Ziffern geben das Vorkommen der Nukleotide an den entsprechenden Positionen der Konsensussequenz (von Primaten) in Prozent wieder (Shapiro und Senapathy, 1987).

Mit Hilfe der Spleißstellenvorhersage-Software „Genie“ (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) habe ich die Funktionalität der veränderten Spleißstellen *in silico* bestimmt. Dabei wurde für die c.1235+3A>G-Veränderung ein drastischer Effekt vorhergesagt, der sich in einer Reduktion des „*splice score*“ von 0,91 (Wildtyp, im Folgenden Wt abgekürzt) auf 0,35 (c.1235+3A>G) widerspiegelte. Zum Vergleich: Die Auswirkung der c.1060+1G>T-Mutation auf den „*splice score*“ war so stark, dass das Programm gar keine Spleißdonorstelle mehr erkannte (0,96=Wt). Aufgrund der unklaren Vorhersagen wurde die Pathogenität der c.1235+3A>G-Mutation experimentell untersucht (s. 3.1.3). Der Effekt der c.1060+1G>T-Mutation konnte nicht überprüft werden, da von dem Patienten keine RNA zur Verfügung stand.

Sechs der 15 (40%) neu entdeckten Veränderungen im *IGHMBP2*-Gen führten zum Austausch von Aminosäuren, die sich an konservierten Stellen des Proteins befanden und deren Veränderung somit potentiell pathogen war (*Abbildung 8*). Die Abwesenheit der neu entdeckten Missense-Veränderungen und der Spleißstellenmutationen habe ich in mindestens 105 Kontrollen europäischen Ursprungs überprüft.

Ergebnisse

Position AS	Sequenz p.L17P	Position AS	Sequenz p.W386R	Spezies
14	L D L L E L E	383	A S C W I P L	<i>H. sapiens</i>
14	L D L L E L E	383	A S C W I P L	<i>P. troglodytes</i>
14	L D Q L E L E	382	A S C W I P L	<i>M. musculus</i>
-	- - - - -	299	A S C W I S L	<i>X. tropicalis</i>
14	L D L L Q L E	384	S S C W I A L	<i>D. rerio</i>
	p.H445P		p.L472P	
442	Y R M H Q A I	469	R H L L R D L	<i>H. sapiens</i>
442	Y R M H Q A I	469	G H L L R D L	<i>P. troglodytes</i>
441	Y R M H Q A I	468	G H L L K D L	<i>M. musculus</i>
358	Y R M H Q S I	385	Q H L L K D L	<i>X. tropicalis</i>
443	Y R M N S A I	470	K H L L R D L	<i>D. rerio</i>
	p.T493I		p.R581S	
490	L V D T A G C	578	S F V R S N R	<i>H. sapiens</i>
490	L V D T A G C	578	S F V R S N R	<i>P. troglodytes</i>
489	L I D T A G C	577	T F V R S N R	<i>M. musculus</i>
406	L I D T A H C	494	S F V R S N S	<i>X. tropicalis</i>
491	L V D T A G C	577	S L V R S N R	<i>D. rerio</i>

Abbildung 8: Der Vergleich der orthologen IGHMBP2-Proteinsequenzen zeigt starke Konservierung an den Positionen, an denen bei SMARD1-Patienten Aminosäureaustausche identifiziert wurden (grau unterlegt). Die Sequenzen wurden den Datenbanken Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und Ensembl (<http://www.ensembl.org>) mit den folgenden Identifikationsnummern entnommen: NP_002171; P40694; ENSPTRP00000006865; ENSXETP00000043180; ENSDARP00000060290.

Patient	Beginn der Atemnot [d]	Herkunft	Mutation		Aminosäureaustausch		Mutationsart	Segregationsanalyse
1	60	USA	c.1000G>A	c.1488C>A	p.E334K	p.C496X	Mis., Non.	nein
4	45	U.K.	c.50T>C	c.1488C>A	p.L17P	p.C496X	Mis., Non.	ja
8	90	U.K.	c.1082 T>C	c.1488 C>A	p.L361P	p.C496X	Mis., Non.	ja
12	91	Italien	<i>c.661delA</i>	c.1415T>C	<i>p.T221PfsX12</i>	p.L472P	Del., Mis.	ja
13	91	U.K.	c.1156T>C	c.1813C>T	p.W386R	p.R605X	Mis., Non.	ja
21	56	Vietnam	c.1235+3A>G	c.1334A>C	p.A355LfsX10*	p.H445P	Spleißst., Mis.	ja
25	60	Südafrika	c.1060+1G>T	c.1082T>C	Nicht bestimmt	p.L361P	Spleißst., Mis.	ja
29	60	USA	c.1218delC	c.1708C>T	p.T407PfsX16	p.R570X	Del., Non.	nein
37	120	USA	c.616C>T	c.1877delT	p.Q206X	p.L626RfsX107	Non., Del.	nein
38	90	USA	c.1478C>T	c.2363C>T	p.T493I	p.R788X	Mis., Non.	ja
41	137	Schweden	c.163C>T	c.1969C>T	p.Q55X	p.Q657X	Non., Non.	nein
42	122	Italien	c.904C>T	c.1156T>C	p.Q302X	p.W386R	Non., Mis.	ja
58	60	Deutschland	c.1738G>A	c.1738G>A	p.V580I	p.V580I	Mis., Mis.	nein
59	137	Kroatien	c.388C>T	c.1743A>C	p.R130X	p.R581S	Non., Mis.	nein
62	90	U.K.	c.983_987delAAGAA	c.1540G>A	p.K328TfsX44	p.E514K	Del., Mis.	nein

Tabelle 35: IGHMBP2-Mutationen in dem untersuchten Kollektiv von SMARD-Patienten. Alle Mutationen sind basierend auf der IGHMBP2 cDNA Sequenz (NM_002180.1) und entsprechend der Standardnomenklatur (den Dunnen und Antonarakis, 2000) bezeichnet. Neue Mutationen sind fett markiert. Die Einzelbasendeletion des Patienten 12 wurde bereits in einem SMARD1-Patienten identifiziert, allerdings nur als einzelne Heterozygote. *Die Konsequenz der c.1235+3A>G Spleißstellenmutation auf Proteinebene. Dabei ist zu beachten, dass diese Mutation auch eine reduzierte Menge korrekt gespleißter Transkripte zulässt. Mutationsarten: Mis.= Missense, Non.= Nonsense, Del.= Deletion, die zu einer Verschiebung des Leserahmens führt, Spleißst.= Spleißdonorstelle.

3.1.2 Hierarchische Clusteranalyse retrospektiv erhobener klinischer Daten eines SMARD-Kollektives

Da nur in etwa jedem fünften SMARD-Patienten Mutationen im *IGHMBP2*-Gen gefunden wurden, drängte sich die Frage auf, ob und welche Symptomenmuster non-SMARD1-Patienten aufweisen, die sie von SMARD1-Patienten unterscheiden. Charakteristische „Syndrome“ könnten zur besseren Beschreibung der klinischen Kriterien der SMARD1 und zur Definition weiterer SMARD-Gruppen beitragen. Deshalb verwendete ich für die nachfolgenden Untersuchungen - wie unter **2.1** beschrieben - klinische Daten aller im Institut für Humangenetik, Charité Berlin, untersuchten SMARD-Patienten, sofern ein ausgefüllter Fragebogen zur klinischen Situation des Patienten zur Verfügung stand.

Durch paarweise Vergleiche wurden zunächst klinische Merkmale einzeln oder in Kombinationen daraufhin untersucht, ob sie den Nachweis einer *IGHMBP2*-Mutationen im SMARD-Patientenkollektiv vorhersagen konnten oder nicht.

Das Einzelkriterium „Manifestation zwischen 6 Wochen und 6 Monaten“ hatte das stärkste Vorhersagepotenzial für eine *IGHMBP2*-Mutation mit 87% Sensitivität und 92% Spezifität (*Tabelle 36*). Dabei wurde „Manifestation“ als Zeitpunkt der einsetzenden Atemnot definiert, der therapeutische Maßnahmen nach sich zog oder hätte nach sich ziehen müssen. Auf der anderen Seite schloss das Merkmal „kongenitale Manifestation“ eine *IGHMBP2*-Mutation mit 66% Sensitivität und 96% Spezifität aus. Die Vorhersagekraft des Merkmals „Manifestation zwischen 6 Wochen und 6 Monaten“ für eine *IGHMBP2*-Mutation konnte auf 98% Sensitivität und 92% Spezifität erhöht werden, wenn es mit der Bedingung „Eventration des Diaphragma“ oder „Frühgeburt“ kombiniert wurde.

Kriterium	χ^2	p	ϕ	N	Sensitivität [%]	Spezifität [%]
Vorhersage einer <i>IGHMBP2</i>-Mutation durch mehrere Merkmale						
Manifestation 6 Wochen bis 6 Monate	81,62	<0,0001	0,79	132	87	92
Distale Muskelschwäche	8,22	0,0041	0,29	96	72	58
Intrauterine Wachstumsretardierung	7,11	0,0077	0,25	111	48	77
Eventration des Diaphragmas	7,06	0,0079	0,27	99	91	30
Muskelschwäche der unteren Extremitäten	5,76	0,0164	0,26	85	54	72
<i>Talipes equinovarus</i> - Deformationen	5,36	0,0206	0,29	62	33	91
Manifestation 6 bis 13 Monate	4,9	0,0268	0,19	132	2	86
Multiple kongenitale Kontrakturen	3,99	0,0459	0,22	80	10	59
Frühgeburt	0,58	0,4446	0,07	119	38	69
Allgemeine Muskelschwäche	0,15	0,7029	0,03	126	84	13
Manifestation nach 13 Monaten	0,02	0,8827	0,01	132	6	93
Ausschluss einer <i>IGHMBP2</i>-Mutation durch ein einzelnes Merkmal						
kongenitale Manifestation	47,86	<0,0001	0,59	136	66	96
Vorhersage einer <i>IGHMBP2</i>-Mutation durch ein einzelnes Merkmal						
Manifestation 6 Wochen bis 6 Monate UND (Eventration des Diaphragmas ODER Frühgeburt)	93,19	<0,0001	0,89	125	98	92

Tabelle 36: Statistische Analyse des Vorhersagepotenzials klinischer Symptome von SMARD-Patienten für *IGHMBP2*-Mutationen. Sensitivität bedeutet, mit welcher Wahrscheinlichkeit das Vorhandensein eines Merkmals eine *IGHMBP2*-Mutation vorhersagt, und die Spezifität sagt aus, mit welcher Wahrscheinlichkeit die Abwesenheit des Merkmals das Fehlen einer *IGHMBP2*-Mutation voraussagt. Die Wörter mit Großbuchstaben bezeichnen Boole'sche Operatoren. Manifestation = Manifestation der Erkrankung

Ergebnisse

Um innerhalb dieses Kollektivs spezifische Patientengruppen mit bestimmten Symptomenmustern zu identifizieren, wurde eine hypothesenfreie hierarchische Clusteranalyse durchgeführt (*Abbildung 9*).

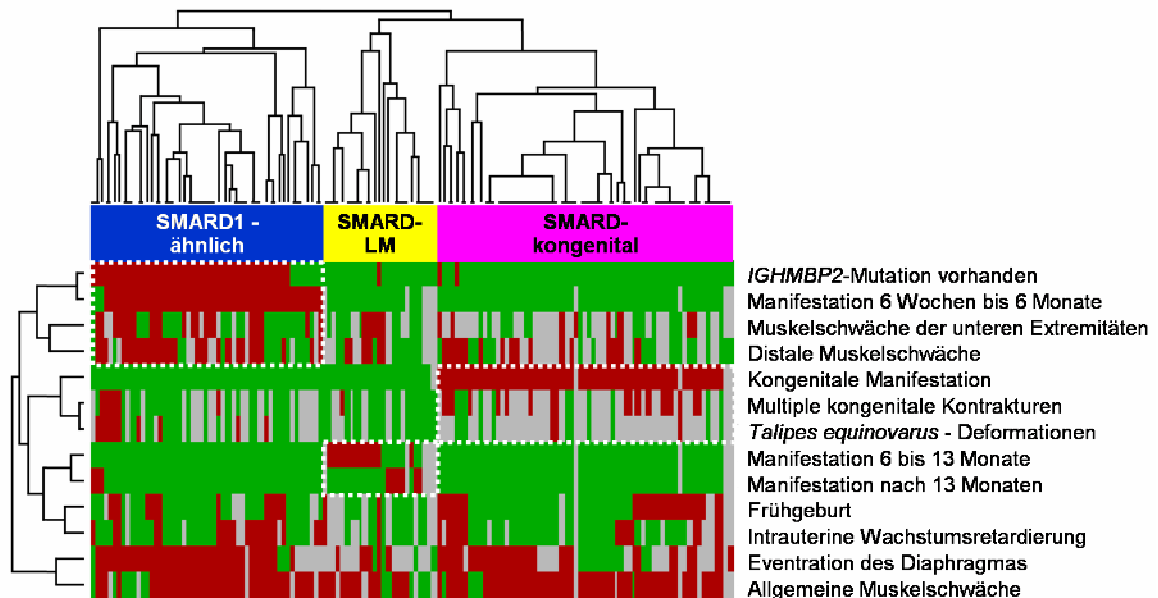


Abbildung 9: Dendrogramm der hierarchischen Clusteranalyse von 141 Patienten mit spinaler Muskelatrophie mit Atemnot (SMARD). Die die jeweiligen Cluster bestimmenden klinischen Merkmale sind in gestrichelten Kästchen dargestellt. Positive klinische Kriterien sind rot, negative in grün und fehlende Angaben in grau gekennzeichnet.

Dabei konnte ich 3 Hauptgruppen unterscheiden: (1) Die erste Patientengruppe wurde als "SMARD1-ähnliche" Gruppe bezeichnet, da sie zum größten Teil (86%) SMARD1-Patienten enthielt. Die klinischen Kriterien „Manifestation zwischen 6 Wochen und 6 Monaten“, „Muskelschwäche der unteren Gliedmaßen“ und „Distale Muskelschwäche“ definierten dieses Cluster. (2) Die zweite Gruppe enthielt Patienten, bei denen die Atemnot erst nach 6 Lebensmonaten einsetzte und die keine kongenitalen Kontrakturen aufwiesen. Daher wurde dieses Cluster als „SMARD-LM“ (LM= „late manifestation“) benannt. Zu ihm gehörte allerdings auch ein SMARD1-Patient (4%) mit *IGHMBP2*-Genmutationen. (3) Das "SMARD-kongenital"-Cluster wurde durch kongenitale Kontrakturen und kongenitale Manifestation der Atemnot bestimmt. Zwei der 65 SMARD-Patienten dieses Clusters hatten Mutationen im *IGHMBP2*-Gen. Die klinischen Symptome der jeweiligen Patientengruppen sind in *Tabelle 37* aufgeführt. Diese Ergebnisse bestätigen die eingangs formulierte Vermutung, dass SMARD genetisch heterogen ist und dass es neben der SMARD1 noch andere klinische Syndrome gibt, deren genetische Ursachen unbekannt sind.

	Gesamtkollektiv	SMARD1-ähnlich	SMARD-kongenital	SMARD-LM
Gesamtanzahl innerhalb eines Clusters	n=141	n=51	n=65	n=25
<i>IGHMBP2</i> -Mutation vorhanden	47/141(33%)	44/51 (86%)	2/65 (3%)	1/25 (4%)
kongenitale Manifestation	61/136 (45%)	0/51 (0%)	61/61 (100%)	0/24 (0%)
Manifestation 6 Wochen bis 6 Monate	48/132 (36%)	48/51 (94%)	0/61 (0%)	0/20 (0%)
Manifestation 6 bis 13 Monate	13/132 (10%)	0/51 (0%)	0/61 (0%)	13/20 (65%)
Manifestation nach 13 Monaten	9/132 (7%)	3/51 (6%)	0/61 (0%)	6/20 (30%)
Eventration des Diaphragmas	79/99 (80%)	40/44 (91%)	33/45 (73%)	6/10 (60%)
Distale Muskelschwäche	52/96 (54%)	28/41 (68%)	18/39 (46%)	6/16 (38%)
Muskelschwäche der unteren Extremitäten	34/85 (40%)	21/43 (49%)	8/27 (30%)	5/15 (33%)
Allgemeine Muskelschwäche	108/126 (86%)	39/46 (85%)	54/59 (92%)	15/21 (71%)
Multiple kongenitale Kontrakturen	26/80 (33%)	6/31 (19%)	19/30 (63%)	1/19 (5%)
<i>Talipes equinovarus</i> - Deformationen	13/62 (21%)	10/30 (33%)	3/14 (21%)	0/18 (0%)
Frühgeburt	40/119 (34%)	13/44 (30%)	25/59 (42%)	2/16 (13%)
Intrauterine Wachstumsretardierung	36/111 (32%)	19/45 (42%)	15/52 (29%)	2/14 (14%)

Tabelle 37: Klinische Beschreibung der vier Hauptcluster innerhalb des SMARD-Kollektivs. Angegeben sind die relativen Anteile der klinischen Merkmale, die innerhalb der Cluster vorkamen. Prozentanteile über 85% sind fett dargestellt. Da von den Patienten nicht immer zu allen klinischen Merkmalen Informationen vorlagen, sind die dargestellten Prozentwerte nur auf die Zahl der Patienten mit vorliegenden Angaben bezogen und nicht auf auf das Gesamtkollektiv der untersuchten Patienten.

3.1.3 Genexpressionsstudie und Überprüfung der Pathogenität der c.1235+3A>G-Spleißstellenmutation

Neben der klinischen und genetischen Beschreibung der SMARD1- und non-SMARD1-Patienten interessierte mich die Frage, in welchem Ausmaß die neu entdeckte Spleißstellenmutation c.1235+3A>G das Spleißen der *IGHMBP2*-mRNA beeinträchtigt.

