

Diplomarbeit

**Molekulargenetische Charakterisierung einer konsanguinen
Familie mit nicht-syndromaler Intelligenzminderung**

eingereicht von

Victoria Krennhuber

zur Erlangung des akademischen Grades der
Doktorin der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

Institut für Humangenetik

unter Anleitung von

Windpassinger, Christian, Assoz. Prof. Priv.-Doz. Mag. Dr. rer.nat.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 18.10.2016

Unterschrift Victoria Krennhuber eh



Kurzbeschreibung

Hereditäre Intelligenzminderungen können grundsätzlich als arretierte oder unvollständige intellektuelle Entwicklungen definiert werden, die sich mit verschiedensten Ursachen, Symptomen und Ausprägungen zeigen. In der vorliegenden Arbeit wird am Beispiel einer konsanguinen Familie Pakistanischer Herkunft aufgezeigt, welche Möglichkeiten die moderne molekulare Humangenetik bietet, um die kausalen Zusammenhänge zwischen höchst heterogenen Erkrankungen wie der Intelligenzminderung und den molekularen Ursachen herzustellen. Nach erfolgter positioneller Eingrenzung der Kandidatenregion auf Chromosom 13 durch Homozygotie-Kartierung, konnte mit high-end Sequenzierungsmethoden wie der Exom-Sequenzierung und in weiterer Folge mittels Sanger-Sequenzierung die mögliche pathogene familiäre Mutation identifiziert werden. Diese an der Exon/Intron-Grenze lokalisierte Variante im Exon 22 des PCCA-Gens wirkt sich laut „in silico“ Vorhersageprogrammen negativ auf die angrenzende „splice donor site“ aus und führt daher putativ zu einem trunkierten Protein. Die potentielle Ursächlichkeit dieser Variante muss in weiterführenden RNA basierenden oder funktionellen Analysen abgeklärt werden.

Summary

Intellectual disability is a clinically and genetically heterogeneous disorder characterized by an arrested or incomplete development of mind. The following master thesis describes the molecular characterization of a consanguineous Pakistani family presenting with a non-syndromal form of intellectual disability. As a first step, we were able to define the candidate region on Chromosome 13 by using a homozygosity mapping strategy. With novel high throughput sequencing methods such as exome sequencing and also Sanger-sequencing, we were able to identify a potentially causative DNA variant in PCCA, which was shown to segregate with the disease in the family. In silico analysis with splice site prediction programs revealed that this gene mutation, located at the exon/intron border of exon 22, has an adverse effect on the adjacent splice donor site, which presumably leads to a truncation of the resulting protein. For a final evaluation the pathogenic potential of this mutation, further functional assays and RNA based experiments have to be performed.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	
1.1 Intelligenzminderung	1
1.1.1 Einteilung	1
1.1.2 Syndromale und nicht-syndromale Formen	2
1.1.3 andere genetische Ursachen	
1.1.3.1 hereditäre Stoffwechselkrankheiten	4
1.1.3.2 angeborene Hirnfehlbildungen	6
1.1.3.3 chromosomale Veränderungen	7
1.1.4 Diagnostik	8
1.1.5 Therapie	10
2 Material und Methoden	
2.1 DNA-Proben	11
2.2 Exom-Sequenzierung	11
2.3 Datenbanken und Programme zur Verarbeitung der Ergebnisse	18
2.4 Primer-Design	20
2.5 Segregationsanalyse	21
3 Ergebnisse und Resultate	
3.1 Phänotypische Beschreibung	25
3.2 Stammbaumanalyse	25
3.3 Datenauswertung der Exom-Sequenzdaten	26
3.4 Filterung der Daten	27
3.5 Priorisierung der gefilterten Varianten	33
3.6 Auswahl des Kandidatengenes	35
3.7 Ergebnisse der Segregationsanalyse	39

3.8 PCCA-Gen und Propionazidämie	41
3.8.1 PCCA-Gen	41
3.8.2 Propionazidämie	42
3.8.2.1 Ätiologie	42
3.8.2.2 Epidemiologie	43
3.8.2.3 Klinische Krankheitsformen	43
3.8.2.4 Symptomatik	44
3.8.2.5 Differenzialdiagnostik	45
3.8.2.6 Diagnostik	45
3.8.2.7 Therapie	46
3.8.2.8 Prognostik	47
4 Diskussion	48
5 Literaturverzeichnis	51
6 Abbildungsverzeichnis	54

1 Einleitung

In dieser Arbeit wurde eine konsanguine Familie (MR15) mit einer nicht-syndromaler Intelligenzminderung (ID) molekulargenetisch untersucht. Ziel war es, die ursächliche DNA-Veränderung für diese autosomal rezessiv vererbte Form von ID zu eruieren.

Im Folgenden wird näher auf den Begriff der Intelligenzminderung mit dessen Ursachen, Symptomen, Diagnosemöglichkeiten und Therapie eingegangen.

1.1 Intelligenzminderung (engl. *intellectual disability*, kurz: ID)

Es handelt sich dabei laut WHO um eine nicht vollständige geistige Entwicklung, die sich im Laufe der kindlichen Entwicklung manifestiert, mit einer besonderen Beeinträchtigung von Fertigkeiten wie Sprache, Kognition und motorische und soziale Fähigkeiten. [1]

Die Intelligenzminderung kann isoliert oder in Kombination mit anderen Krankheiten oder neurologischen Symptomen wie z.B. Epilepsie auftreten, und ist in ihrer Variabilität und Ausprägung sehr unterschiedlich. [2]

Ihre weltweite Prävalenz wird auf 1% geschätzt [2], wobei das Verhältnis von Knaben zu Mädchen auf Grund von zahlreichen X-chromosomalen Gendefekten ca. 1,6:1 beträgt. [3]

1.1.1 Einteilung

Die genaue Einteilung der Intelligenzminderung in Schweregraden gestaltet sich dahingehend schwierig, da sämtliche gebräuchliche Tests zur Quantifizierung, für Personen mit Intelligenzquotienten (IQ) im Normalbereich, und nicht für solche im subnormalen IQ-Bereich, entworfen wurden. [4] Die folgende ICD-10 Klassifikation erlaubt eine ungefähre Einteilung:

- Leichte Intelligenzminderung (F70): (ca. 80% aller geistig Behinderten; IQ: 50-69). Spracherwerb entwickelt sich verzögert, jedoch ist eine normale Konversation möglich. Auch Tätigkeiten des Alltages wie z.B. Anziehen und Essen, die zur Selbständigkeit beitragen werden erlernt. Im schulischen Bereich treten vor allem Schwierigkeiten beim Erlernen des Lesens und der Äußerung in Schriftsprache auf. Für die meisten ist im späteren Leben eine handwerkliche Arbeit möglich. [1]

- Mittelgradige Intelligenzminderung (F71): (12% aller geistig Behinderten; IQ: 35-49)
Die Fähigkeit der Sprachentwicklung ist sehr variabel, während die einen an einer einfachen Unterhaltung teilnehmen können, erlernen die anderen niemals Sprechen und können sich nur durch Handzeichen mitteilen. Auch eine Fähigkeit zur Selbstversorgung entwickelt sich verzögert und einige brauchen lebenslang Betreuung. Schulisch können Fähigkeiten wie Lesen, Schreiben und Rechnen erlernt werden und im Erwachsenenalter können praktische Tätigkeiten ausgeführt werden. [1,5]
- Schwere Intelligenzminderung (F72): (7% aller geistig Behinderten; IQ: 20-34)
Dieser Schweregrad ähnelt dem unteren Leistungsbereich der mittelgradigen ID. Zusätzlich kommen bei den meisten motorische Beeinträchtigungen vor.[1,5]
- Schwerste Intelligenzminderung (F73): (unter 1% der geistigen Behinderten; IQ: <20)
Betroffene können Aufforderungen und Anweisungen nicht verstehen oder danach handeln. Kommunikation ist nur schwer möglich. Die meisten sind immobil und bewegungseingeschränkt und können so nicht für ihre Grundbedürfnisse sorgen. Betroffenen ist es möglich einfache räumlich-visuelle Fähigkeiten wie Sortieren und Zuordnen zu erlernen. [1,5]
- Dissoziierte Intelligenzminderung (F74), andere Intelligenzminderung (F78) und nicht-näher bezeichnete Intelligenzminderung (F79) [5]

1.1.2 Syndromale und nicht- syndormale Formen

Intelligenzminderung kann als Teil von mehreren Symptomen (syndromal) oder allein stehend (nicht syndromal) vorkommen[6].

Eine syndromale Form bedeutet, dass das Symptom der Intelligenzminderung mit anderen charakteristischen Symptomen assoziiert ist. [7] Im Folgenden werden syndromale Formen der ID beschrieben und ein Leitsymptom mit dem diese pathogenetisch verbunden ist.

- Adipositas: Im Fall des Prader-Willi-Syndroms (Deletion eines paternalen Abschnittes von Chromosom 15 (15q11-q13, OMIM 176270) tritt zusätzlich zur ID eine generalisierte Adipositas auf. Auch beispielsweise beim Temple-Syndrom (maternale UPD(14), OMIM 616222) kommt es neben einem Kleinwuchs und Entwicklungsverzögerung zu einer generalisierten Adipositas. [6,8]

- Makrozephalie/Makrosomie: Syndromale Krankheitsbilder mit ID und Makrozephalie bzw. Makrosomie sind sehr selten. Eines der häufigeren ist beispielsweise das Sotos-Syndrom (autosomal-dominant, in 80% der Fälle eine Mutation oder Deletion (5q31) im NSD1-Gen, OMIM 117550) bei dem neben Makrozephalie, Makrosomie, ID zu einer charakteristischen Gesichtsentwicklung kommt. Ähnlich ist dem zum Beispiel das Weaver-Syndrom (autosomal-dominant, EZH2-Mutation, OMIM 277590) bei diesem fällt zusätzlich ein übermäßiges Wachstum auf. [6,8]
- Mikrozephalie, Kleinwuchs und multiple Fehlbildungen: Diese Kombination mit ID ist am häufigsten. Ein Beispiel dafür ist das Rubinstein-Taybi-Syndrom (autosomal-dominant, 40-60% CREBBP-Mutationen (16p13), OMIM 180849) mit charakteristischen Gesichts, Daumen und Zehenveränderungen. Das Smith-Lemli-Opitz-Syndrom (autosomal-rezessiv, DHCR7-Mutationen (11q12-13), OMIM 270400) zeigt Wachstumsverzögerung, Gesichtsanomalitäten und Mikrozephalie. [6,8]

Das Fragile-X-Syndrom (X-chromosomal-dominant, FMR1-Mutationen, OMIM 300624) zählt prinzipiell auch zu den syndromalen Formen, wird jedoch aufgrund seiner späten spezifischen Ausprägungen, erst im Laufe der Entwicklung als syndromale Krankheit erkannt. An diesem Beispiel wird klar, dass eine exakte Abgrenzung zu nicht-syndromalen Formen oft schwierig ist. [8,9]

Eine nicht-syndromalen Intelligenzminderung findet sich bei den meisten Betroffenen. Nicht-syndromal bedeutet, dass keine zusätzlichen klinischen, radiologischen oder metabolische Auffälligkeiten oder zusätzliche spezifische Symptome (z.B. neurologische Symptome, Mikrozephalie, Gesichtsanomalitäten) bestehen [9]. Eine grobe Einteilung kann in Vererbungsmuster erfolgen:

- X-chromosomaler Erbgang: Zur Identifizierung von X-chromosomalen ID -Genen war die Kopplungsanalyse in Familien mit X-chromosomalen Erbgang und die geordnete Erfassung von betroffenen Familien maßgebend. [9] Beispiele für solche Gene wären: IL1RAPL1-Mutationen (OMIM 300143), TM4SF2-Mutationen (OMIM 300210) und FMR2-Mutationen (OMIM 309548). [8,9]

- autosomal-dominanter Erbgang: Ein Großteil der sporadisch auftretenden Fälle von Intelligenzminderung sind wahrscheinlich auf de-novo Mutationen zurückzuführen. Durch eine geringe Fortpflanzungsrate in betroffenen Familien ist eine Kopplungsanalyse nicht möglich. So konnten die meisten Kenntnisse nur durch Untersuchungen chromosomaler Aberrationen und Bruchpunktanlaysen (z.B. bei Translokationen) gewonnen werden. Schließlich, durch die Einführung der Array-CGH, konnten ein großer Fortschritt bei der Identifizierung von Kandidatengen gemacht werden. [9]
- autosomal-rezessiver Erbgang: Eine erhöhte Prävalenzen für autosomal-rezessive Formen der ID finden sich vor allem in Familien aus Ländern mit einem vermehrten Anteil an konsanguinen Ehen. In der westlichen Welt finden sich solche kaum, durch kleine Familiengrößen und geringe Anzahlen an Verwandtschaftsehen. Somit ist unklar wie viel autosomal-rezessive Formen von ID wirklich am Gesamtkollektiv ausmachen. [9] Durch hohe die sowohl klinische als auch genetische Heterogenität gilt es als wahrscheinlich, dass kein Gen für mehr als 2% der Patienten/ der Patientinnen mit autosomal-rezessiver ID verantwortlich ist. [7,9]