Dafür habe ich zunächst mit einer RT-PCR, welche die Exone 6-10 des *IGHMBP2*-Gens überspannte, die Funktionalität der betroffenen Spleißdonorstelle überprüft (*Abbildung 10*). Bei der Amplifikation eines cDNA-Fragmentes des *IGHMBP2*-Gens

Ergebnisse

habe ich bei dem Patienten eine zusätzliche Bande entdeckt (*Abbildung 10*, Spur 2). Die Sequenzierung dieses kürzeren RT-PCR-Fragments ergab nach Aufreinigung aus dem Gel eine Deletion des Exon 8. Diese führte zu einer Leserasterverschiebung hinter der Aminosäureposition 354 dieses *IGHMBP2*-Transkriptes, welches bei Aminosäureposition 364 in ein vorzeitiges Stopp-Kodon mündete. Für die Missense-Mutation c.1334A>C in Exon 9, die der Patient ebenfalls trug, erschien dieses cDNA-Fragment (Δ Ex8) homozygot Wt, während das aufgereinigte, ungekürzte RT-PCR-Produkt beide Allele aufwies. Dies ließ sich nur dadurch erklären, dass die c.1235+3A>G-Mutation nicht ausschließlich zu einer Deletion des Exon 8 führt, sondern auch die Bildung korrekt gespleißter Transkripte zuließ.

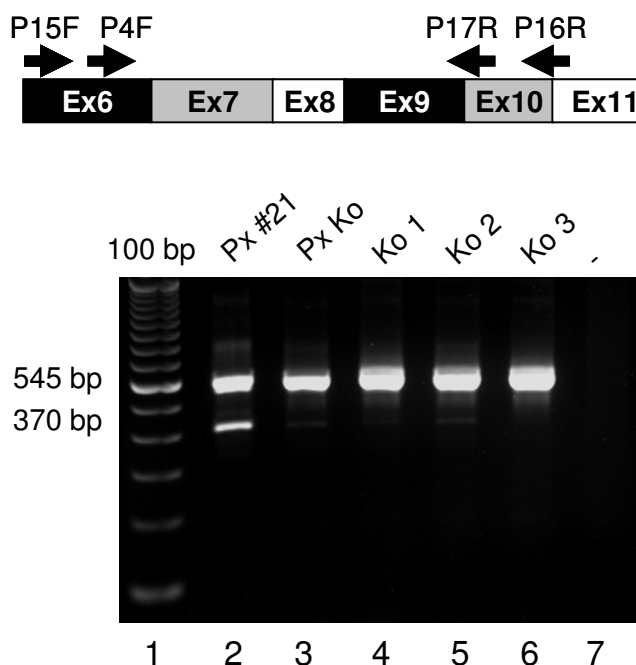


Abbildung 10: RT-PCR-Analyse der Spleißstellenmutation

c.1235+3A>G. Um die Auswirkungen der c.1235+3A>G Mutation zu überprüfen, wurde ein Fragment, das die Exone 6-10 umfasst, mit den Primern P15F und P16R amplifiziert. Aufgrund der geringen Ausbeute wurde mit "nested" Primern P4F und P17R eine Reamplifikation durchgeführt (545 bp). Dabei entdeckte ich ein um Exon 8 verkürztes Fragment (370 bp) in der cDNA des Patienten 21 (Spur 2). Dieses Fragment trägt das Wt-Allel an Position c.1334. Sehr geringe Mengen dieses Spleißproduktes ($0,3\pm 0,9\%$) wurden auch in Kontrollen identifiziert (Spuren 4-6). Ein Kontrollpatient (Px Co), der eine Nonsense-Mutation im *IGHMBP2*-Gen, aber nicht die c.1235+3A>G Spleißstellenmutation trug, hatte etwas reduzierte Mengen *IGHMBP2* mRNA (Spur 3). Die Leerkontrolle (Spur 7) war negativ. Die Position der Primer ist im oberen Teil schematisch abgebildet.

Um abschätzen zu können, wie viel ordnungsgemäß gespleißte *IGHMBP2* mRNA vom Allel mit der c.1235+3A>G-Mutation gebildet wird, habe ich ein sogenanntes „Primer induced restriction assay (PIRA)“ entwickelt (*Abbildung 11*). Der Kunstgriff bei diesem Experiment war, dass bei Vorliegen des c.1334C-Allels durch RT-PCR Amplifikation mit einem fehlerinduzierenden Primer eine XmaI-Schnittstelle geschaffen wurde.

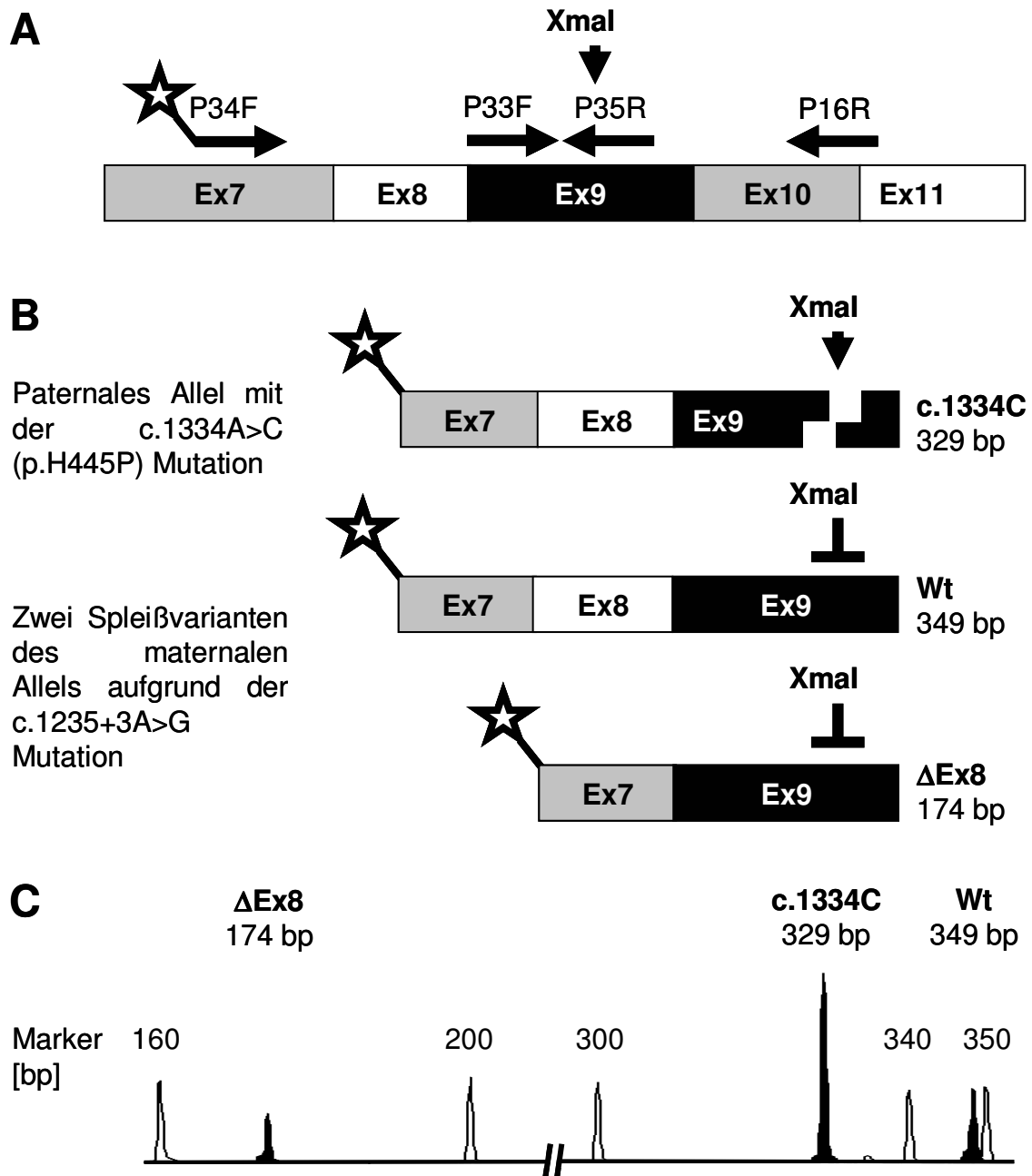


Abbildung 11: PIRA-Assay. (A) Schematischer Teilauszug der *IGHMBP2* cDNA, auf dem die Position der Primer eingetragen ist. Der fluoreszenzmarkierte Primer ist durch einen Stern gekennzeichnet. (B) Die mit den Primern P34F und P35R amplifizierte RT-PCR-Produkte des Patienten #21 können nach Restriktion mit *XmaI* durch ihre Größe unterschieden werden. Die *XmaI*-Schnittstelle wird nur induziert, wenn das mutante Allel (c.1334C) vorliegt. (C) Elektropherogramm zur Quantifizierung der Fragmente mit GeneMarker®-Software.

Dadurch konnte man nach Restriktion mit *XmaI* drei PCR-Fragmente nach ihrer Größe unterscheiden (Abbildung 11). Ihre relative Häufigkeit bestimmte ich nach Auftrennung durch anschließende Kapillargelelektrophorese und Auswertung mit der GeneMarker®-Software: (1) vollständiges Fragment mit Wildtypsequenz: $28,5 \pm 2,4\%$; (2) Deletion des Exons 8 aufgrund der c.1235+3A>G Mutation: $11,8 \pm 2,0\%$ und (3) vollständiges Fragment mit der c.1334A>C (p.H445P) Mutation: $59,7 \pm 1,9\%$. Die

Ergebnisse

Fragmente (1) und (2) stammten vom maternalen Allel, während das Fragment (3) vom paternalen Allel transkribiert wurde.

Um diese relative Mengenverteilung, insbesondere die Menge der Wt-Transkripte, innerhalb des *IGHMBP2*-mRNA-Pools des Patienten #21 mit Kontrollen vergleichen zu können, musste ich die absolute *IGHMBP2*-Transkriptmenge des Patienten mit Hilfe der Real-Time PCR bestimmen. Dafür verwendete ich ein Primerpaar, welches alle Spleißvarianten amplifizierte. Die Ergebnisse der quantitativen PCR wurden auf *UBC* mRNA-Mengen als endogene Kontrolle normalisiert. Die Untersuchung ergab, dass Patient #21 $83,6 \pm 23,8\%$ *IGHMBP2* mRNA im Vergleich zu acht gesunden Kontrollen hatte.

Die Kombination beider Messungen ließ weiter den Schluss zu, dass die Restmenge der durch die c.1235+3A>G-Mutation zugelassenen, korrekt gespleißten Wildtyp-*IGHMBP2*-Transkripte bei $24,4 \pm 6,9\%$ der gesunden Kontrollen lag. Diese Menge reichte offensichtlich nicht aus, die Ausbildung der Erkrankung zu verhindern oder abzumildern.

3.1.4 Southern Blot-Analyse bei putativen SMARD1-Patienten

Eine unbeantwortete Frage der Genetik der SMARD1 waren publizierte Patientenfälle, bei denen nur eine *IGHMBP2*-Mutation durch die standardisierte Sequenzierung der kodierenden Bereiche des *IGHMBP2*-Gens gefunden wurde (Grohmann *et al.*, 2003; Pitt *et al.*, 2003; Maystadt *et al.*, 2004). Deswegen habe ich einen Patienten mit Verdacht auf SMARD1, bei dem zunächst nur eine Mutation auf einem Allel des *IGHMBP2*-Gens identifiziert konnte, auf genomische Veränderungen am *IGHMBP2*-Locus durch Southern Blot Hybridisierung untersucht. In diese Analyse wurden ebenfalls Patienten einbezogen, die einen deutlich mildereren Krankheitsverlauf aufwiesen (siehe 3.1.5).

3.1.4.1 Identifikation der Bruchstelle bei der infantilen Patientin 2#22

Den Krankheitsverlauf der Patientin 2#22 stelle ich nachfolgend nur kurz dar, da er typisch für die SMARD1 ist und im Wesentlichen der in der Einleitung (siehe 1.2.1) gegebenen, ausführlichen Beschreibung folgt.

Die Patientin 2#22 ist das zweite Kind gesunder, nicht-konsanguiner Eltern aus Belgien und hatte ein Geburtsgewicht von 1900 g, was auf eine intrauterine Wachstumsretardierung hinweist. Im Alter von zwei Monaten bemerkte der Kinderarzt eine milde, distale Muskelschwäche. Zwei Monate später entwickelte das

Kind eine lebensbedrohliche Atemnot mit Eventration des rechten Hemidiaphragmas im Röntgenbild des Thorax. Die Patientin benötigte zu dieser Zeit auch eine künstliche Beatmung. Die Muskelschwäche schritt weiter fort, sodass das Kind im Alter von 9 Monaten vollständig gelähmt war (Guenther *et al.*, 2004).

Bei der Patientin 2#22 wurde in einer Vorarbeit der Arbeitsgruppe (Fall 22, Grohmann *et al.*, 2003) nur eine Mutation c.983_987delAAGAA auf einem Allel gefunden. Deshalb setzte ich nun die Southern Blot-Hybridisierung mit einer *IGHMBP2-spezifischen* Sonde ein, um größere genomische Veränderungen aufzudecken, die durch die PCR unerkannt blieben. Dabei identifizierte ich eine abweichende HindIII-Bande von 2,3 kbp Größe (*Abbildung 12*, Spur 4). Die gleichzeitige Verringerung der Signalstärke der 6,3 kbp Bande wies auf eine Deletion von etwa 4 kbp zwischen Intron 8 und Exon 15 hin.

Daraufhin konnte ich auf genomischer Ebene mit den Primern P8F und P14R ein 2,3 kbp großes PCR-Produkt zwischen Exon 9 und Exon 15 amplifizieren, welches die Bruchpunkte enthielt. Die Sequenzierung dieses Fragmentes zeigte überraschenderweise zwei Deletionen und eine Inversion (*Abbildung 13*).

Der 5'-Bruchpunkt flankierte eine Deletion von 1,7 kbp zwischen Intron 10 und 12. Diese Sequenz ging nun „*downstream*“ in Exon 13 über, wo sich am mittleren Bruchpunkt eine Inversion bestehend aus 70 bp des Exon 13 anschloss. Die invertierte Sequenz war am 3' Bruchpunkt an das Intron 14 fusioniert, so dass etwa 2,6 kbp genomische Sequenz zwischen Exon 13 und Intron 14 fehlten.

Ergebnisse

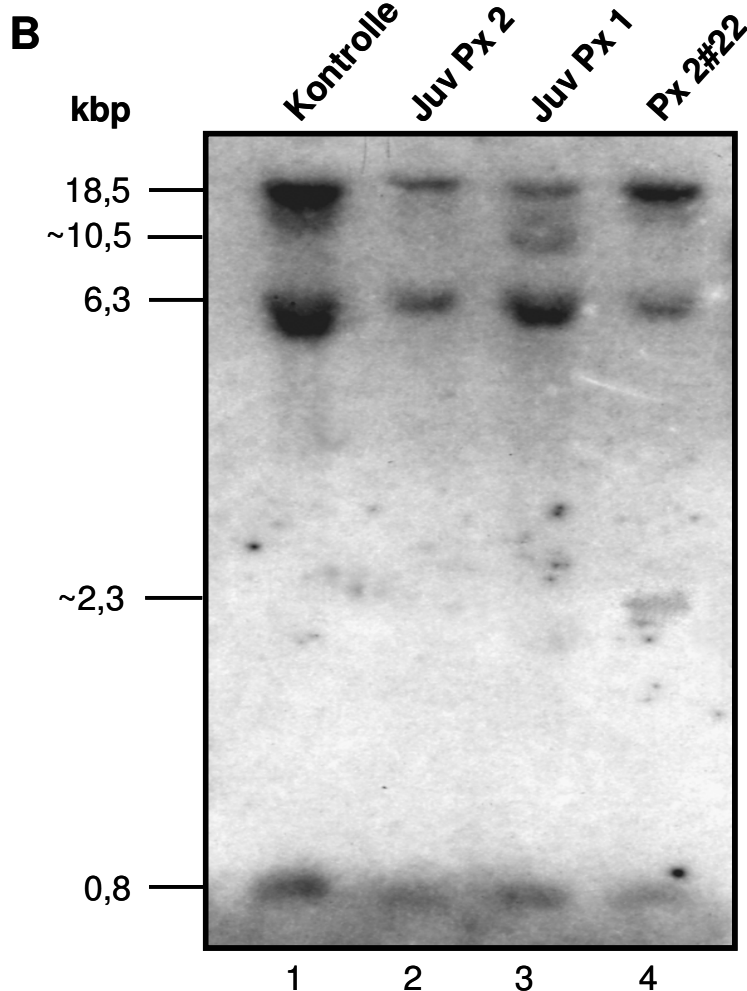
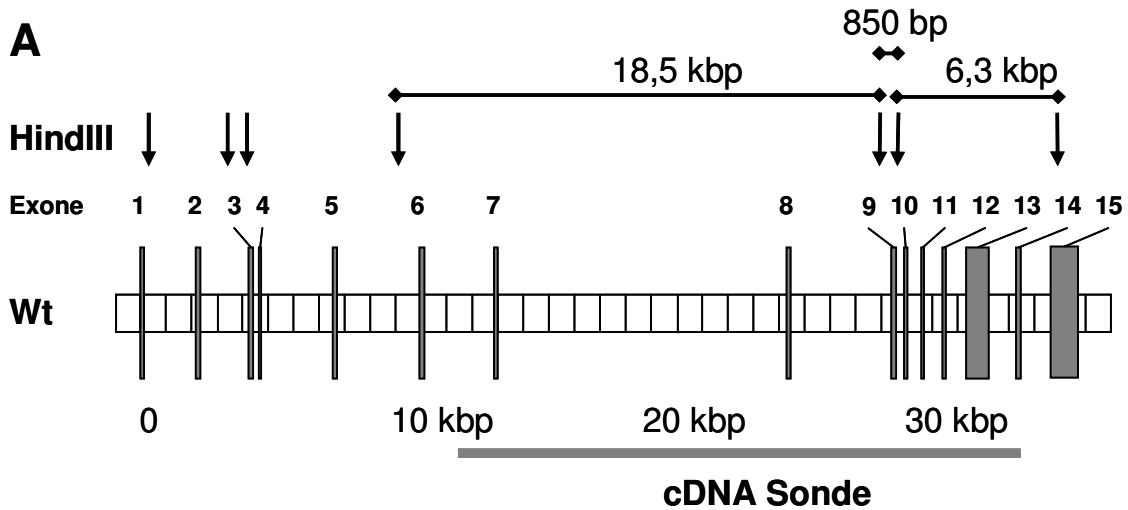


Abbildung 12: Southern Blot-Analyse. A) Maßstabgerechte Darstellung der genomischen Struktur des *IGHMBP2*-Gens. Die Leiter stellt genomische Abstände von 1 kbp (kbp= Kilobasenpaare) dar. Die Exone sind als graue Boxen dargestellt und nummeriert. HindIII-Schnittstellen sind durch Pfeile markiert. Die durch die Sonde erfassten Restriktionsfragmente sind oben dargestellt. **B)** Nach HindIII-Digestion und Hybridisierung mit der cDNA-Sonde erschienen neue Banden von etwa ~10,5 kbp beim juvenilen Patienten 1 (Juv Px 1) und ~2,3 kbp beim Patienten 2#22 (Px 2#22). In der Spur des juvenilen Patienten 2 (Juv Px 2) zeigten sich keine auffälligen Veränderungen gegenüber einer Kontroll-DNA.