1.1.3 Andere genetische Ursachen

1.1.3.1 Hereditäre Stoffwechselkrankheiten

Diese machen als Ursache einer geistigen Behinderung nur 1% in Mitteleuropa aus, jedoch sind durch Zuzug konsanguiner Familien oder Familien aus Ländern in denen kein Neugeborenencreening durchgeführt wird, höhere Häufigkeiten möglich. [10]

- Störung des Kreatinstoffwechsels: Mutationen in Genen, die Kratinintransporter codieren (SLC6A8 auf Xq28, OMIM 300352) führen dazu, dass Neuronen und Muskelzellen nicht ausreichend mit Kreatinin versorgt werden. Klinisch charakteristisch sind Intelligenzminderung, Sprachdefizite, Verhaltensauffälligkeiten und Epilepsie. Eine autosomal-rezessive vererbte Störung der Kreatininsynthese ist beispielsweise der Guanidino-Azetat-Methyl-Transferase (GAMT)-Mangel (OMIM 601240). Betroffene zeigen therapieresistente Epilepsien, autistische Störungen und Bewegungsauffälligkeiten. [8,10]

- Lysosomale Speicherkrankheit: Durch die Akkumulation nicht vollständig abgebauter Makromoleküle kommt es zu einem Funktionsverlust in den betroffenen Organen und Gewebe z.B. Neurodegeneration. Ein Beispiel dafür ist der β -Mannosidase-Mangel (OMIM: 248510) bei dem eine milde ID im Vordergrund steht. Bei 70% kommt es zusätzlich zu Verhaltensauffälligkeiten (z.B. Hyperaktivität) [8,10]
- zerebrale Organoazidopathien: Ein Beispiel dafür ist die 4-Hydroxybutyrazidurie bei der es in Folge eines SSADH (Sukzinatsemialdehyd-dehydrogenase -Mangels (OMIM 271980) zur Störung des GABA-Stoffwechsels kommt, wobei ein wichtiger hemmender Faktor auf die Neurotransmitter wegfällt. Folgen für Betroffene sind zum Beispiel psychomotorische Störungen, Verhaltensauffälligkeiten und Epilepsie. [8,10]
- Störungen des Aminosäurestoffwechsels: Als Beispiel zu nennen ist die Phenylketonurie (OMIM 261600) deren Hauptsymptom die Intelligenzminderung ist. Eine Diät zur Verringerung von Phenylalanin führt zur Besserung der Symptome. Ein anderes Beispiel ist die klassische Homozystinurie (Störung der Cystathionin- β -Synthase, OMIM 236200), welche sich durch Intelligenzminderung, Epilepsie und psychiatrische Störungen auszeichnet. [8,10]
- erbliche Glykosylierungsstörungen: Sie ist eine immer größer werdende Gruppe von Störungen der postrationalen Modifikation von Molekülen durch Transfer von Zuckermolekülen auf Lipide oder Proteinen. Der häufigste Typ ist der Phosphomannomutase-Mangel durch eine Mutation PMM2 Gen (OMIM 202165). Diese Krankheit besitzt ein weites Spektrum an Symptomen, jedoch häufig sind psychomotorische Retardierung, Ataxie, Hypotonie, Hyporeflexie und Epilepsie.[8,10]
- Störung des Purin- und Pyrimidinstoffwechsels: Zu nennen als Beispiel ist der ADSL (Adenylosukzinatlyase)- Mangel (OMIM 103050), dabei handelt es sich um eine Störung der Adenosylmonophosphat-Synthese im Purinstoffwechsel. Betroffene leiden gewöhnlich an einer schweren psychomotorischen Retardierung. [8,10]
- andere Stoffwechselerkrankungen: Beispiele dafür sind Harnstoffzyklus – und Sterolsynthesedefekte (z.B. Smith-Lemli-Opitz-Syndrom durch 7-Dehydrocholesterol-Reduktase-Mangel,OMIM 270400) [8,10]

1.1.3.2 angeborene Hirnfehlbildungen

Ein Teil der angeborenen Hirnfehlbildungen ist genetisch bedingt. Folgend werden zwei Beispiele dafür genannt:

- Holoprosenzephalie: Hierbei kommt es zu einer unvollständigen Teilung des embryonalen Vorderhirns in die beiden Hirnhälften. Aufgrund der Bildgebung lassen sich je nach Vollständigkeit der Teilung drei Schweregrade einteilen. Klinisch kommt es bei den Betroffenen immer zu einer psychomotorischen und mentalen Entwicklungsverzögerung und die Hälfte leidet zusätzlich unter Epilepsie. Bei 75% kommt es im Laufe der Entwicklung zu endokrinen Störungen. Ursächlich können Chromosomenaberrationen wie Trisomie 13 und 18, Mutationen im SHH-, ZIC2-, SIX3- oder TGIF-Gen oder chromosomale Inbalancen der Subtelomerregionen sein. [11]
- Lissenzephalien: Dabei handelt es sich um Störungen der Migration von neuronalen Vorläuferzellen zum Kortex. Eine Einteilung wird nach Art der neuronalen Migrationsstörung getroffen:
 - Periventriculäre noduläre Heterotopien: Kennzeichnend dafür ist die gestörte Initiierung der Migration. Ursächlich ist eine Mutation im X- Chromosom am FLNA-Gen.
 - Klassische Lissenzephalie: Charakteristisch dafür ist die aktive Störung der Migration mit nicht ausreichender Gyrierung. Krankheitsassoziationen wurden im LIS1-, ARX-, DCX-, oder TUBA1A- Gen gefunden.
 - „Pflasterstein“-Lissenzephalie: Sie ist durch die Störung der Beendigung der Migration bedingt. In Verbindung mit Muskeldystrophie und Augenfehlbildungen kann sie syndromal auftreten. [11]