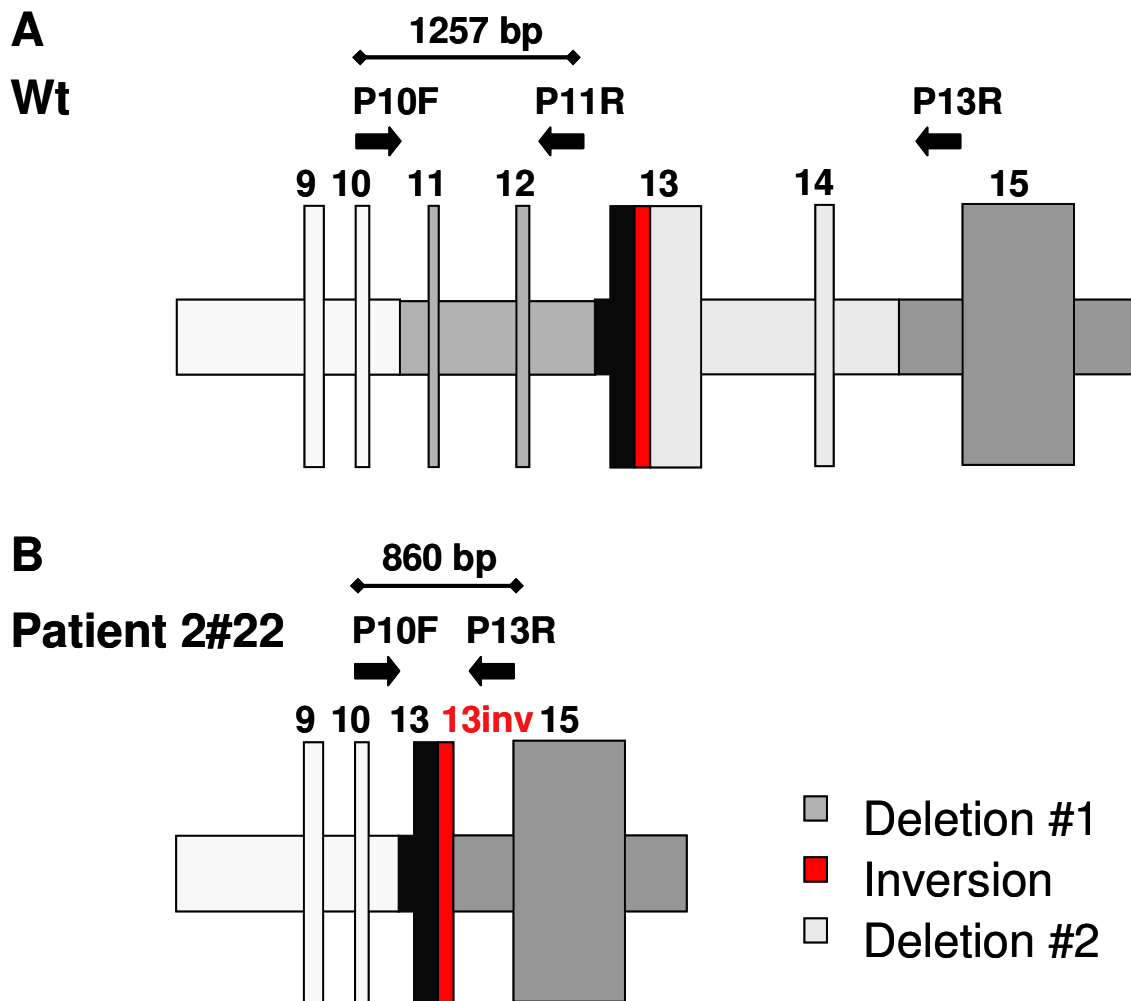


Abbildung 13: Schematische Darstellung des genomischen Rearrangements in Patient 2#22.
A) Wt-Status der DNA. Die Abschnitte des *IGHMBP2*-Genortes, die an den Umlagerungen beteiligt waren, sind farblich gekennzeichnet. Die Position der Primer, die in der Drei-Primer PCR verwendet wurden, sind darüber mit Pfeilen markiert. **B)** Reorganisiertes paternales Allel des Patienten 2#22.

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse habe ich für die Diagnostik eine kompetitive Drei-Primer PCR entwickelt, bei der zwei Primer die Rekombinationsstelle flankieren, während der dritte auf einem durch die Rekombination deletierten Abschnitt hybridisiert. Durch die Deletion können mit drei Primern zwei spezifische PCR-Produkte amplifiziert werden, wie es bei der Indexpatientin und ihrem Vater der Fall war (*Abbildung 14*, Spuren 1 und 2).

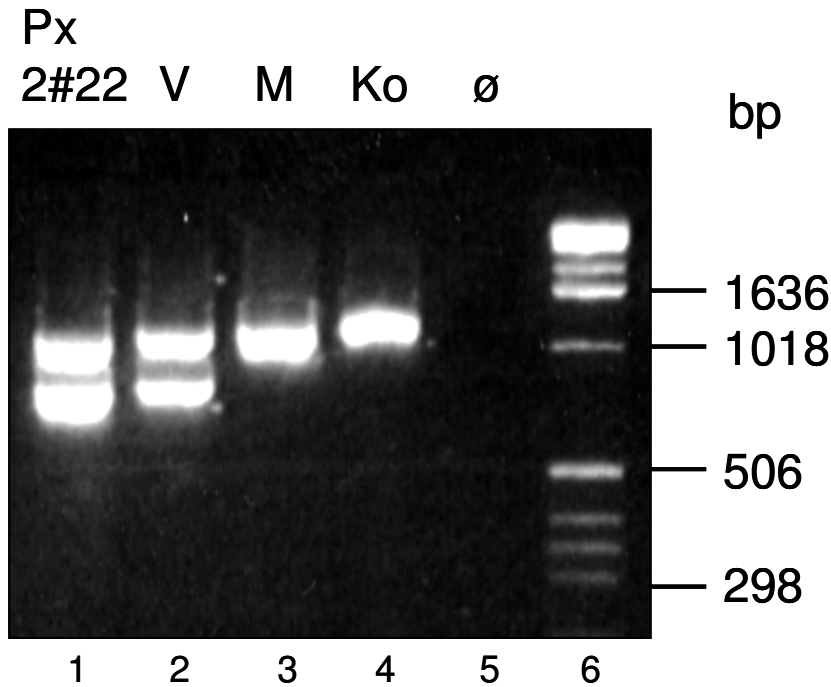


Abbildung 14: **Drei-Primer PCR-Analyse in der Familie der Patientin 2#22.** Das längere 1254 bp-Fragment wurde von Wt-Allelen amplifiziert. Die kürzere 860 bp-Bande stammt von dem mutierten Allel und überspannt die externen Bruchpunkte des genomischen Rearrangements. V=Vater, M=Mutter, Ko=Kontrolle, Ø=Leerkontrolle

Durch Amplifikation und Sequenzierung entsprechender RT-PCR-Produkte habe ich festgestellt, dass die invertierten Basen des Exon 13 eine neue Spleißdonorstelle bilden, so dass Exon 10 an das derangierte Exon 13 und dieses weiter an Exon 15 gespleißt wird. Die dadurch entstandene Leserasterverschiebung führt erst in Exon 15 zu einem Stopp-Kodon, d.h. dass dieses Transkript nicht durch „*nonsense mediated mRNA decay*“ abgebaut werden sollte (Hentze und Kulozik, 1999). Das resultierende Translationsprodukt enthält bis zur Aminosäureposition 515 die Wildtypsequenz, der dann 112 fehlerhafte Aminosäurereste folgen.

Aus dieser Untersuchung ergab sich, dass bei der routinemäßigen Sequenzierung des *IGHMBP2*-Gens größere genomische Umlagerungen übersehen werden können und dass SMARD1-Patienten mit nur einer identifizierten *IGHMBP2*-Genmutation Träger weiterer genomischer Veränderungen am *IGHMBP2*-Genort sein können.

3.1.5 Klinische Variabilität der SMARD1: Charakterisierung von Mutationen in juvenilen SMARD1-Patienten

Dem Institut für Humangenetik und der Klinik für Pädiatrie m. S. Neurologie, Charité Berlin, wurden Proben zweier Patienten mit der Bitte um molekulardiagnostische Untersuchung des *IGHMBP2*-Gens zugesandt, obwohl der Krankheitsverlauf bei

diesen Patienten nicht dem der typischen SMARD1 entsprach. Die Patienten waren keine Säuglinge, d.h. sowohl die die SMARD1 kennzeichnende Atemnot als auch die distal betonte Muskelschwäche traten erst im Alter von 4 bzw. 10 Jahren auf.

Diese Abweichung wird noch einmal besonders deutlich, wenn man die Manifestation der Atemnot (*Abbildung 15*) bzw. allgemein die klinischen Verläufe (Tabelle 38) dieser beiden Patienten mit juvenilem Krankheitsverlauf (im Folgenden Juv Px 1 und Juv Px 2 genannt) den entsprechenden Daten aller am Institut für Humangenetik bisher molekulargenetisch untersuchten SMARD1-Patienten gegenüberstellt.

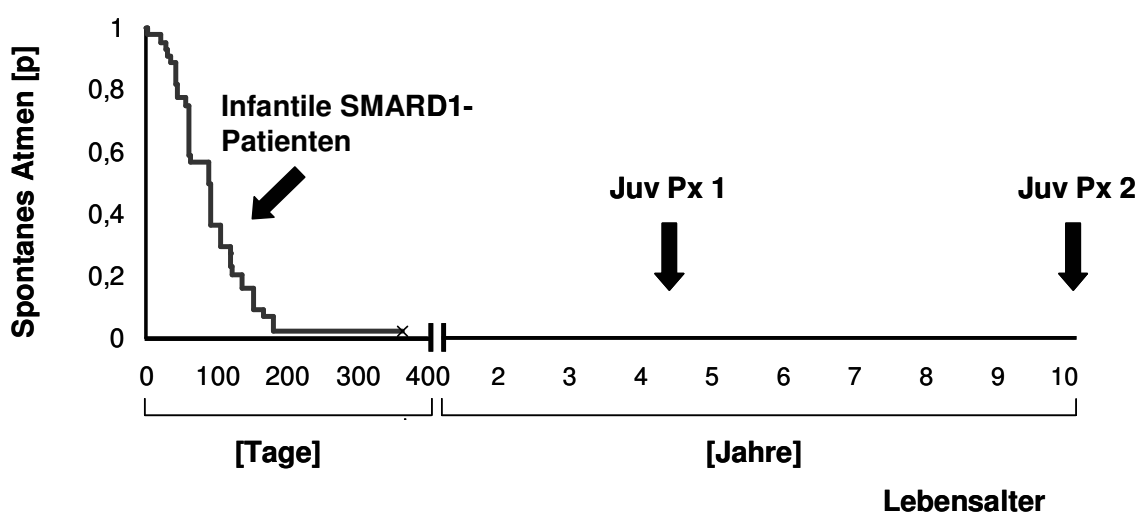


Abbildung 15: Kaplan-Meier-Analyse des selbstständigen Atmens bei infantilen SMARD1-Patienten. Für diese Analyse wurden Daten von Grohmann *et al.* (2004) und dieser Studie kombiniert. Die Pfeile markieren das Manifestationsalter der Atemnot der juvenilen Patienten dieser Studie.

Der Zeitpunkt der Manifestation der Atemnot, der therapeutische Maßnahmen nach sich zog (i.d.R. mechanische Beatmung), wurde in dieser Arbeit als sogenanntes „hartes“ klinisches Kriterium verwendet. Da beide juvenilen Patienten eher einen kontinuierlichen Abfall der Vitalkapazitäten aufwiesen und die behandelnden Ärzte daher andere atmungsunterstützende Maßnahmen ergriffen, (z.B. *Continuous Positive Airway Pressure*) wurde der Beginn der Ateminsuffizienz über den Beginn dieser Maßnahmen definiert.

Bisher sind nur diese beiden Fälle der juvenilen Manifestation der SMARD1 bekannt.

Ergebnisse

Klinische Kriterien	Infantile SMARD1-Patienten (Median)	Juveniler Patient 1 (Juv Px 1)	Juvenile Patientin 2 (Juv Px 2)
Atemnot (Manifestationsalter)	100%* (3 Monate)	4,3 Jahre [§]	10 Jahre ^{§§}
Distal betonte Muskelschwäche (Manifestationsalter)	86%* (4 Monate)	2-3 Jahre [§]	3,5 Jahre ^{§§}
Elevation des Diaphragmas	91%**	Ja	Ja
Multiple kongenitale Kontrakturen	19%**	Nein	Nein
<i>Talipes equinovarus</i>	33%**	Ja	Ja
Allgemeine Muskelschwäche	85%**	Ja	Ja
Frühgeburt	30%**	Nein	Nein
Intrauterine Wachstumsretardation	42%**	Ja	Nein

Tabelle 38: Beschreibung des klinischen Erscheinungsbildes der juvenilen Fälle der SMARD1 und klassischer SMARD1-Patienten. Das Manifestationsalter der Atemnot und des Auftretens der distal betonten Muskelschwäche ist außergewöhnlich spät. * (Grohmann *et al.*, 2003); ** (Guenther *et al.*, 2007a); [§] (Guenther *et al.*, 2004); ^{§§} (Guenther *et al.*, 2007b)

3.1.5.1 Klinische Beschreibung des juvenilen Patienten #1

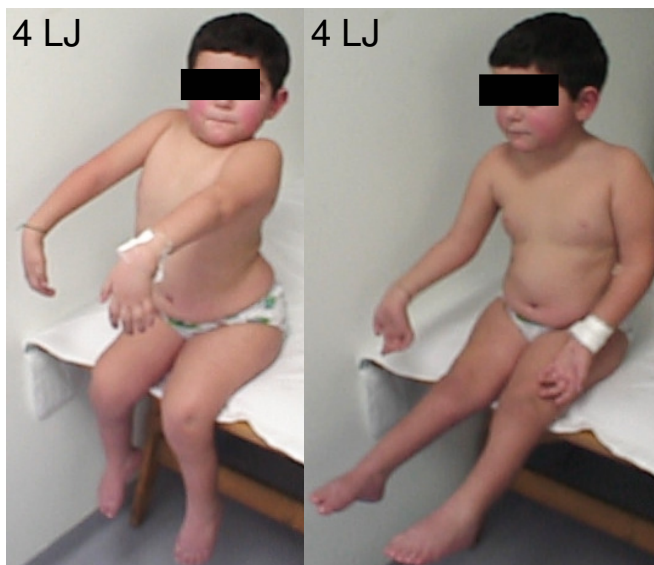


Abbildung 16: Juveniler SMARD1-Patient (Juv Px 1) im Alter von 4 Jahren (4 LJ). Der Patient ist in diesem Alter noch in der Lage, ohne Unterstützung zu sitzen und zeigt keine Schwäche der proximalen Muskelgruppen (Anheben der Extremitäten ist möglich). Die distal betonte Muskelschwäche wird dadurch ersichtlich, dass er die Hände im linken Bild und die Füße im rechten Bild nicht gegen die Schwerkraft anheben kann.

Der Patient ist das einzige Kind gesunder, nicht-konsanguiner Eltern aus Italien. Nach fünf Lebensmonaten ergaben neurologische Untersuchungen eine tibio-peroneale Schwäche; das Kind erlernte dennoch im Alter von 17 Lebensmonaten das Laufen ohne Unterstützung. Mit drei Jahren entwickelte sich eine allgemeine

Muskelschwäche, so dass der Patient die Fähigkeiten, zu laufen und die Arme gegen die Schwerkraft anzuheben, wieder verlor. Später (mit 4,3-4,5 Lebensjahren) manifestierte sich eine milde Ateminsuffizienz, die in der Folgezeit zunahm.