Bei der Diagnostik sind nicht nur genetische Methoden von Bedeutung, sondern auch bildgebende Verfahren wie MRT. Dabei können strukturelle Hirnfehlbildungen genauer eingeordnet werden. Eine kausale Therapie ist noch nicht möglich, lediglich symptomatische Therapien können angeboten werden. Eine Einstellung der Epilepsiemedikation kann besonders bei neuronaler Migrationsstörung ein Problem sein. [11]

1.1.3.3 chromosomale Veränderungen

Chromosomale Aberrationen wurden schon früh als Ursache für einige Formen der ID entdeckt. Im Folgenden werden chromosomale Veränderungen mit zugehörigen ID assoziierten Erkrankungen aufgelistet:

- Aneuploidien und Aneusomien: Dabei handelt es sich um chromosomale Inbalancen. Sie zählen zu den häufigsten Ursachen für mentale Retardierung, wobei die Trisomie 21 (OMIM 190685) die höchste Prävalenz (9,2%) unter Betroffenen mit ID hat. Im Hinblick auf die Trisomie 21 spielt deswegen die genetische Diagnostik mit konventioneller Karyotypisierung eine wichtige Rolle und wird routinemäßig bei ungeklärter ID herangezogen. [8,12]
- Mikrodeletionen: Sie entstehen durch ein ungleiches Cross-over in der Meiose und weisen klinisch sehr typische Syndrome auf. Dazu gehören klassische Syndrome wie zum Beispiel Prader-Willi-Syndrom (OMIM 176270) und Angelmann-Syndrom (OMIM 105830) bei denen es zur väterlichen bzw. mütterlichen Deletion des Chromosomenabschnittes 15q11.2-q13 kommt. Ein anderes Beispiel ist das Cri-du-chat-Syndrom (OMIM 123450), bei dem eine Deletion des kurzen Armes von Chromosom 5 ursächlich ist. Bei allen genannten Krankheiten steht das Symptom der geistigen Entwicklungsverzögerung im Vordergrund. [8,12,13]
- Mikroduplikationen: Bei einer Duplikation kommt es zu Verdopplung eines Chromosomenabschnittes. Ursächlich dafür ist ein ungleiches Cross-over. Mikroduplikations-Syndrome sind jedoch klinisch oft schwer zu diagnostizieren. [12,14]

1.1.4 Diagnostik

Die Diagnostik der Intelligenzminderung ist komplex und setzt sich aus verschiedensten Methoden zusammen. [15]

Klinische Diagnosemöglichkeiten:

Im Folgenden werden einige klinische Diagnostikmöglichkeiten angeführt:

- Anamnese: Sie sollte über den Entwicklungsstand, Entwicklungs- und Bildungsgeschichte, Krankheitsgeschichte mit Komorbiditäten und störungsrelevante Rahmenbedingungen Auskunft geben. [15]
- Medizinische und psychologische Diagnostik: Dient zur Einschätzung der Art und des Ausmaßes der Intelligenzminderung, der Beurteilung der ursächlichen Bedingungen und der sensorischen Fähigkeiten. Wie schon erwähnt, ist die Bewertung des Intelligenzquotienten durch mangelnde angepasste Testverfahren nicht optimal, jedoch ist eine Einteilung in Schweregrade, bezüglich zukünftiger Lebensperspektive und Förderungen, unverzichtbar. [15]
Im Verdachtsfall sollte diese Diagnostik noch im Rahmen einer genauen körperlichen Untersuchung (z.B. neuroradiologische, immunologische Untersuchungen, Hormonanalyse, Liquoruntersuchung, Muskel- und Nervenbiopsie) erweitert werden. [15]
- Psychischer Befund: Ein Status psychicus sollte im Hinblick auf Komorbiditäten wie Schizophrenie auch in die Diagnostik einfließen. Relevante Punkte hierbei sind: Orientierung, Bewusstseinslage, Kooperation, Sprache, Stimmung und Affekt, Antrieb, Psychomotorik, Denken, Wahrnehmung, Gedächtnis, Ängste und Suizidalität. [15]

Molekulargenetische Methoden:

Aufgrund der technischen Revolution der Diagnoseverfahren hat die genetische Diagnostik in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen und spielt in dieser Arbeit natürlich eine zentrale Rolle.

Der häufigste Grund für eine genetische Untersuchung und Beratung ist die geistige Behinderung. [15] Historisch beginnt die genetische Diagnostik der Intelligenzminderung mit der Einführung der Zytogenetik, wodurch chromosomale Aberrationen als häufiger Grund für ID erkannt wurden. Allen voran die Trisomie 21. In den frühen 90er Jahren konnte durch Identifikation von CGG Wiederholungen im FMR1-Gen die Ursache des Fragilen-X-Syndrom gefunden werden. Das FMR1-Gen ist das häufigste mutierte Gen im Zusammenhang mit ID und deswegen ein wichtiger Bestandteil der Routinediagnostik. [2]

Auf der anderen Seite wurde die Suche nach autosomalen Ursachen noch immer stark limitiert durch die Einschränkungen der Zytogenetik und Sequenzierungstechnologie und dem Fehlen von großen Familien mit autosomalen Formen von ID. [2]

Doch durch die Einführung der Array-CGH war es möglich Duplikationen und Deletionen von weniger als 100 kB zu erfassen. Bei diesem Verfahren werden zu untersuchende DNA-Fragmente mit fluoreszierendem Farbstoff markiert und mit der Referenz-DNA, welche anders farbig markiert ist, verglichen. [16] Die Array-CGH ermöglichte es erstmals de novo Mutationen als Ursache für autosomal-dominante Formen von ID zu identifizieren. Die Anzahl der bekannten autosomal-dominanten ID Gene ist im Vergleich zu der Anzahl der X-Chromosom assoziierten ID Gene trotzdem noch immer sehr klein,.

Zur Identifizierung von autosomal-rezessiven ID Genen werden Methoden wie „Homozygosity-Mapping“ bei vorhandenen SNP-Arrays und Sanger-Sequenzierung bei ausgewählten Kandidatengenen angewendet. [2]

Trotz der fortgeschrittenen diagnostischen Möglichkeiten ist es immer noch schwierig die Pathogenität von Mutationen zu beweisen und ein mögliches Kandidatengen als ID ursächliches Gen zu begründen. Eine weitere Schwierigkeit besteht auch darin, die Auswirkungen von einzelnen Mutationen auf biologische Prozesse und Signalwege zu verstehen. Oft ist die genaue Abgrenzung von Signalwegen für ID und anderen neurologischen Erkrankungen ist jedoch nicht klar ersichtlich. Dies lässt sich dadurch erklären, dass man bei ID häufig eine Komorbidität mit beispielsweise Schizophrenie,

Epilepsie oder Autismus findet. Überprüft werden muss, ob sich die Signalwege einfach überlappen oder Patienten/ Patientinnen beide Phänotypen präsentieren. [2]

Zusammenfassend hat die genetische Diagnostik unser Verständnis für die Ursachen von ID in den letzten Jahren stark verbessert und so können für viele Patienten/ Patientinnen mit schwerer/schwerster Form genaue Diagnosen gestellt werden.