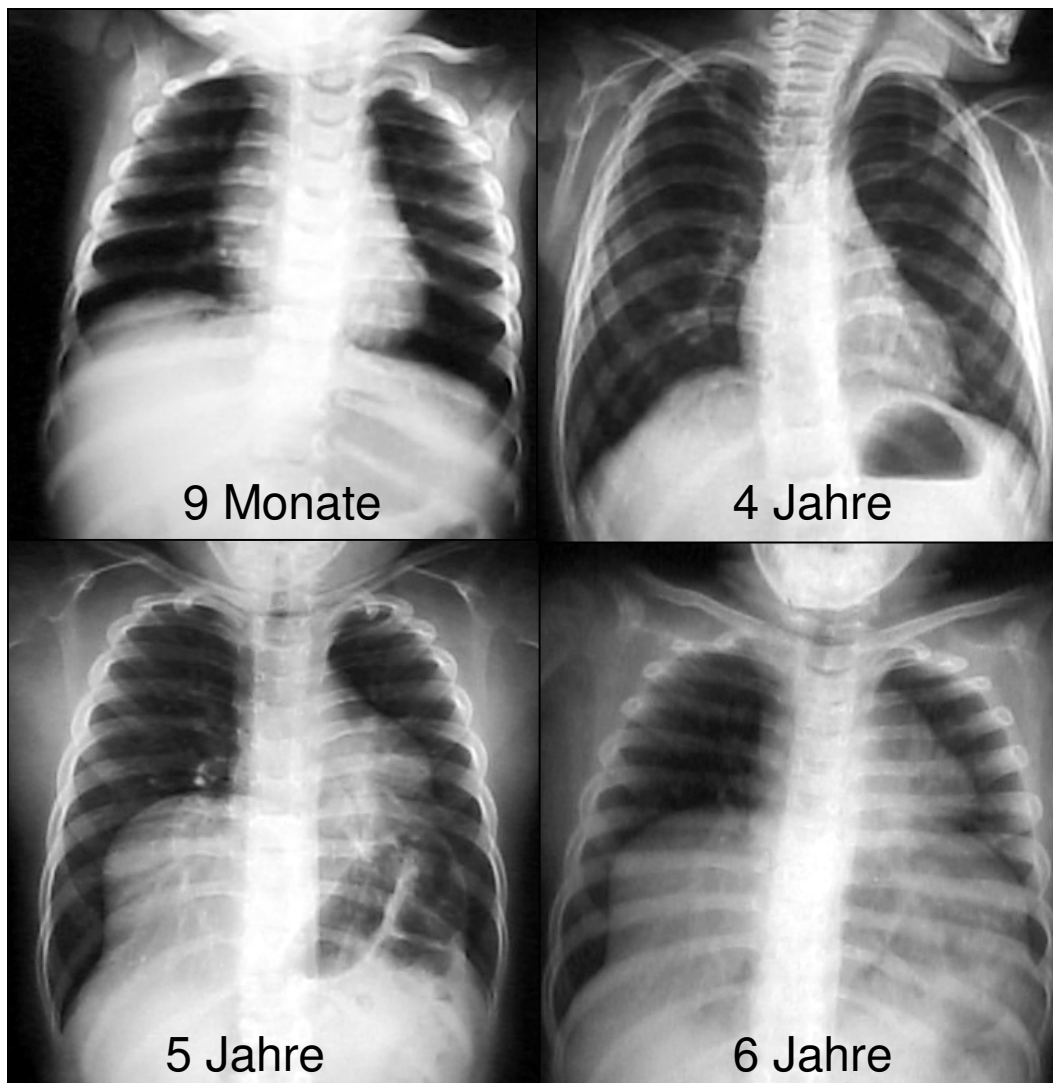


Abbildung 17: Progression der Diaphragmaparalyse und –eventration in Röntgenaufnahmen des Brustkorbes von Patient 1 mit juvenilem Beginn der Atemnot (Juv Px 1).

Dies bestätigten Röntgen-Aufnahmen des Thorax des Patienten 1 mit juvenilem Beginn der Atemnot (Juv Px 1), der im Alter von vier Jahren eine leichte Eventration des rechten Hemidiaphragmas zeigte, welche sich mit fünf Lebensjahren verstärkte und im sechsten Lebensjahr auch die linke Seite betraf (*Abbildung 17*).

3.1.5.2 Identifikation von *IGHMBP2*-Mutationen beim juvenilen Patient #1

Die Amplifikation und Sequenzierung der kodierenden Abschnitte des *IGHMBP2*-Gens ergab, dass der Patient heterozygoter Träger der c.1107C>G (p.F369L)-Mutation in Exon 8 war. Diese maternal vererbte Veränderung, die ein hoch-

Ergebnisse

konserviertes Phenylalanin in ein Leucin umwandelt, wurde weder bei anderen SMARD1-Patienten noch in 200 Kontrollallelen beobachtet (Abbildung 18).

p.F369L

366	E	S	Y	F	D	V	V	<i>H. sapiens</i>
366	E	S	H	F	D	V	V	<i>P. troglodytes</i>
365	E	D	Y	F	D	V	V	<i>M. musculus</i>
282	E	D	Y	F	D	L	V	<i>X. tropicalis</i>
367	N	D	H	F	D	L	V	<i>D. rerio</i>

Abbildung 18: Der Vergleich der orthologen IGHMBP2-Proteinsequenzen um die Position p.F369 des IGHMBP2-Proteins zeigt eine starke evolutionäre Konservierung (grau unterlegt). Die Sequenzen wurden den Datenbanken Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und Ensembl (<http://www.ensembl.org>) mit den folgenden Identifikationsnummern entnommen: NP_002171; P40694; ENSPTRP0000006865; ENSXETP00000043180; ENSDARP00000060290.

Da sich bei der molekulardiagnostischen Untersuchung des *IGHMBP2*-Gens nur eine pathogene Mutation fand, habe ich nun zusätzlich die *IGHMBP2* cDNA des Patienten sequenziert. Dabei zeigte die Sequenzierung eines Segmentes zwischen den Exonen 6 und 13 mit den Primern P4F und P12R jedoch die c.1107C>G (p.F369L) – Mutation im homozygoten Zustand. Da der Patient heterozygot für zwei weitere bekannte Polymorphismen des *IGHMBP2*-Gens in Exon 1 (c.57T>C; p.L19L) und Exon 13 (c.2316C>T, p.S772S) war, nahm ich an, dass die Bindungsstelle des Primers P4F im Exon 6 hemizygot vorlag. Mit einer anschließenden RT-PCR mit den Primern in Exon 1 (P1F) und Exon10/11 (P9R) konnte ich mit der cDNA des Patienten ein abweichendes PCR-Fragment von 750 bp Größe amplifizieren. Die Sequenzanalyse dieses Fragmentes ergab, dass Exon 2 an Exon 8 fusioniert war, welches das Wildtyp-Allel an Position c.1107 aufwies. Die Deletion der Exone 3-7 (p.G86_T353del) führte allerdings nicht zu einer Verschiebung des Leserahmens, d.h. es handelte sich um eine „*in-frame*“-Deletion.

Ergebnisse

Um die Deletionsbruchpunkte auf genomischer Ebene zu identifizieren, habe ich, wie in Abschnitt 3.1.4.1 beschrieben, den *IGHMBP2*-Locus durch Southern Blot-Technik analysiert. Dabei habe ich ein abweichendes HindIII-Fragment von ~10,5 kbp Größe entdeckt (*Abbildung 12B*, Spur 3). In einer PCR mit Primern im Exon 2 (P2F) und Intron 7 (P5R) konnte ich mit der genomischen DNA des Patienten und seines Vaters ein PCR-Produkt von etwa 3 kbp amplifizieren, das die Rekombinationsstelle enthielt. Die Sequenzierung des PCR-Fragmentes ergab, dass sich der Bruchpunkt zwischen zwei Alu-ähnlichen Wiederholungssequenzen der Introne 2 und 7 befand, die 81% Sequenzidentität besaßen. Diese Rekombination führte zu einem Verlust von 18,5 kbp, welcher die Exone 3 bis 7 umfasste. Der Befund auf cDNA-Ebene deckt sich mit diesen Ergebnissen. Abschließend habe ich die Deletion mit einer kompetitiven Drei-Primer PCR bestätigt, die auf genomischer Ebene nur mit der DNA des Patienten Juv Px1 und seines Vaters zwei Fragmente amplifizieren konnte (*Abbildung 20*, Spur 1 bzw. 2). Die Abwesenheit dieser Rekombination habe ich in 100 Kontrollallelen überprüft.

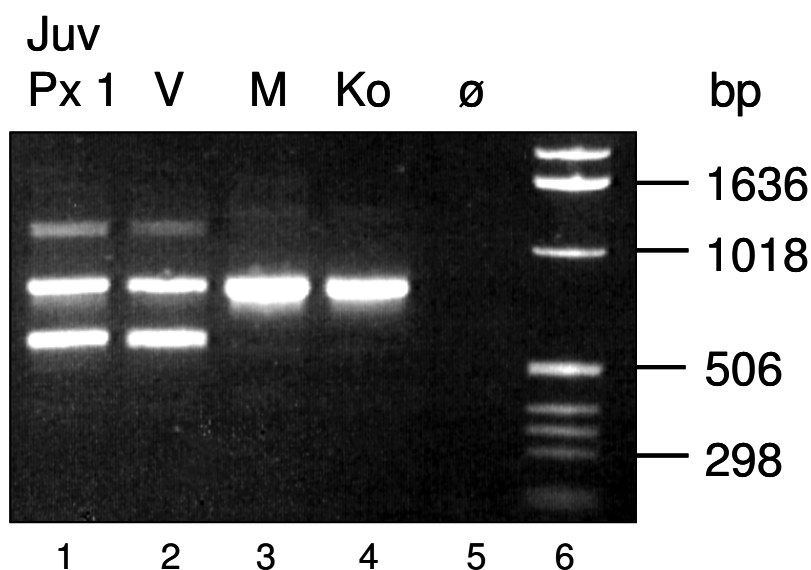


Abbildung 20: Drei-Primer PCR-Analyse in der Familie des Patienten 1 mit juvenilem Beginn der Atemnot (Juv Px 1). Das längere Fragment (815 bp) wurde nur von Wt-Allelen amplifiziert. Die kürzere 595 bp-Bande stammt von dem mutierten Allel und überspannt die Rekombinationsstelle der Deletion. V=Vater, M=Mutter, Ko=Kontrolle, ø=Leerkontrolle

3.1.5.3 Klinische Beschreibung der juvenilen Patientin #2 (Juv Px 2)

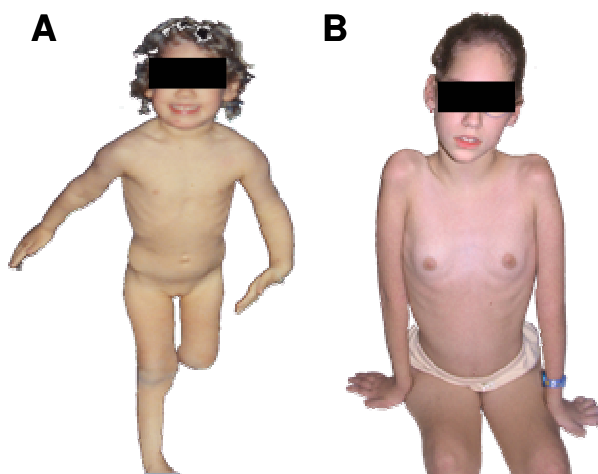


Abbildung 21: Juvenile SMARD1-Patientin (Juv Px 2) im Alter von 3,5 (A) und 12 Jahren (B). Etwa im Alter von 3,5 Jahren zeigt die Patientin eine leicht distale Muskelschwäche und Kontraktionen an den Fingern (links). Sie verlor später die Fähigkeit zu laufen, kann aber im Alter von 12 Jahren ohne ständige mechanische Beatmung leben (rechts).

Die Patientin ist das erste Kind nicht-konsanguiner Eltern aus Deutschland und wurde mit einem Geburtsgewicht von 2700 g geboren.

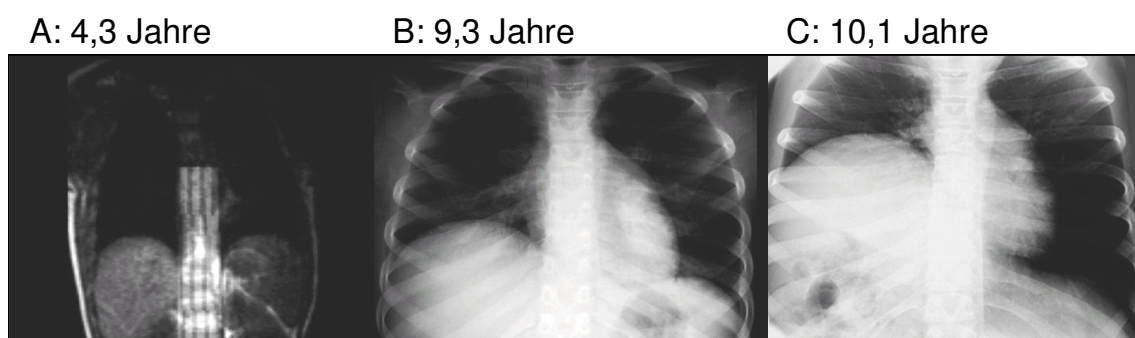


Abbildung 22: Entwicklung des Zwerchfellhochstandes bei der Patientin Juv Px 2. Eine CT-Rekonstruktion des Thorax zeigt noch keine Eventration des Diaphragmas im Alter von 4,3 Jahren (A). Erst mit 9,3 Jahren zeigen Röntgenbilder einen Hochstand des rechten Hemidiaphragmas (B), der sich in Folge weiter fortgeschreitet (C).

Die Patientin erlernte mit 12 Monaten das Laufen, hatte jedoch später Probleme, sich aus der Rückenlage zu erheben und stolperte oft. Im Alter von 3,5 Jahren entwickelte sich bei der Patientin eine distale, progrediente Muskelschwäche und es traten milde Kontraktionen an Arm- und Ellbogengelenken auf. Bis zu diesem Zeitpunkt konnte sie ohne Hilfe laufen, wurde mit vier Jahren rollstuhl-abhängig. Im Alter von 10 Jahren verschlechterten sich die respiratorischen Funktionen, was durch eine Lähmung des

Ergebnisse

Zwerchfells hervorgerufen wurde, die zu einer Eventration des Diaphragmas führte (Abbildung 22).

3.1.5.4 IGHMBP2-Mutationen in einem zweiten Fall mit juvenilem Beginn der SMARD1 (Juv Px 2).

Zunächst habe ich eine molekulargenetische Untersuchung der kodierenden Abschnitte des *IGHMBP2*-Gens durchgeführt. Dabei ergab sich, dass die Patientin (Juv Px 2) Trägerin zweier pathogener, heterozygoter Mutationen in den Exonen 8 (c.1082T>C, p.L361P) und 10 (c.1478T>C, p.T493I) war.

Beide Veränderungen waren bereits als krankheitsverursachende Mutationen bei anderen SMARD1-Patienten bekannt. Die vom Vater vererbte Mutation (c.1082T>C) wurde bereits in vier Fällen (Grohmann *et al.*, 2003; Pitt *et al.*, 2003) und die von der Mutter vererbte Mutation (c.1478T>C) in einem weiteren SMARD1-Fall mit infantilem Erkrankungsbeginn beschrieben (Guenther *et al.*, 2007b).

Ich habe anschließend die gesamte cDNA und die proximale Promoterregion (~ -1000 bp) sequenziert, um die Möglichkeit auszuschließen, dass die Patientin eine dritte Veränderung im Bereich des *IGHMBP2*-Gens trug, welche in der Lage gewesen wäre, den Krankheitsverlauf abzumildern. Auch die Überprüfung der genomischen Integrität des *IGHMBP2*-Genortes mittels Southern Blot zeigte keine Auffälligkeiten (Abbildung 12B; Spur 2).

Dieser zweite Fall einer SMARD1 mit juvenilem Beginn der Erkrankungen bestätigte die Hypothese, dass der Krankheitsverlauf von SMARD1 unter bestimmten Bedingungen variabel sein kann.

3.1.6 Vergleich der IGHMBP2-Proteinmengen zwischen SMARD1-Patienten mit infantiler und mit juveniler Manifestation der Erkrankung

Die Entdeckung, dass eine SMARD1-Patientin mit juvenilem Krankheitsbeginn die gleichen Veränderungen im *IGHMBP2*-Gen (allerdings in neuer Kombination) wie SMARD1-Patienten mit infantilem Krankheitsverlauf aufwies, warf weiter die Frage auf, worin bei gleicher Genetik die Unterschiede zwischen beiden Patientengruppen liegen.

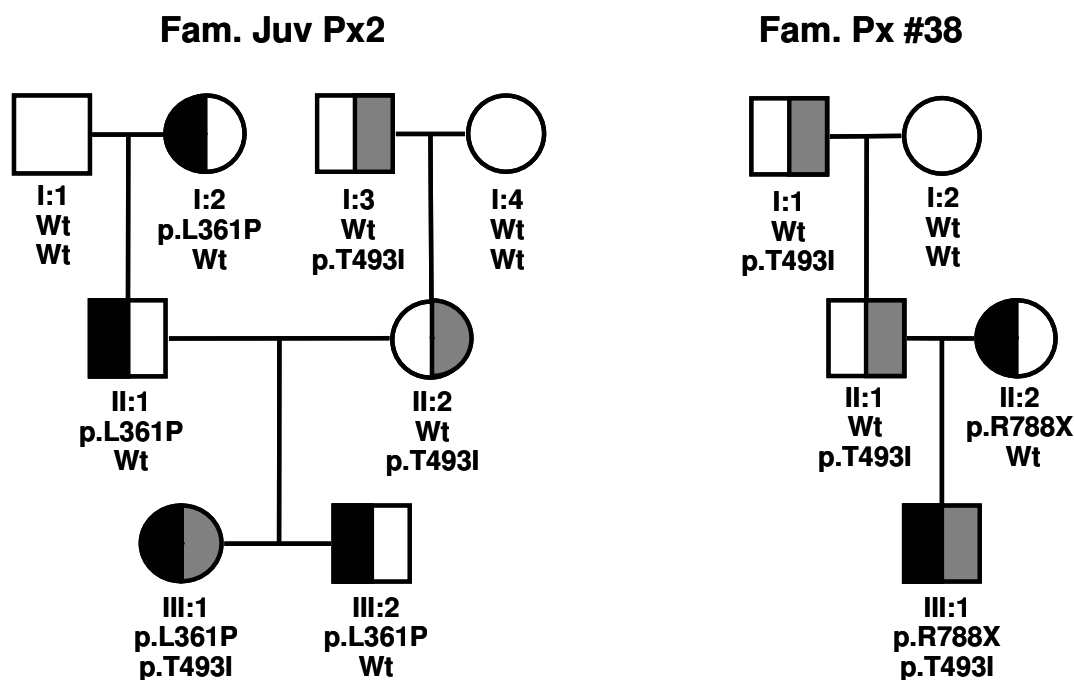


Abbildung 23: Stammbäume der Familien der Patientin 2 mit juvenilem Beginn der Atemnot (Juv Px2) und des infantilen Patienten #38. Die Segregation der IGHMBP2-Mutationen ist angegeben.