Ausblick: Meist lag der Fokus auf Formen schwerer und schwerster ID und deren Ursachen. In Zukunft sollen auch milder Formen Gegenstand von Forschung werden. Neue Ansätze in der Aufklärung von ID sind die Suche nach somatischen Ursachen, die Untersuchung der Überschneidungen zwischen verschiedene Genotypen und Phänotypen und die Suche nach Ursachen in nicht codierenden Bereichen. [2]

1.1.5 Therapie

Jahrelang galt die Heilung von ID als unmöglich, da die komplexen neuronalen Prozesse schwer steuerbar sind und zelluläre Schädigung nicht rückgängig gemacht werden kann. Deswegen fokussiert sich die Therapie hauptsächlich auf individuelle Förderung im schulischen als auch im häuslichen Bereich. Medikamentös wird versucht die Komorbiditäten möglichst gering zu halten.

Vor allem bei ID mit ursächlichen Stoffwechselerkrankungen wie z.B. Phenylketonurie gibt es schon Enzyersatztherapien, die das klinische Bild der Patienten/ Patientinnen stark verbessern. Zukünftig hofft man auch spezielle Typen von ID, welche zum Beispiel Mutationen in der Histonmodifikation haben, mit Medikamenten zu behandeln, die die Histonmodifikation positiv beeinflussen. Eine andere Therapiemethode hat das Ziel, eine Milderung der Symptome des Fragilen-X-Syndroms durch GABA Rezeptorantagonisten zu erreichen. Klinische Versuche zeigten, dass sich Verhalten und Wahrnehmung von Betroffenen verbessern. [2]

Generell sind Verlauf und Prognose von einer frühen Erkennung der Krankheit und der Effizienz folgender Interventionen abhängig. Prognostisch ist zu sagen, dass Betroffene zu Komorbiditäten wie früher Demenz neigen und ein erhöhtes Mortalitätsrisiko aufweisen. [17]

2 Material und Methoden

2.1 DNA-Proben

Das Gomal Centre of Biochemistry and Biotechnology (Gomal University Dera Ismail Khan, Khyber-Pakhtoonkhwa, 29050, Pakistan) übermittelte nach Einholung des zum weiteren Vorgehen erforderlichen Ethikvotums die DNA-Proben der untersuchten Familie (MR15). Als Ansprechpartner vor Ort fungierte in dieser Sache dabei Ass.-Prof. Dr. Muzammil Ahmad Khan.

Bei dem untersuchten Material handelt es sich um 5 DNA Proben (MR15-1 – MR15-5) von insgesamt 5 Probanden. Die Familienmitglieder wurden über Wesen, Tragweite und Aussagekraft der genetischen Untersuchung aufgeklärt. Eine unterfertigte Einverständniserklärung aller StudienteilnehmerInnen liegt vor.

2.2 Exom-Sequenzierung

Da zu erwarten ist, dass die kausale Mutation in exonischen beziehungsweise flankierenden intronischen Bereiche lokalisiert wurde zunächst eine Exom-Sequenzierung der Betroffenen mit der Probennummer MR15-1 durchgeführt.

Sämtliche folgenden Labortechniken wurden mit freundlicher Unterstützung von Fr. Martina Auer, MSc, erarbeitet.

Nextera Rapid Capture Exome Kit

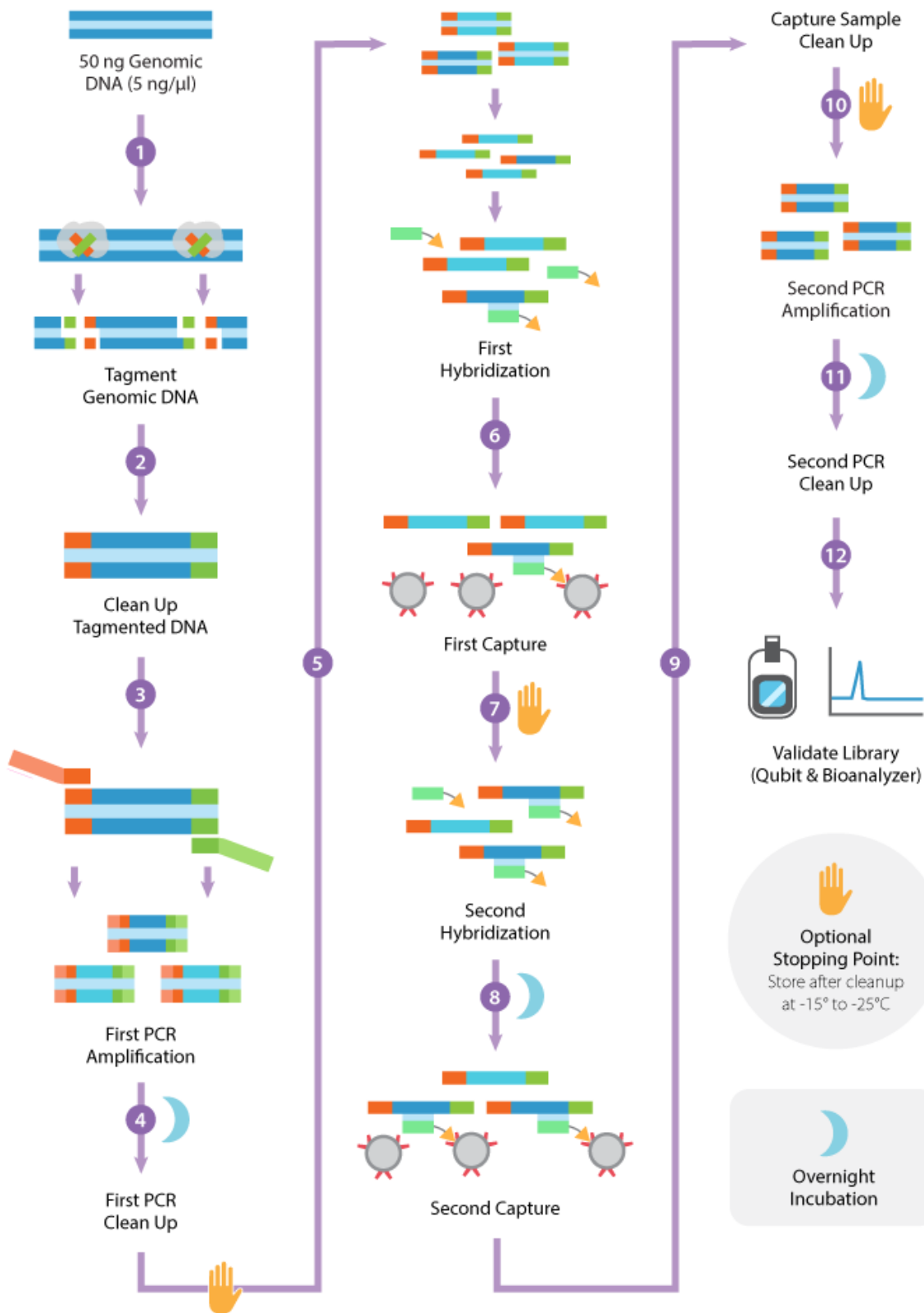


Abbildung 1: Überblick über die Präparation der Proben für die Sequenzierung.

- Bestimmung der DNA-Konzentration:

Im ersten Schritt wurde die Konzentration der DNA in der Probe (MR15-1) unter Zuhilfenahme eines Qubit® 2.0 Fluorometers bestimmt.

Protokoll:

1) Anfertigen der Arbeitslösung: dafür wird Qubit™ ds DNA BR Reagenz im Verhältnis 1:200 mit Qubit™ ds DNA BR Buffer verdünnt.

2) Vorbereitung der Standards: Man vermischt 190 µl Arbeitslösung mit 10 µl des jeweiligen Qubit™ Standards.

3) Vorbereitung der Proben: Nun werden 199 µl Arbeitslösung werden mit 1 µl Patienten/ Patientinnen-DNA vermenget.

4) Darauf folgt die Inkubation aller Proben und Standards für 2 Minuten bei Raumtemperatur.

5) Am Qubit 2.0 Fluorometer ist nun als Probentyp „DNA“ auszuwählen.

6) Um eine neue Kalibrierung durchzuführen, wird die Option „Read new standard“ gewählt. Man fährt fort mit der Zugabe des Standard 1 und der Eingabe des Befehls „Read“ am Bedienfeld. Nach Durchführung der oben genannten Schritte wird Standard 1 entfernt und derselbe Vorgang mit Standard 2 wiederholt. Danach auch Standard 2 entfernen.

7) Für die DNA Probe finden ebenfalls die unter Punkt 6) beschriebenen Schritte Anwendung.

8) Nun wählt man den Menüpunkt „Calculate Stock Conc.“ aus und gibt die zugegebene DNA-Menge (1 µl) an. Auf diese Weise wird die originale Konzentration der Probe automatisch berechnet.

Für diese ergab sich eine Konzentration von 69 ng/µl. Um eine Exom-Sequenzierung durchführen zu können wird eine Konzentration von mindestens 50 ng/µl benötigt.

- Tagmentierung:

Die Tagmentierung ist ein Vorgang, bei dem die DNA in kleinere Stücke von ca. 300 Basenpaaren zerteilt wird. Noch im selben Schritt fügt man den entstanden DNA-Fragmenten spezielle Adapter an. Diese Adapter bestehen aus einer Abfolge aus Nukleotiden und dienen im Falle einer später folgenden DNA Amplifikation als Bindungsstelle für Primer. (Abb1.1) [18]

- **Aufreinigung:**

Bei diesem Schritt werden die reaktiven Reagenzien der Tagmentierung entfernt. Gleichzeitig entledigt man sich auch jener DNA-Stücke, welche nach der Tagmentierung nicht die geforderte Größe von 300 Basenpaaren erreicht haben, d.h. welche „zu kurz“ oder „zu lang“ sind. Um dies zu bewerkstelligen wird eine eigene Technik benutzt, bei der sogenannte Sample Purification Beads (SPB), kleinste Metallkügelchen, den DNA-Stücken beigegeben werden. Diese SPB binden nur an jene DNA Stücke, die in etwa eine Länge von 300 Basen aufweisen. Die Probe mit zugegebenen SPB wurden dann in Verbindung mit einem Magneten gebracht, so konnte der nicht magnetische Überstand und damit alle zu langen oder zu kurzen Fragmente entfernt werden. Daraufhin wurden die SPB von den verbliebenen DNA-Stücken mit einem Resuspensions Buffer getrennt, worauf die optimal tagmentierte DNA zur Verfügung standen. (Abbildung 1.2)

Zusätzlich wurde mittels Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer noch einmal die Länge, der in der endgültigen Probe enthaltenen DNA-Stücke, überprüft. (Abbildung 2) [18]

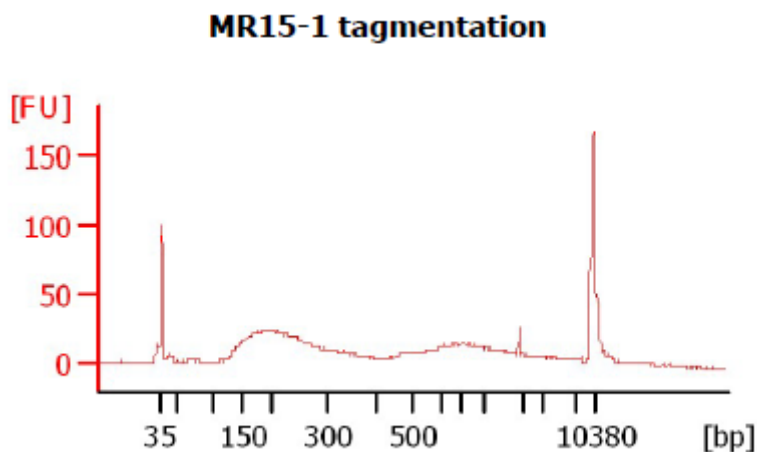


Abbildung 2: ungefähr auf Höhe von 300 Basenpaaren ist ein Peak zuerkennen, der die optimale Länge der DNA-Stücke bestätigt. Bei den Peaks im Minimum- und Maximumbereich handelt es sich um Standards.