Als erstes wurden die „steady state“-Mengen an IGHMBP2-Protein in lymphoblastoiden Zelllinien verschiedener SMARD1-Patienten mit infantilem und juvenilem Verlauf bzw. deren Eltern verglichen. Dazu wurden Zelllinien aus der Familie des Patienten #38 mit infantiler SMARD1 ausgesucht und kultiviert, weil dieser Träger der p.T493I (c.1478T>C) Missense-Mutation war, die bei der Patientin Juv Px 2 gefunden wurde (Abbildung 23). Weiterhin wurden Zelllinien von zwei „klassischen“ SMARD1-Patienten mit infantilem Beginn der Atemnot verwendet, die bereits an anderer Stelle beschrieben wurden (Grohmann *et al.*, 2003; Guenther *et al.*, 2004). Ich habe Zellextrakte generiert und durch Western Blot-Methodik mit zwei verschiedenen Anti-IGHMBP2-Seren analysiert (Abbildung 24). Der IGHMBP2-Gehalt der Zellextrakte wurde als das Verhältnis von IGHMBP2 zur endogenen Ladekontrolle β -Tubulin dargestellt und auf drei gesunde Kontrollen normalisiert. Dabei zeigte sich ein signifikanter Unterschied (Whitney-Mann-Test, $p < 0.005$) in der „steady state“-IGHMBP2-Menge zwischen SMARD1-Patienten mit infantiler ($12 \pm 10\%$; $n=3$) und mit juveniler Manifestation der Atemnot ($33 \pm 13\%$; $n=2$).

Ergebnisse

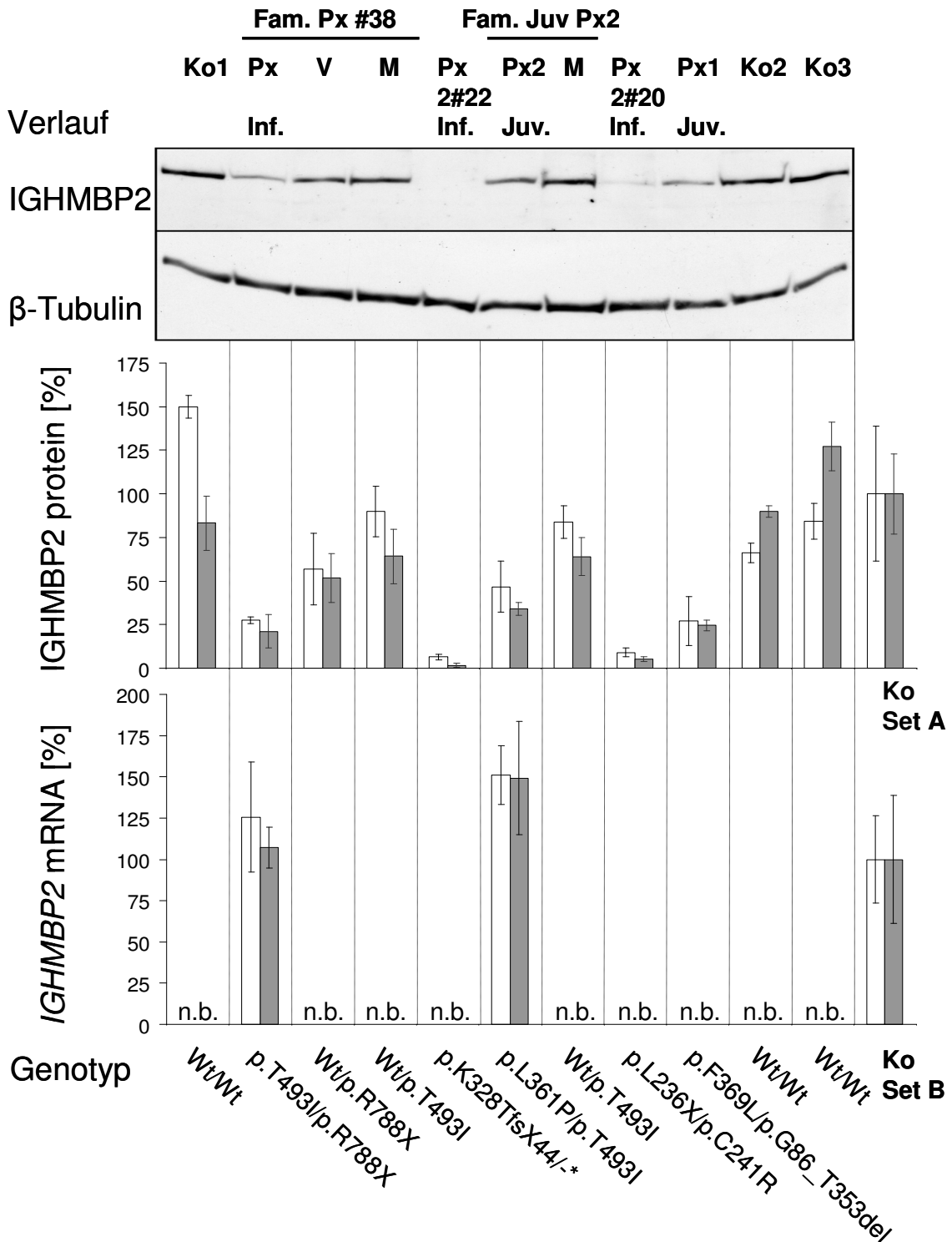


Abbildung 24: Analyse der IGHMBP2-Proteinmengen in LCLs von SMARD1-Patienten mit infantilem und juvenilem Verlauf. Oberer Teil: Proteinextrakte aus LCLs von Kontrollen (Ko1, Ko2, Ko3), des Patienten #38 und seiner Eltern (V=Vater; M=Mutter), Juv Px 2 und ihrer Mutter (M), zweier infantiler

SMARD1-Patienten (Px 2#22, Px 2#20) und des Juv Px 1 wurden aufgetragen, geblottet und durch zwei Antiseren (K14B und 481) detektiert. Ein anti- β -Tubulin Antikörper wurde als Ladekontrolle eingesetzt. **Mittlerer Teil:** Densitometrische Quantifizierung der Signale aus drei Wiederholungen mit den anti-IGHMBP2-Antikörpern K14B (weiße Balken) and 481 (graue Balken). **Unterer Teil:** IGHMBP2 mRNA Niveaus wurden in zwei Versuchsreihen bestimmt und sind als das Verhältnis von IGHMBP2 zu zwei "Haushalts"-Genen dargestellt: HPRT (weiße Balken) and UBC (graue Balken). Die IGHMBP2-Genotypen sind darunter dargestellt (*=komplexes genomisches Rearrangement, s.a. 3.1.4.1). "Ko Set A" bzw. "Ko Set B" stehen für alle verwendeten Kontrollen in der Proteinmengenbestimmung (Set A) bzw. mRNA-Quantifizierung (Set B). Dabei ist zu beachten, dass für die Bestimmung der Proteinmengen im Western Blot andere Kontrollen benutzt wurden als für die Bestimmung der mRNA-Mengen. Die Balken repräsentieren den Mittelwert und die Fehlerbalken die Standardabweichung jeder Bestimmung.

Des Weiteren fiel auf, dass die Elternteile, die Träger der p.T493I Mutation waren, 75% IGHMBP2/ β -Tubulin-Protein im Vergleich zu Kontrollen aufwiesen. Dies ließ den Rückschluss zu, dass die p.T493I-Mutation zu einer 50%igen Reduktion der „steady state“-Menge an IGHMBP2-Protein gegenüber dem Wildtyp-IGHMBP2 führt. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis hatte der Patient #38 eine Restmenge von ca. 25% IGHMBP2-Protein im Vergleich zu mit Kontrollen. Der Patient trug neben der p.T493I-Mutation noch eine Nonsense-Mutation auf dem anderen Allel, die die Synthese von IGHMBP2-Protein von diesem Allel unterdrücken sollte.

Um auszuschließen, dass diese Mutation schon auf mRNA-Ebene wirkt, habe ich die IGHMBP2-mRNA Menge mittels quantitativer Real-Time PCR bestimmt (s. Abschnitt 2.3.2.8). Die Analyse ergab bei beiden Patienten keine Reduktion der IGHMBP2-Transkriptmengen, so dass ich davon ausgehen konnte, dass die p.T493I-Mutationen auf der Proteinebene Effekte erzielt, z.B. durch eine veränderte Faltungskinetik oder eine verringerte Halbwertszeit des Proteins *in vivo*.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen deuten daher auf eine zweite klinische, juvenile Verlaufsform der SMARD1 mit IGHMBP2-Mutationen hin, die das klinische Spektrum der SMARD1 erweitert und durch relativ hohe IGHMBP2-Restmengen gekennzeichnet ist.

3.2 Biochemische Untersuchungen zur SMARD1

Bei genauer Betrachtung der erarbeiteten und publizierten genetischen Daten stellte ich fest, dass alle SMARD1 verursachenden Missense-Mutationen tatsächlich in der Helikasedomäne des Proteins lokalisiert waren. Deswegen vermutete ich, dass SMARD1 eine direkte Folge des Verlustes der Helikasefunktion des IGHMBP2 ist. Um diese Hypothese zu überprüfen, habe ich Wildtyp-IGHMBP2 und mutantes IGHMBP2

Ergebnisse

rekombinant hergestellt und die enzymatische Aktivität in verschiedenen biochemischen Tests untersucht.

3.2.1 *In vitro*-Mutagenese

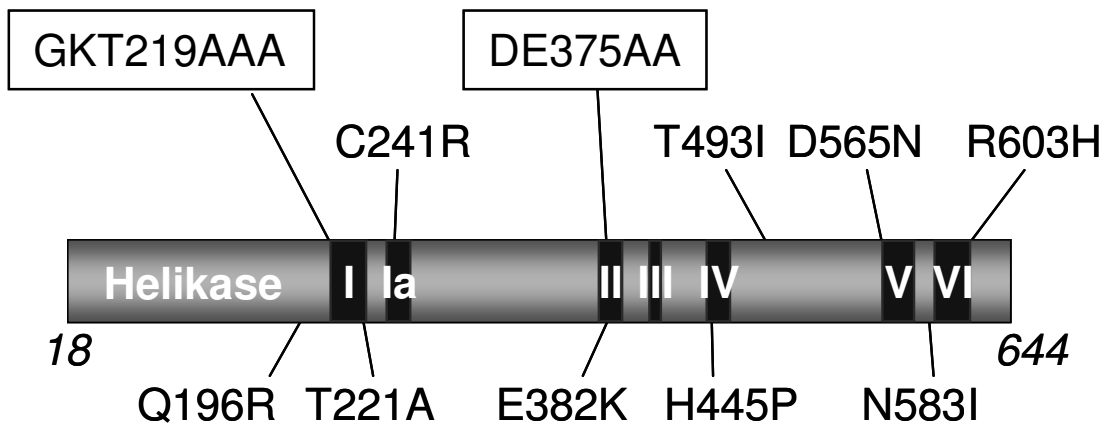


Abbildung 25: Lage der untersuchten SMARD1-verursachenden Aminosäuresubstitutionen in der Helikasedomäne von IGHMBP2. Die Lage der klassischen Helikasemotive (schwarze Kästchen) sowie der veränderten Aminosäuren (Pfeile) sind dargestellt. Die Kontrollmutanten im Walker A- und Walker B-Motiv sind durch Rahmen markiert (Walker A-Motiv entspricht Helikasemotiv I und Walker B-Motiv entspricht Helikasemotiv II). Die Grenzen der Helikasedomäne in der Primärsequenz des Proteins sind darunter kursiv angegeben.

Für diese Studie wurden neun SMARD1-bezogene Missense-Mutationen ausgewählt, die über die gesamte Helikasedomäne verteilt sind. Hinzu kamen zwei Kontrollsubstitutionen in den Motiven I und II, die den Walker A- und Walker B-Motiven klassischer ATPasen entsprechen (*Abbildung 25*, s.a. 2.3.2.11).

3.2.2 Proteinexpression

Die mit dem pGEX-IGHMBP2-6xHis-Vektor transformierten *E. coli* Rosetta-gami™-Zellen wurden (s. 2.3.4.5) in 5 Liter SuperBroth-Medium kultiviert, die Proteinexpression wurde induziert und nachfolgend IGHMBP2 durch eine Tandemaffinitätschromatographie aufgereinigt. *Abbildung 26* illustriert die einzelnen Schritte der Proteinexpression und -aufreinigung, die in einem 10%igen SDS-PAGE analysiert wurden.

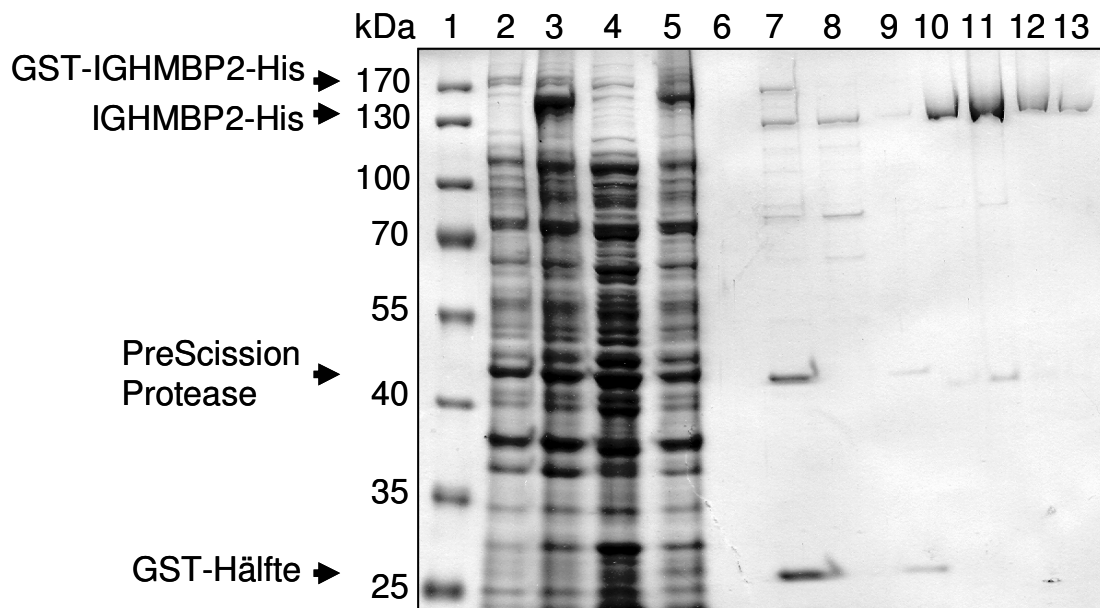


Abbildung 26: Proteinaufreinigung des IGHMBP2. Von jedem Schritt der Aufreinigung wurde eine Probe entnommen und in einem 10% SDS-PAGE aufgetrennt. Spur 1= Protein-Marker, Spur 2= vor Induktion, Spur 3= nach Induktion, Spur 4= Überstand nach Lyse und Ultrazentrifugation, Spur 5= Pellet nach Lyse und Ultrazentrifugation, Spur 6= Überstand nach PreScission-Inkubation, Spur 7= Gluthation-Sepharose nach PreScission-Inkubation, Spur 8= Durchfluß an der Ni-NTA-Säule, Spur 9= Ni-NTA-Säule nach Elution, Spuren 10-13= Elutionsfraktionen 1-4

Die beobachtete elektrophoretische Mobilität des gereinigten Proteins lag etwa in der Größenordnung der erwarteten molekularen Masse der Proteinkonstrukte von 112,2 kDa. Aus 5 Liter Kulturvolumen bzw. etwa 15-20 g Bakterienpellet nach Induktion konnte ich je nach Konstrukt zwischen 4,25 µg (C241R) und 75 µg (Wt) gereinigtes Protein gewinnen.

Vermutlich befindet sich der Hauptteil der induzierten Proteinmenge in unlöslicher Form (*Abbildung 26*, Spur 5) in den sogenannten „Einschlusskörperchen“ in *E. coli* und steht somit der weiteren Aufreinigung nativ gefalteten Proteins nicht zur Verfügung. Nach erfolgreicher Induktion, Lyse und Ultrazentrifugation waren nur geringe Mengen an induziertem IGHMBP2 im löslichen Überstand wiederzufinden (*Abbildung 26*, Spur 4). Um zu überprüfen, ob die bestimmten Konzentrationen der einzelnen Proteinvarianten tatsächlich vergleichbar waren, habe ich 200 ng jeder Proteinvariante durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Banden durch Silberfärbung sichtbar gemacht. In *Abbildung 27* findet man bestätigt, dass etwa die gleichen Mengen an Protein geladen wurden. Die insbesondere bei den C241R und Q196R-Mutanten aufgetretenen Nebenbanden von etwa 37 kDa Größe stellen C-terminale Degradationsfragmente des IGHMBP2-Proteins

Ergebnisse

dar. Dies wurde durch massenspektrometrische Bestimmung der ausgeschnittenen Banden bestätigt, die die AG Klose und Fr. S. Techritz am Institut für Humangenetik der Charité Berlin vornahmen.