- Amplifikation:

Nun wurde die tagmentierte DNA mittels PCR amplifiziert. Um bei der späteren Sequenzierung eine korrekte Zuordnung der Probe gewährleisten zu können, wurde ein Index beigefügt. (Dies ist nötig, da sich in einem Lauf normalerweise mehrere unterschiedliche Proben befinden.) Zum Schluss wurden noch an beiden Enden der DNA Stücke Adapter angehängt, welche man später für die Cluster-Amplifikation benötigt. (Abb1.3)

Zu guter Letzt findet eine weitere Aufreinigung (Abb1.4) sowie eine Längenüberprüfung der in der Probe enthaltenen DNA-Stücke mittels Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer statt. (Abbildung 3) [18]

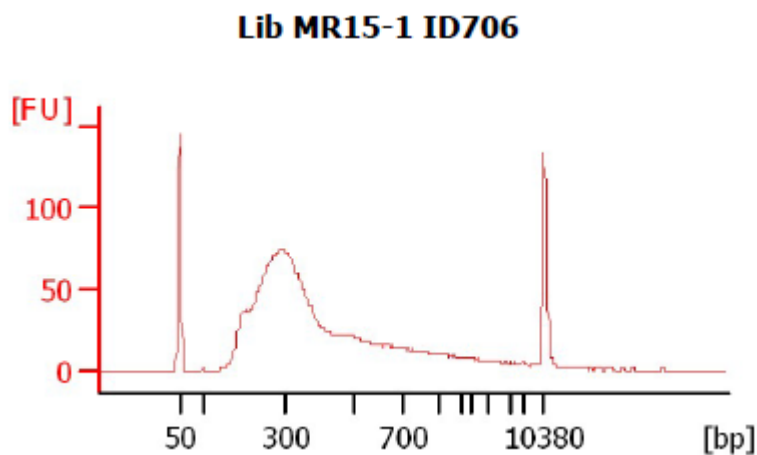


Abbildung 3: auf Höhe von 300 Basenpaaren ist nun ein eindeutiger Peak sichtbar.

- Hybridisierung und „Capturing“:

Das Ziel dieses Schrittes ist es das Exom aus der Gesamtmenge der DNA herauszufiltern. Zu diesem Zwecke wurde die doppelsträngige DNA in Einzelstränge aufgebrochen und in Kontakt mit einer sogenannten „Library“ gebracht, welche alle Exons enthält. Nur komplementäre DNA-Stücke können an diese binden. Beim „Capturing“ wurden die gewünschten Exons bereits mit Hilfe von SPB(siehe oben) herausgefiltert.

Dieser Schritt wurde nun ein zweites Mal durchgeführt um sicher zu gehen, dass alle Exons erfolgreich selektiert wurden. (Abb1.5-9) [18]

- Zweite Amplifikation:

Die ausgewählten Exons wurden nun erneut mittels PCR amplifiziert. (Abb 1.10-11)
Schließlich erfolgte eine nochmalige Kontrolle durch den Agilent Technologies 2100 Bioanalytiker. (Abbildung 4) [18]

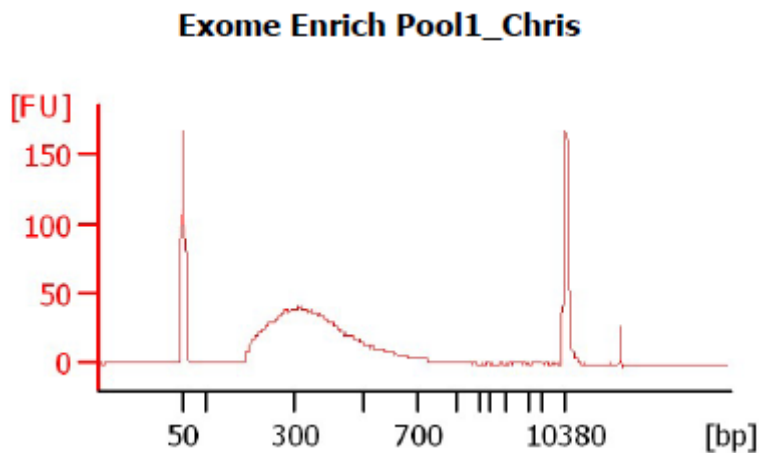


Abbildung 4: gewünschter Peak bei 300 Basenpaaren.

- Sequenzierung:

Die Sequenzierung wurde mittels „illumina-Mini SeqTM“ durchgeführt und besteht aus zwei großen Prozessen, der Cluster-Amplifikation und der eigentlichen Sequenzierung.

- Cluster-Amplifikation:

Bei diesem Prozess werden die ExonDNA-Stücke auf eine sogenannte „flowcell“ aufgebracht. Diese enthält kurze Nucleotidsequenzen, an denen die DNA-Fragmente mit ihren Adaptoren binden können. Die DNA-Stücke gehen am entgegengesetzten Ende eine Bindung mit Primern ein, wobei es zur Brückenbildung kommt. Die Primer amplifizieren eine idente Brücke, welche sich vom originalen Strang wieder löst und erneut an einen Adapter anlagert. Es kommt zur wiederholten Brückenbildung; man spricht von Clusterbildung. (Abbildung5) Schließlich werden noch alle Folgestränge entfernt. [18]

- Sequenzierung:

In diesem Schritt spricht man von Sequenzierung durch Synthese. Dabei binden erneut Primer an den DNA-Stücken. Daraufhin werden fluoreszierende Nucleotide eingebracht, welche Licht einer charakteristischen Wellenlänge emittieren sobald sie eine Bindung mit ihrer äquivalenten Base eingehen. Diese messbare Fluoreszenz wird von einem Detektor aufgezeichnet. (Abbildung 5) In weiterer Folge bindet der Leitstrang nun wieder an der „flowcell“ und wird dabei amplifiziert. In diesem Durchgang wird der Leitstrang danach entfernt und es bleiben nur die Folgestränge zurück. Die Abfolge der Basen kann nun wie bereits in den oben beschriebenen Schritten erläutert wurde detektiert werden. [18]