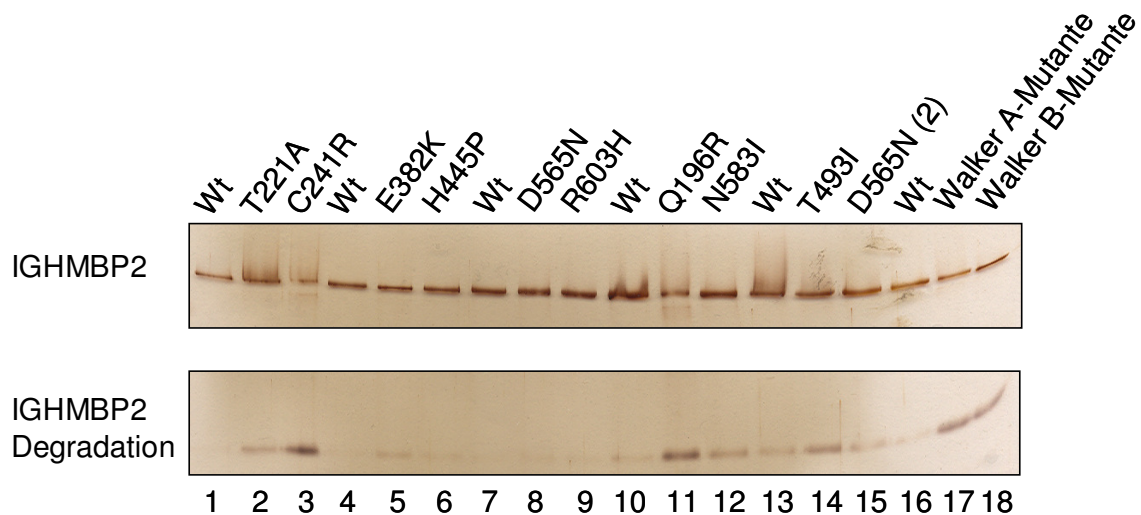


Abbildung 27: Ladekontrolle der eingesetzten Proteinpräparationen. 200 ng Protein jeder Proteinpräparation wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Um Fehler bei der Aufreinigung zu erkennen, wurden an jedem Präparationstag zwei Mutanten zusammen mit einer Wt-IGHMBP2-Expression als Positivkontrolle aufgearbeitet. Die Aufreinigung der Kontrollmutanten (Spuren 17 und 18) sowie die Mutanten C241R (Spur 4) und Q196R (Spur 11) zeigten deutlich das Auftreten von IGHMBP2-Degradationsprodukten (unteres Bild).

3.2.3 Charakterisierung der enzymatischen Aktivität des Wildtyp-IGHMBP2-Proteins

3.2.3.1 Untersuchung des Nukleinsäure-Bindungsverhalten

Bisher wurde IGHMBP2 nur als DNA-bindendes Protein charakterisiert werden (Molnar *et al.*, 1997; Biswas *et al.*, 2001). Da die Aminosäuresequenz von IGHMBP2 mehrere nukleinsäurebindende Domänen aufweist, die auch potenziell RNA binden könnten, habe ich zunächst die RNA-Bindung in „*Electrophoretic mobility shift assays (EMSA)*“ untersucht und mit IGHMBP2-Varianten, die Mutationen in der Helikasedomäne enthielten, kontrolliert (Abbildung 28). Tatsächlich wurde mit steigender IGHMBP2-Konzentration mehr RNA gebunden (Abbildung 28A, Spuren 2-5). Eine Kontrollmutante, die unter den gleichen Bedingungen inkubiert worden war, bildete keine RNA-Protein-Komplexe aus. Das Auftreten mehrerer Banden im RNA-Bindungstest hatte seinen Grund höchstwahrscheinlich darin, dass an das relativ lange RNA-Substrat mehr als ein

Proteinmolekül band. Dieser Versuch wurde ebenfalls mit einzelsträngiger DNA durchgeführt, wobei ich zu ähnlichen Ergebnissen kam (*Abbildung 28B*). Zwei IGHMBP2-Mutanten haben keine Affinität zu Nucleinsäuren, was den Rückschluss zulässt, dass es sich bei den beobachteten Protein-Nucleinsäure-Komplexen um IGHMBP2-Nucleinsäure-Komplexe handelt.

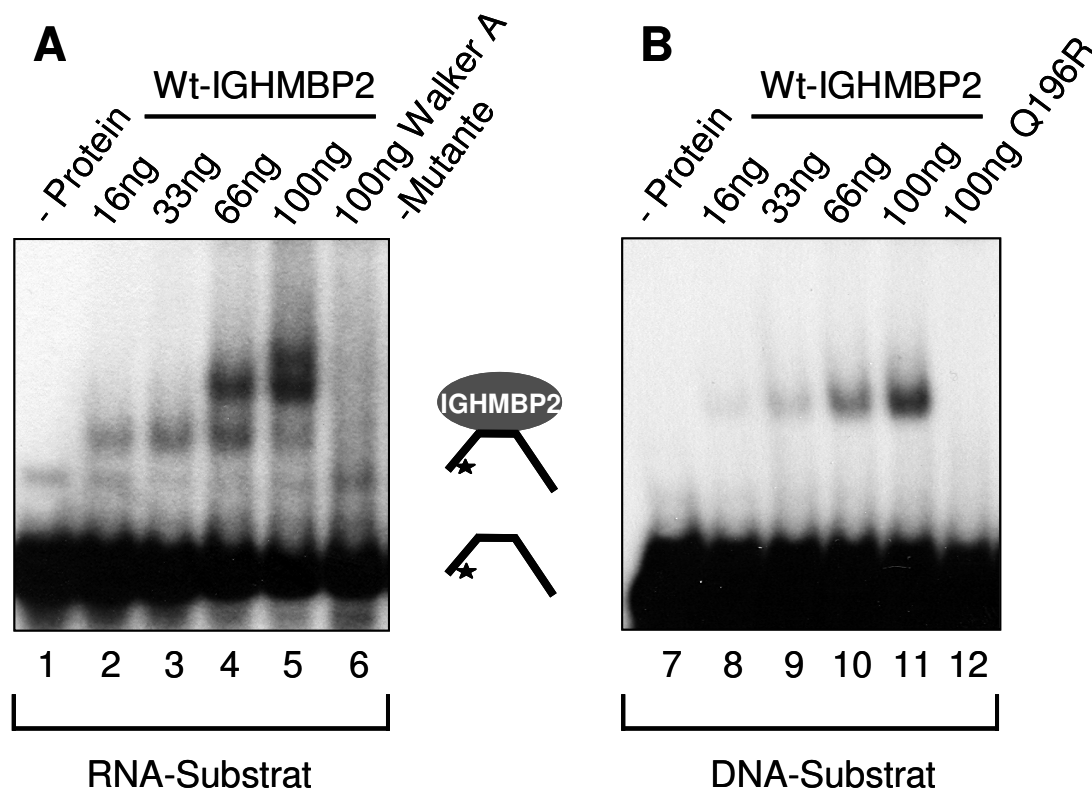


Abbildung 28: Analyse der Nucleinsäurebindung von IGHMBP2 mit der EMSA-Methode. Steigende Mengen an Wt-IGHMBP2 wurden mit 25 fmol einzelsträngiger RNA (A) oder DNA (B) inkubiert und die Reaktionsprodukte anschließend durch native PAGE aufgetrennt. Die Laufhöhe der einzelsträngigen Substrate und der RNA/DNA:IGHMBP2-Komplexe sind schematisch in der Mitte dargestellt. Die Mutanten bildeten keine Komplexe aus.

Vergleicht man die relativen Mengen der freien und an IGHMBP2 gebundenen Nucleinsäuren in *Abbildung 28*, so erscheint eine leichte Präferenz für RNA-Substrate vorzuliegen. Dies ließ sich aber in Versuchen, in denen RNA- und DNA-Moleküle gleicher Länge und Sequenz benutzt wurden, nicht bestätigen (Versuch nicht gezeigt).

3.2.3.2 Untersuchung der NTPase Aktivität

Nachdem ich die RNA-Bindung durch IGHMBP2 nachgewiesen hatte, habe ich die ATPase-Aktivität des IGHMBP2 in Anwesenheit von entweder DNA, verschiedenen

Ergebnisse

Polyribonukleotiden oder in Abwesenheit von Nucleinsäuren überprüft. Das rekombinante Protein wurde dazu mit α - ^{32}P -markiertem ATP inkubiert und die Reaktionsprodukte 60 min später durch Dünnschichtchromatographie aufgetrennt.

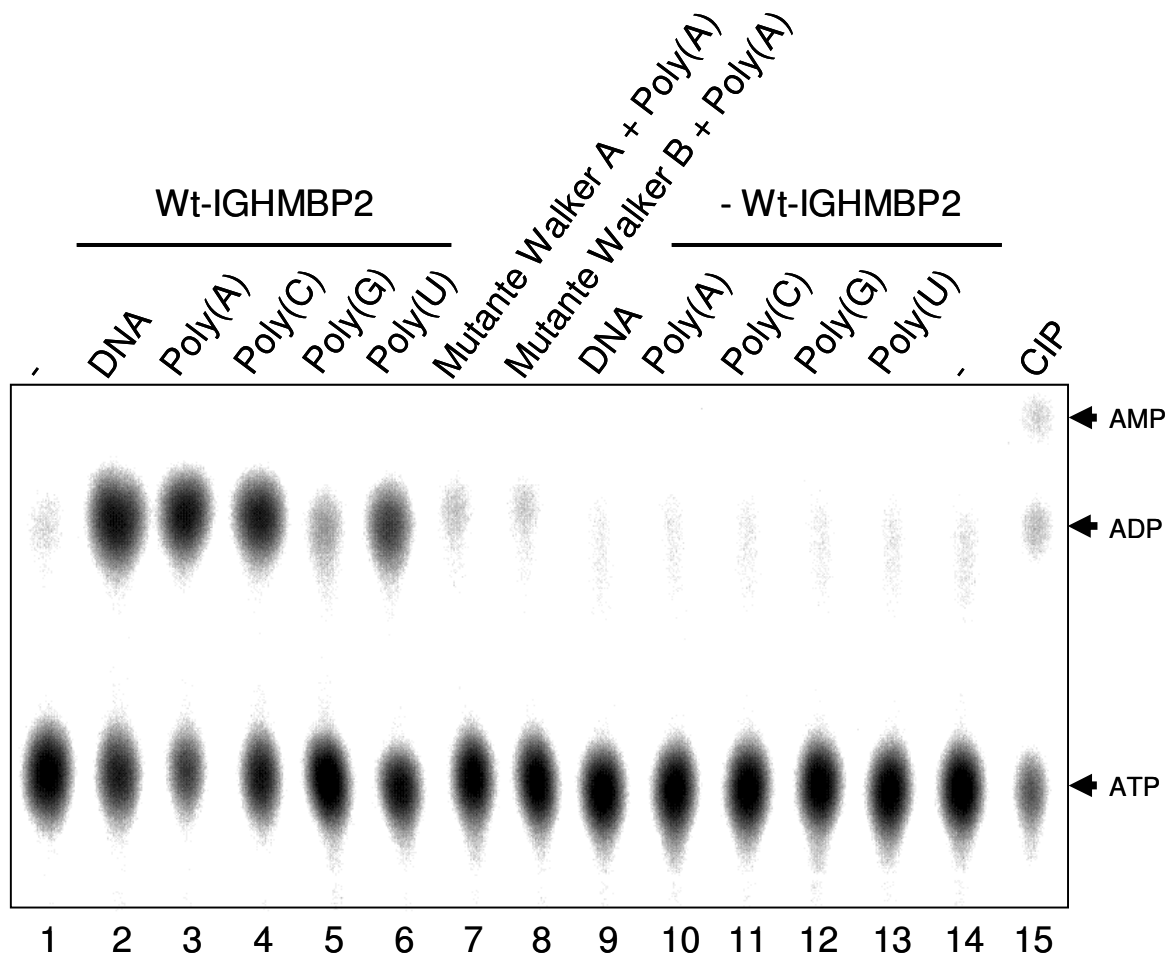


Abbildung 29: Analyse der Stimulation der ATPase-Aktivität des Wt-IGHMBP2 mittels dünnschichtchromatografischer Trennung der Hydrolyseprodukte. 100 ng Wt-IGHMBP2 wurden in Abwesenheit (Spuren 1 und 14) oder in Anwesenheit von 0,1 mg/ml verschiedener Nucleinsäuren (Spuren 2-6 und 9-13) stimuliert. Die Kontrollmutanten (Walker A und Walker B; Spuren 6 und 7) dienten als Negativkontrolle, die Spuren ohne Protein als Leerkontrollen. Um die Hydrolyseprodukte korrekt zu identifizieren, wurde ein Standardreaktionsansatz (ohne IGHMBP2) mit *Calf Intestinal Phosphatase* (CIP) inkubiert und aufgetragen (Spur 15).

Wie in *Abbildung 29* im Auftreten radioaktiv markierten ADPs und der gleichzeitigen Abnahme des ATP-Signals zu erkennen ist, katalysiert IGHMBP2 die ATP-Hydrolyse. Die ATPase-Aktivität wurde *in vitro* durch Zugabe von doppelsträngiger DNA oder von RNA-Homopolymeren Poly(A), Poly(C) and Poly(U) (*Abbildung 29*, Spuren 2, 3, 4 und 6) stark stimuliert (siehe auch *Abbildung 30*: etwa 80fach). Dies kann als indirekter Nachweis der

Bindung von RNA und DNA an das Protein gewertet werden. Nur Poly(G) (*Abbildung 29*, Spur 5) war ein ineffizientes Stimulans. Zwei Kontrollmutanten mit Substitutionen katalytisch aktiver Reste in der Walker A bzw. Walker B-Region dienten als Negativkontrolle und zeigten kaum mehr ATPase-Aktivität als diverse Leerkontrollen (*Abbildung 29*, Spuren 7, 8 und 9-14). Damit konnte ich bestätigen, dass die aufgereinigten Proteinpräparationen frei von kontaminierenden aktiven ATPasen waren.

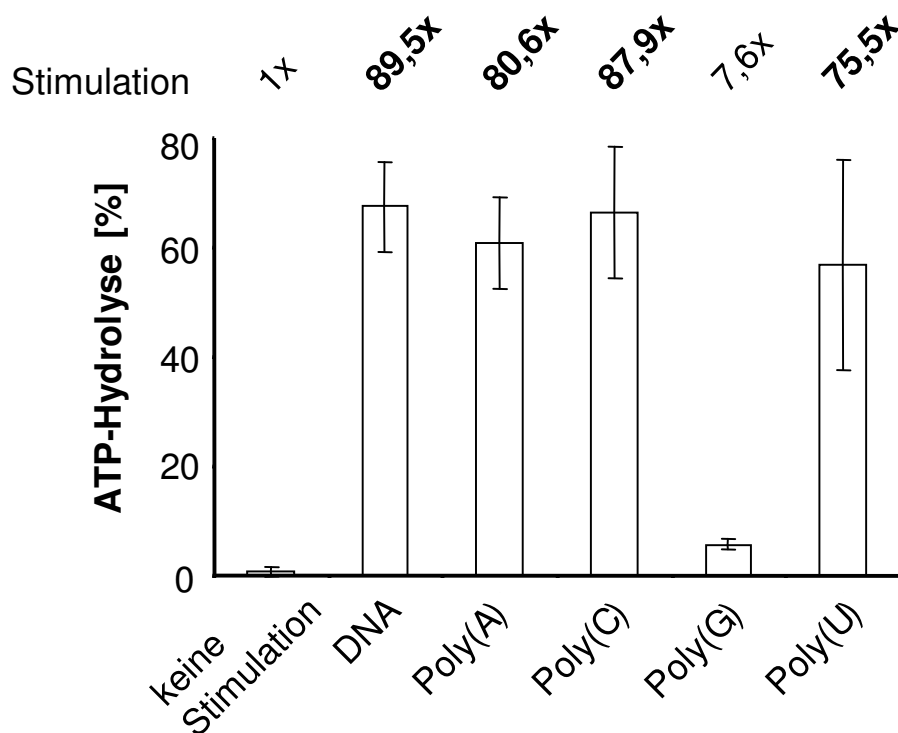


Abbildung 30: Stimulation der ATPase-Aktivität. IGHMBP2 hydrolysiert ATP in Anwesenheit von DNA und den RNA-Homopolymeren Poly(A), Poly(C) und Poly(U) *in vitro*. Das Ausmaß der Stimulation ist über der entsprechenden Säule angegeben. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte und die Fehlerbalken die Standardabweichungen aus drei voneinander unabhängigen Experimenten.

Die Messergebnisse aus drei voneinander unabhängigen Experimenten zur Stimulation der ATPase-Aktivität sind in *Abbildung 30* wiedergegeben.

Als nächstes ging ich der Frage nach, ob IGHMBP2 eine allgemeine NTPase ist oder eine Präferenz für ein Nukleotid hat. Dafür habe ich der Standardreaktion einen 50fachen molaren Überschuss anderer, nicht radioaktiv markierter NTPs und dNTPs zugegeben. Unter diesen Bedingungen konnte man die Poly(A)-stimulierte ATPase-Aktivität von IGHMBP2 nur durch Zugabe von ATP und dATP (*Abbildung 31*, Spuren 2 und 6) inhibieren, während andere Nukleotide reproduzierbar keinen Effekt hatten

Ergebnisse

(Abbildung 31, Spuren 3-5 und 7-9). Die Leerkontrollen mit 50fach molarem Überschuss an NTPs bzw. dNTPs zeigten nur Hintergrundaktivität (Abbildung 31, Spuren 10-17).

Die Messungen aus drei unabhängigen Experimenten der Konkurrenz der ATPase-Aktivität des IGHMBP2 ist in *Abbildung 32* dargestellt.

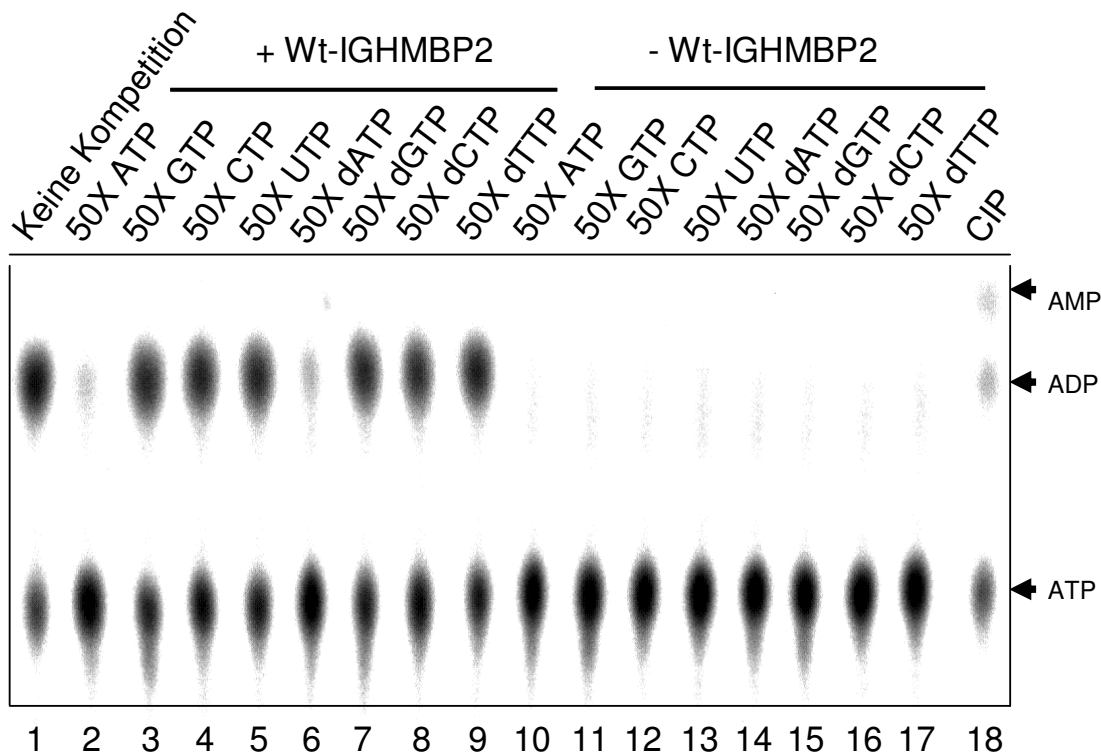


Abbildung 31: Analyse der Nukleotidspezifität des IGHMBP2. Dünnschichtchromatografische Auftrennung der Hydrolyseprodukte des ATPs nach Konkurrenz durch 50fachen molaren Überschuss anderer Nukleotide. Alle Reaktionen wurden mit 100 ng Wt-IGHMBP2 oder ohne IGHMBP2 durchgeführt und durch 0,1 mg/ml Poly(A) stimuliert. Die Laufhöhe der Hydrolyseprodukte wurde durch Vergleich mit den Reaktionsprodukten der *Calf Intestine Phosphatase* (CIP) bestimmt.

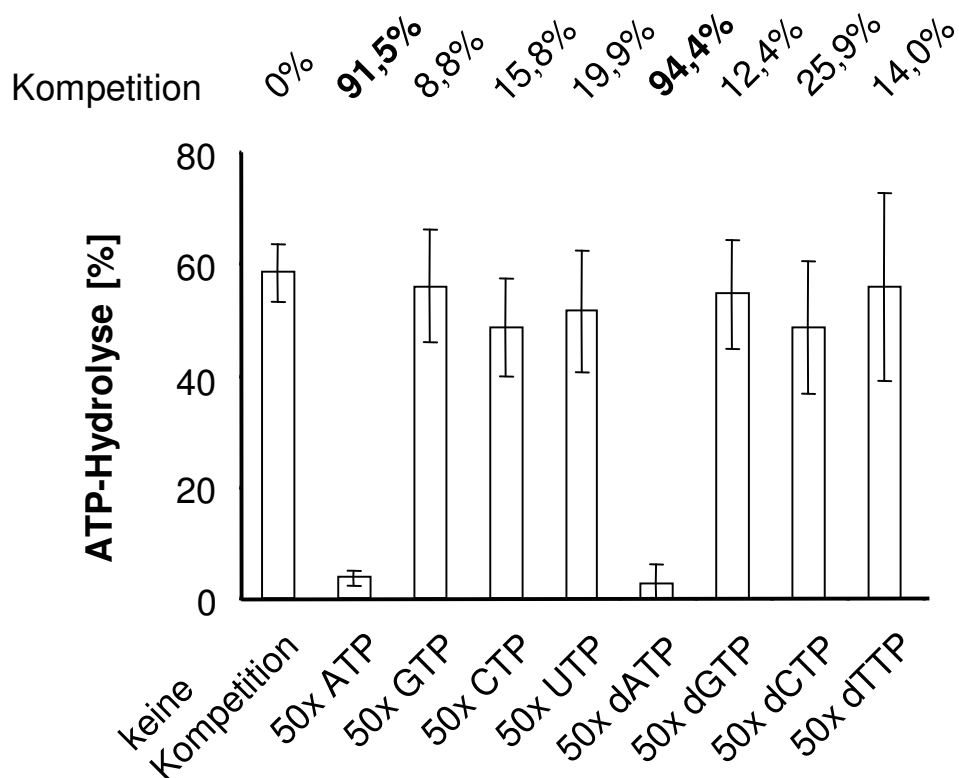


Abbildung 32: **Nukleotidspezifität der NTPase-Aktivität.** IGHMBP2 hydrolysiert selektiv ATP und dATP *in vitro*. In den dargestellten Konkurrenzexperimenten kann die Hydrolyse von ATP nur durch die Zugabe 50fachen molaren Überschusses von ATP und dATP inhibiert werden. Das Ausmaß der Konkurrenz ist über jeder Säule in Prozent angegeben. Die Säulen repräsentieren die Mittelwerte und die Fehlerbalken die Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

3.2.3.3 Untersuchung der Helikase-Aktivität

Helikasen verwenden die Energie aus der ATP-Hydrolyse, um sich an Nukleinsäuren entlang fortzubewegen und/oder um doppelsträngige Abschnitte aufzutrennen (s. 1.4.2). Nachdem ich gezeigt hatte, dass der N-terminale Teil des IGHMBP2 eine funktionelle ATPase-Domäne besitzt, wollte ich nun die Helikase-Aktivität des Proteins überprüfen. Zunächst führte ich einen „strand displacement“-Versuch mit einem RNA-Duplex durch, der überhängende, einzelsträngige 3'- und 5'-Enden besaß. Der Duplex wurde mit steigenden Mengen IGHMBP2 inkubiert. Nach 60 min wurden die Reaktionen abgestoppt und die Reaktionsprodukte durch native PAGE aufgetrennt. In Abhängigkeit von der IGHMBP2-Proteinkonzentration wurden die partiell doppelsträngigen Substrate entwunden, was sich durch die Bildung einzelsträngiger Reaktionsprodukte bei gleichzeitigem Rückgang des Signals der Ausgangsprodukte belegen ließ (Abbildung 33,

Ergebnisse

Spuren 3-6 und Spur 9). Die Zugabe eines 10fach molaren Überschusses nicht-radioaktiv markierter RNA hatte keinen Effekt auf die Entwindungsreaktion (*Abbildung 33*, Spur 9). Deshalb kann man annehmen, dass Rehybridisierungen zwischen den gerade entwundenen Strängen nicht stattgefunden haben, die durch die Zugabe nichtmarkierter, komplementärer RNA inhibiert werden sollten. Wird der Reaktion ATP entzogen oder ihr IGHMBP2-Protein zugefügt, das eine Mutation in der Walker B-Region der ATPase/Helikase-Domäne besitzt, können Duplices nicht mehr entwunden werden. Dies weist die ATP-Abhängigkeit dieser Reaktion nach und belegt die Abwesenheit unspezifischer Kontamination. Das gleiche Experiment wurde auch mit einem DNA-Duplex durchgeführt, der sowohl 3'- und 5'- überhängende Enden hatte und erbrachte ähnliche Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

RNA-Duplex C4/Mol

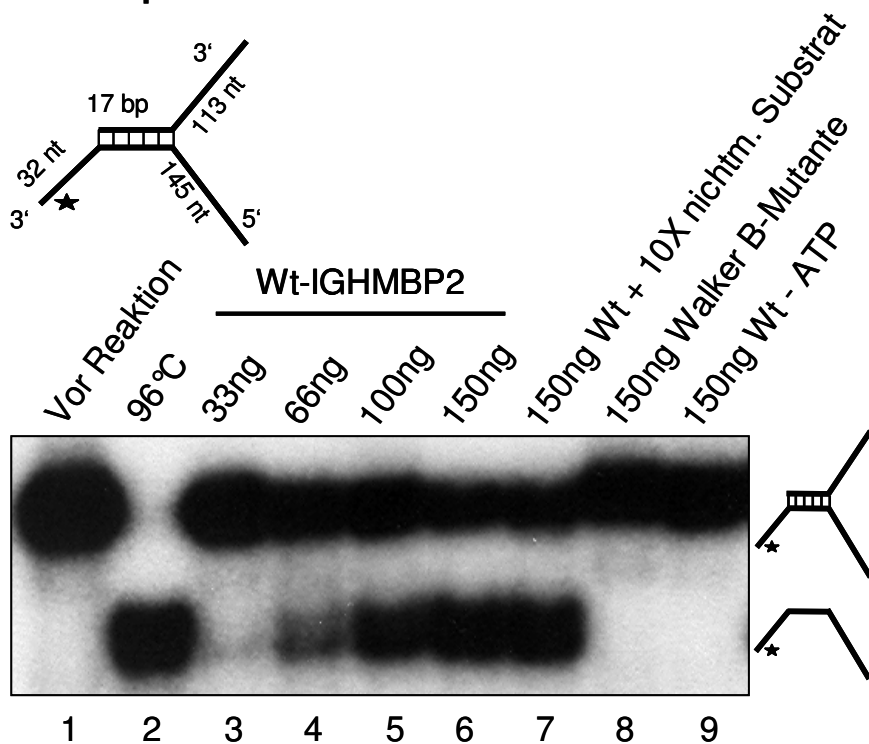


Abbildung 33: IGHMBP2 ist eine RNA-Helikase in vitro. Steigende Mengen an Wt-IGHMBP2 wurden mit 25 fmol RNA-Duplex inkubiert und die Reaktionsprodukte anschließend durch native PAGE aufgetrennt. Die Kontrollmutante diente als Negativkontrolle. Die Laufhöhe der doppel- bzw. einzelsträngigen Nukleinsäuren ist schematisch rechts dargestellt, der Stern kennzeichnet den radioaktiv markierten Strang.

Des Weiteren wollte ich durch den Einsatz von Duplices, die entweder einzelsträngige 5'- oder einzelsträngige 3'-Enden hatten, die Translokationsrichtung des Enzyms

bestimmen. IGHMBP2 konnte nur RNA-Duplices (*Abbildung 34*, Spur 3) oder DNA-Duplices (*Abbildung 35*, Spur 3) mit einzelsträngigen 5'-Enden entwenden. Dagegen blieben Duplices, die nur 3' überhängende Enden besaßen, bei der Inkubation mit IGHMBP2 während des Experimentes stabil (*Abbildung 34*, Spur 7 und *Abbildung 35*, Spur 7). Eine Kontrollmutante (Walker B-Mutante) wies keine Helikase-Aktivität auf (*Abbildung 34*, Spuren 4 und 8; *Abbildung 35*, Spur 4 und 8), was wiederum belegt, dass die untersuchte Helikase-Aktivität von IGHMBP2 stammt.

RNA-Duplices

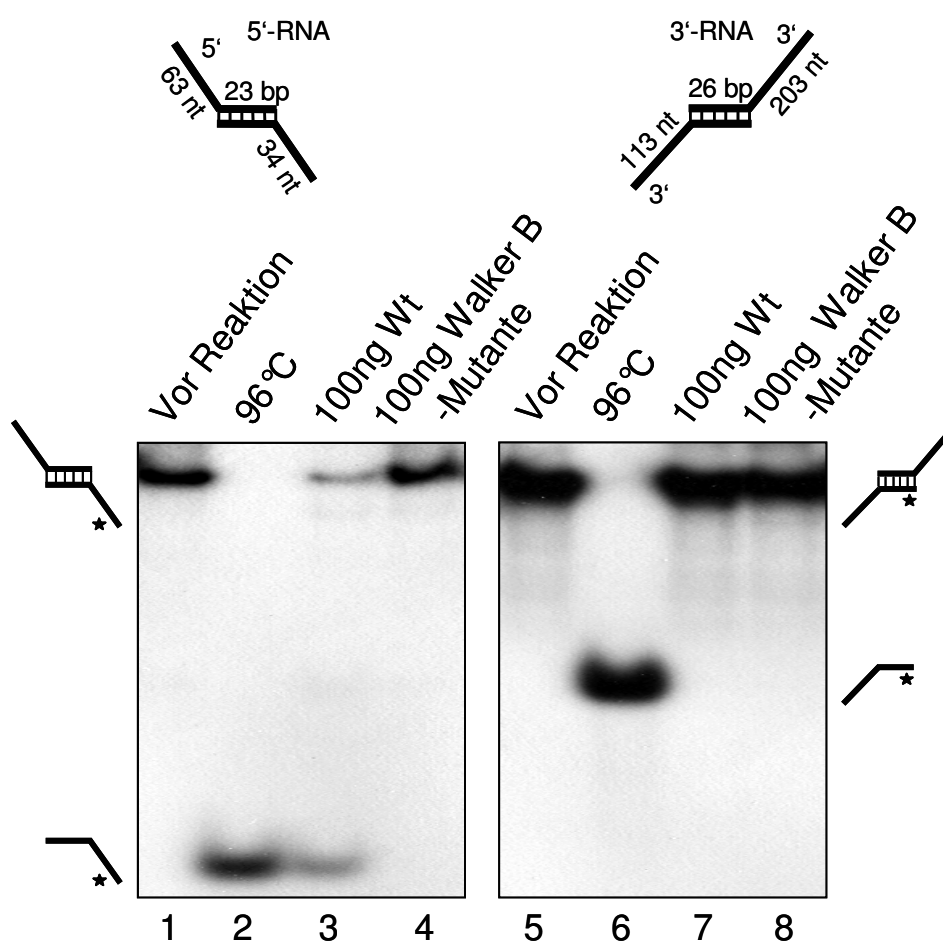


Abbildung 34: Analyse der Translokationsrichtung des IGHMBP2 mit RNA-Duplices. 100 ng Wt-IGHMBP2 wurden mit 25 fmol RNA-Duplices mit 5'-überhängenden Enden (5'-RNA) oder 3'-überhängenden Enden (3'-RNA) inkubiert und die Reaktionsprodukte anschließend durch native PAGE aufgetrennt. Die Inkubation mit 100 ng der Kontrollmutante Walker B diente als Negativkontrolle. Die Laufhöhe der doppel- bzw. einzelsträngigen Nukleinsäuren ist schematisch an den Seiten dargestellt und der Stern kennzeichnet den radioaktiv markierten Strang.

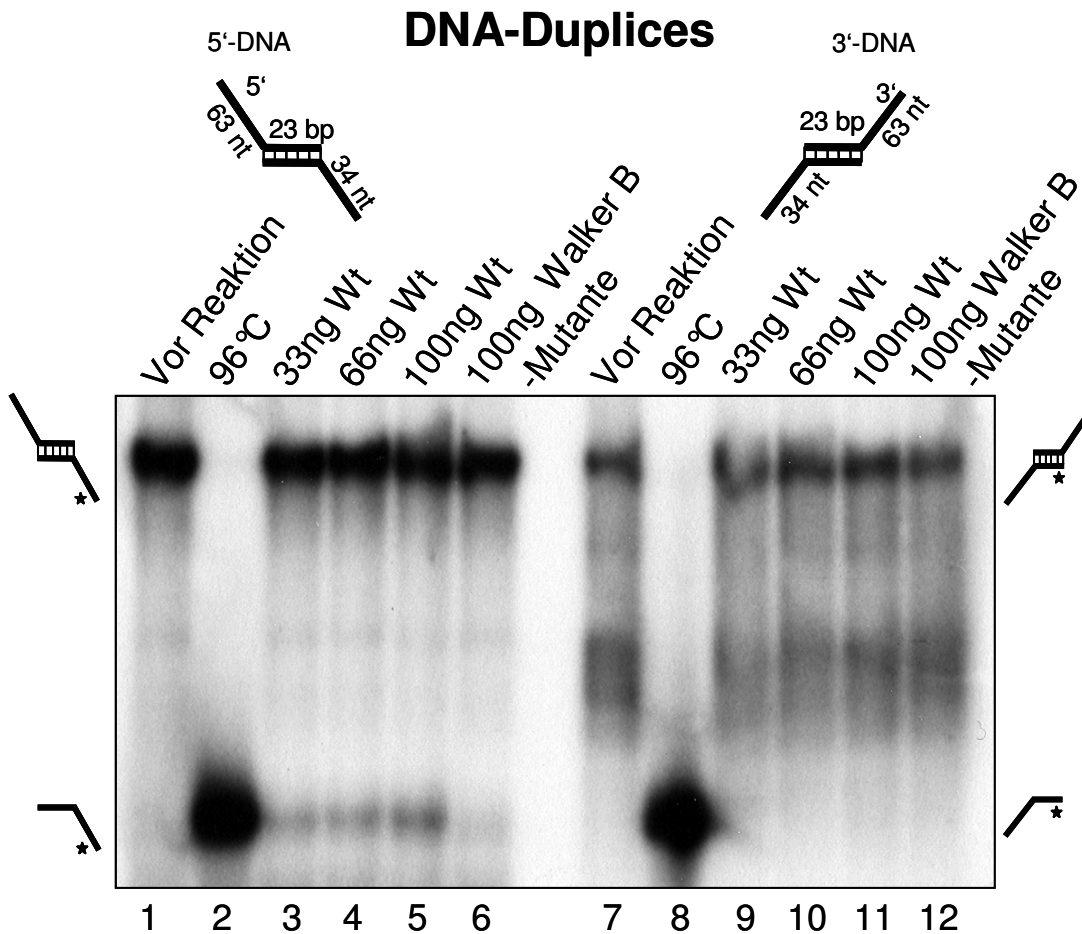


Abbildung 35: Analyse der Translokationsrichtung des IGHMBP2 mit DNA-Duplicates. Wt-IGHMBP2 wurde mit 25 fmol DNA-Duplicates mit 5'-überhängenden Enden (5'-DNA) oder mit 3'-überhängenden Enden (3'-DNA) inkubiert und die Reaktionsprodukte wurden anschließend durch native PAGE aufgetrennt. Die Reaktion mit der Kontrollmutante diente als Negativkontrolle. Die Laufhöhe der doppel- bzw. einzelsträngigen Nucleinsäuren ist schematisch an den Seiten dargestellt und der Stern kennzeichnet den radioaktiv markierten Strang.

3.2.4 Charakterisierung der enzymatischen Aktivität mutanten IGHMBP2-Proteins

3.2.4.1 Untersuchung des Nucleinsäure-Bindungsverhaltens

Die Analyse der enzymatischen Aktivitäten der SMARD1-Mutanten ermöglichte die Überprüfung der Hypothese, ob der Verlust der Helikase-Funktion des IGHMBP2 die Ursache der SMARD1 sein könnte. Im ersten Schritt habe ich das Bindungsverhalten der SMARD1-Mutanten zu einzelsträngiger RNA und DNA (*Abbildung 36*) untersucht.

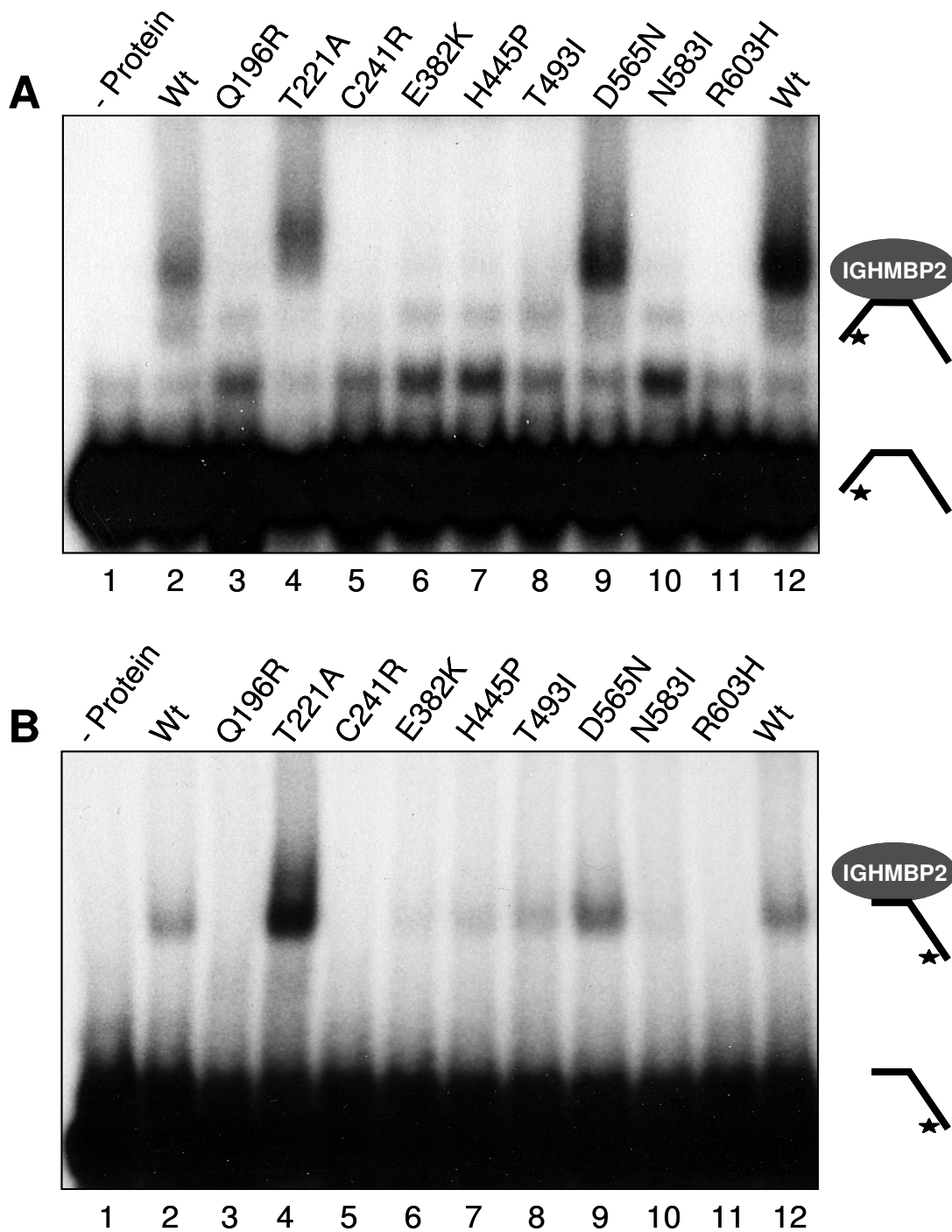


Abbildung 36: Untersuchung der Nukleinsäure-Bindung des Wt-IGHMBP2 und der SMARD1-Mutanten mit der EMSA-Methode. 100 ng Protein verschiedener IGHMBP2-Varianten wurden mit 25 fmol einzelsträngiger RNA (**A**) oder DNA (**B**) inkubiert und die Reaktionsprodukte anschließend durch native PAGE aufgetrennt. Die Laufhöhe der einzelsträngigen Substrate und der RNA/DNA:IGHMBP2-Komplexe sind schematisch rechts dargestellt und der Stern kennzeichnet den radioaktiv markierten Strang.

Dabei zeigten zwei SMARD1-Mutanten keine Defizite (T221A, D565N; *Abbildung 36A*,

Ergebnisse

Spuren 4 und 9), während die anderen Mutanten eine moderate (Q196R, E382K, H445P, T493I, N583I; *Abbildung 36A*, Spuren 3, 6-8 und 10) oder eine starke (C241R, R603H; *Abbildung 36A*, Spuren 5 und 11) Reduktion der RNA-Bindungskapazität gegenüber Wildtyp-IGHMBP2 (*Abbildung 36A*, Spuren 2 und 12) aufwiesen.

Prinzipiell dieselben Ergebnisse konnte man hinsichtlich der Bindung zu einzelsträngiger DNA beobachten (*Abbildung 36B*, Spuren 2, 4-9 und 11-12) - mit der Ausnahme, dass Q196R und N583I (*Abbildung 36B*, Spuren 3 und 10) ebenfalls eine starke Schwächung der DNA-Substratbindung erkennen ließen.

Als Positivkontrolle wurde zu jeder untersuchten Mutante die Aufreinigung des Wildtyps des entsprechenden Präparationstages sowohl in diesem als auch in den folgenden funktionellen Tests mitgeführt. Dadurch wollte ich sicherstellen, dass weder die Lagerung noch die Aufreinigung für den Verlust der enzymatischen Aktivität verantwortlich sein konnten (Daten nicht gezeigt).

3.2.4.2 Untersuchung der ATPase-Aktivität der SMARD1-Mutanten

Der Effekt der bereits im Bindungstest untersuchten SMARD1-Mutanten wurde weiter in Poly(A)-stimulierten ATPase-Assays überprüft.

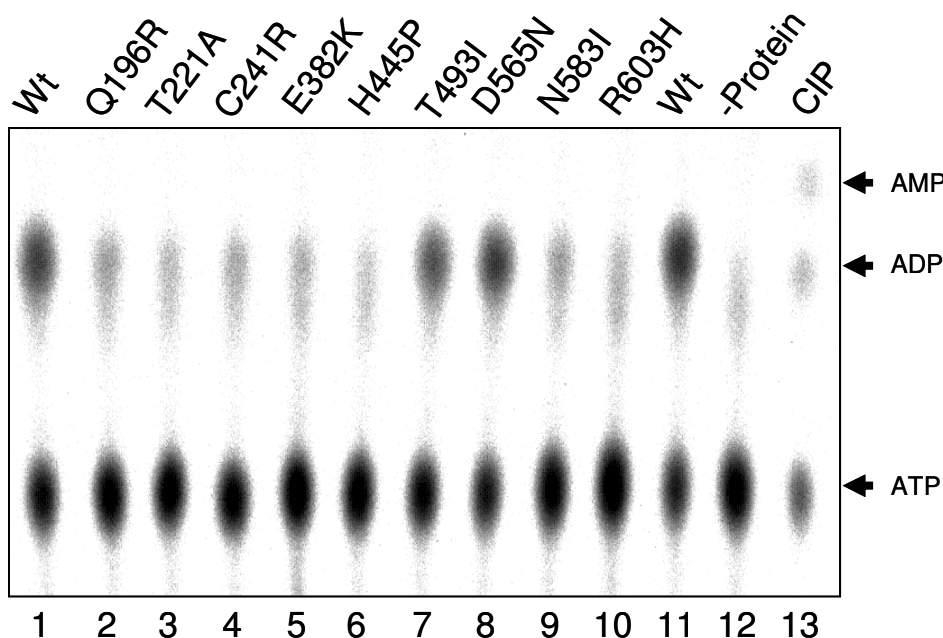


Abbildung 37: Überprüfung der ATPase-Aktivität der SMARD1-Mutanten. Alle Reaktionen wurden durch 0,1 mg/ml Poly(A) stimuliert und dann dünnschichtchromatografisch aufgetrennt. Die Spur ohne Protein diente als Leerkontrollen. Die Laufhöhe der Hydrolyseprodukte wurde durch Vergleich mit den Reaktionsprodukten der *Calf Intestinal Phosphatase* (CIP) bestimmt.

Für die meisten SMARD1-Mutanten habe ich eine drastische Reduktion (<17% des Wildtyps) der ATP-Hydrolyse beobachtet (Abbildung 37; Spuren 2-6 und 9-10). Nur die D565N- und T493I-Proteinvarianten (Abbildung 37; Spuren 7 und 8) waren neben den Wildtyp-IGHMBP2-Präparationen (Abbildung 37; Spuren 1 und 11) in der Lage, ATP zu spalten.

Zusammen mit den EMSA-Daten kann man schlussfolgern, dass mit Ausnahme der D565N- und T493I-Mutanten die meisten SMARD1-Mutationen eine Reduktion der Nukleinsäurebindung und/oder den Verlust der ATP-Hydrolyseaktivität zur Folge haben.

3.2.4.3 Untersuchung der Helikase-Aktivität der SMARD1-Mutanten

Abschließend habe ich die Helikase-Aktivität der SMARD1-Mutanten bestimmt.

RNA Duplex: C4/Mol

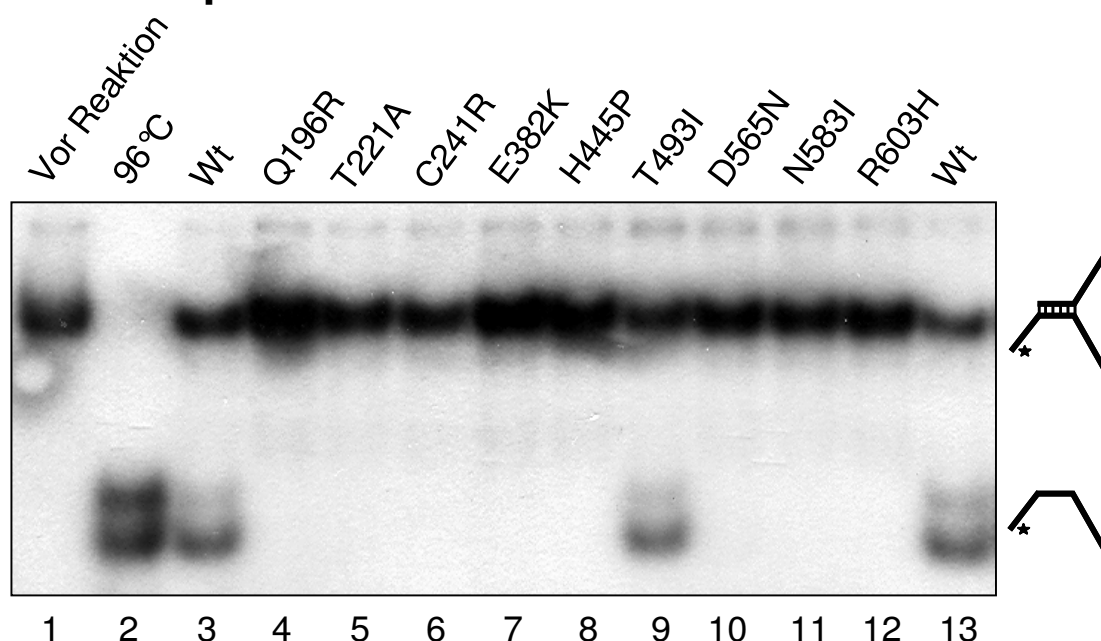


Abbildung 38: Untersuchung der RNA-Helikase-Aktivität der SMARD1-Mutanten. 100 ng Protein verschiedener (s. oberer Teil) IGHMBP2-Varianten wurden mit 25 fmol RNA-Duplex C4/Mol inkubiert und die Reaktionsprodukte nach dem Ende der Reaktion durch native PAGE aufgetrennt. Die Laufhöhe der doppel- bzw. einzelsträngigen Nukleinsäuren ist schematisch rechts dargestellt. Der Stern kennzeichnet den radioaktiv markierten Strang.

Mit Ausnahme der T493I-Mutante (Abbildung 38 und Abbildung 39, jeweils Spur 9) waren alle untersuchten SMARD1-bezogenen IGHMBP2-Proteinvarianten nicht in der Lage, RNA- oder DNA-Duplices (Abbildung 38 und Abbildung 39, jeweils Spuren 4-8 und 10-12) zu entwinden. Dies bestätigte, dass die ATP-Hydrolyse eine *conditio sine*

Ergebnisse

qua non für das Entwinden partiell doppelsträngiger Nucleinsäuren ist. Die D565N-Mutante, die noch ATPase-Aktivität besaß, war nicht imstande, partiell doppelsträngige Nucleinsäuren zu entwinden. Damit entkoppelt die p.D565N-Mutation im Motiv V der Helikasedomäne die ATP-Hydrolyse von der Entwindungsaktivität.

Untersuchungen der „*steady state*“-IGHMBP2-Proteinmengen bei Trägern der c.1478T>C (p.T493I)-Mutation legten die Vermutung nahe, dass sich der pathogene Charakter dieser Veränderung nicht durch reduzierte katalytischen Aktivität, sondern in einer Reduktion der Proteinmengen ausdrückt (siehe 3.1.6). Damit kann man erklären, warum diese Mutante zu einem SMARD1-Phänotyp führt, obwohl sie noch enzymatisch aktiv ist. Insgesamt unterstützen diese Ergebnisse die eingangs formulierte Hypothese, dass der primäre biochemische Defekt der SMARD1-Erkrankung der Verlust der Helikasefunktion des IGHMBP2 ist.

DNA Duplex: 5'-DNA

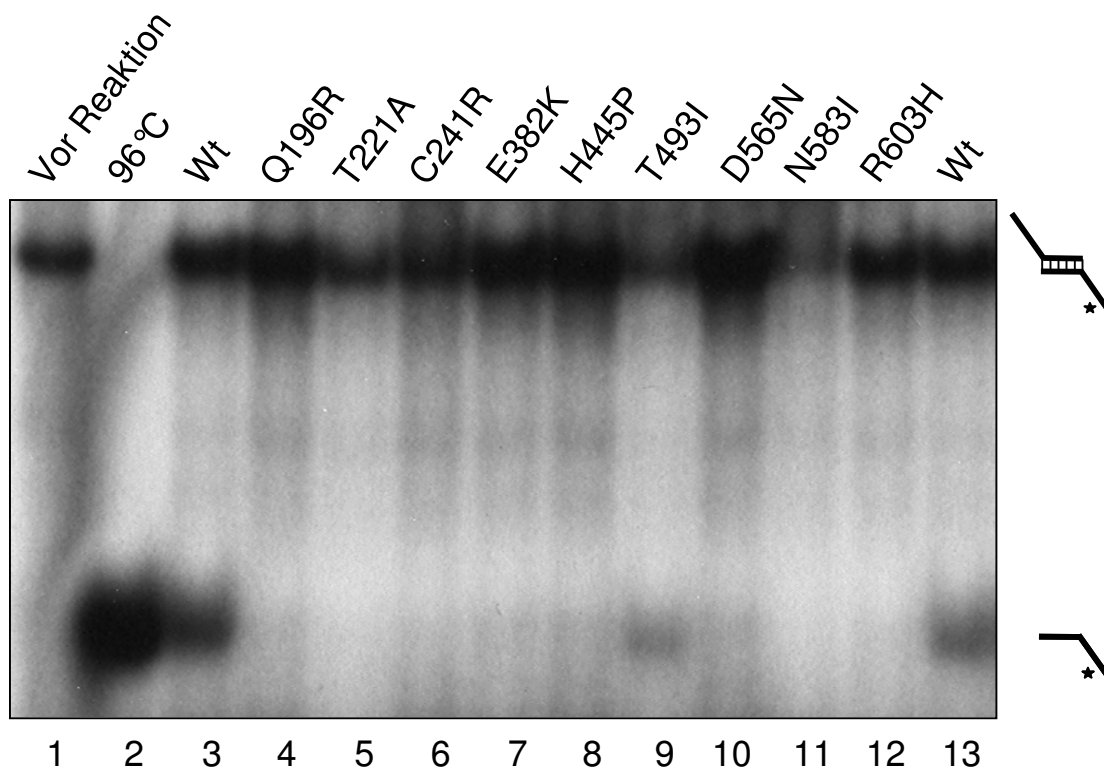


Abbildung 39: Untersuchung der DNA-Helikase-Aktivität der SMARD1-Mutanten. 100 ng Protein verschiedener IGHMBP2-Varianten wurden mit 25 fmol 5'-DNA-Duplex inkubiert und die Reaktionsprodukte nach dem Ende der Reaktion durch native PAGE aufgetrennt. Die Laufhöhe der doppel- bzw. einzelsträngigen Nucleinsäuren ist schematisch rechts dargestellt. Der Stern kennzeichnet den radioaktiv markierten Strang.