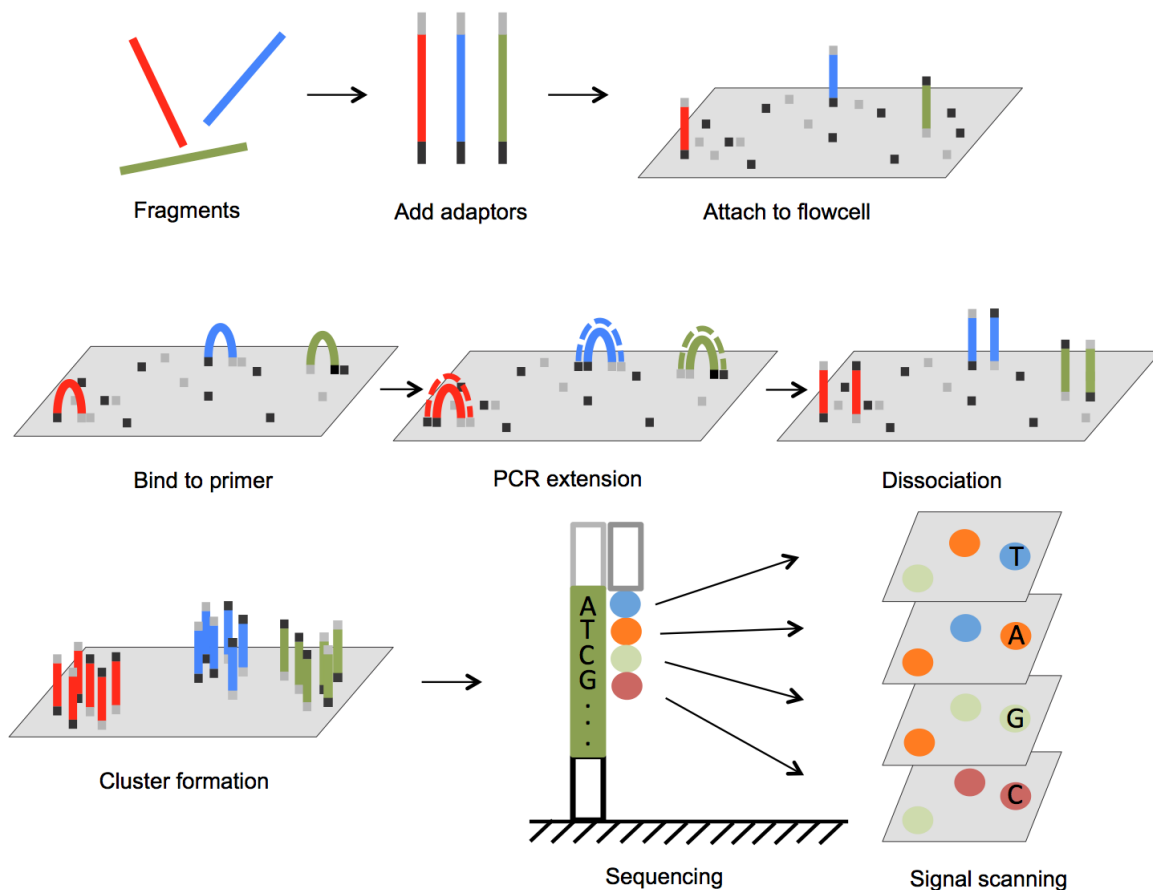


Abbildung 5 Überblick über die einzelnen Sequenzierungsschritte.

- Datenanalyse:
Die so gewonnene große Menge an Daten wird nun verarbeitet, indem ein sogenanntes „clustering“ von gleichen Basenabfolgen stattfindet, wobei der jeweilige Folgestrang zugeordnet wird. Danach werden die Basenabfolgen mit der Referenz-DNA abgeglichen, so kann eine genaue Zuordnung stattfinden. [18]

2.3 Datenbanken und Programme zur Verarbeitung der Ergebnisse:

- Berkeley Drosophila Genome Project: Ziele sind unter anderen die exakte Sequenzierung der *Drosophila melanogaster*, die Charakterisierung der Sequenz und Expression von cDNA sowie online Tools bereitzustellen, welche experimentelles Arbeiten fördern. Als online Tool ist das Berkeley Drosophile Genome Projekt als „splice site prediction“ Programm nutzbar. Das bedeutet, es werden Wahrscheinlichkeiten angegeben, ob es innerhalb eines Gens zum „splicing“ kommt.
Hersteller: gegründet in Zusammenarbeit vom National Human Genome Research Institute, National Cancer Institute und dem Howard Hughes Medical Institute
[http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html]
- Chromas: ermöglicht die bildliche Darstellung einfacher DNA-Sequenzen.
Verwendete Version: Chromas 2.5.1
Hersteller: Technelysium Pty Ltd
- Homozygosity-Mapper: Dieses online Tool zeigt Homozygotie-Bereiche innerhalb der untersuchten DNA an. [www.homozygositymapper.org]
- ID Gene Database Project: gibt Informationen über bekannte ID-Gene und ID-Kandidatengene, im Hinblick auf deren Proteinstruktur und assoziierte Signalwege.
Hersteller: Dr. Kathleen Gardiner's Lab, in the Department of Pediatrics (UCD Pediatric Research) and the Intellectual and Developmental Disabilities Research Center at the University of Colorado Denver (UCD).
[<http://gfuncpathdb.ucdenver.edu/iddrc/iddrc/home.php>]
- Illumina Variant Studio: ermöglicht die Identifikation und Klassifikation krankheitsrelevanter Varianten. Eingebachte Exom- Daten der zu untersuchenden Person werden mit dem Referenzgenom abgeglichen und sämtliche SNPs (=Single Nucleotid Polymorphismen) angezeigt.
Hersteller: illumina®

- Integrative Genomics Viewer 2.3(kurz: IGV): Dient zur Visualisierung und Bewertung genomischer Rohdaten.
Hersteller: Helga Thorvaldsdóttir, James T. Robinson, Jill P. Mesirov. The Broad Institute of MIT and Harvard. 2013
- Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM): diese Datenbank fokussiert sich hauptsächlich auf den Zusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp.
Hersteller: McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University School of Medicine [www.omim.org].
- PhenIX: dieses online Tool ermöglicht die Verbindung von Kandidatengen und charakterisierten OMIM-Genen. Eine Zuordnung erfolgt einerseits durch die zu erwartenden Pathogenität des jeweiligen Genes und andererseits durch die Ähnlichkeit des gesuchten Phänotyps mit jenen Phänotypen, welche sich aus den eingebrachten Kandidatengen ergeben.
Hersteller: Exomiser team: Charité Universitätsmedizin Berlin, Institute for Medical Genetics and Human Genetics, Computational Biology and Bioinformatics Group und Sanger Mouse Informatics Group at the Sanger Institute. 2014
- Primer3: ein online Tool, welches für eine beliebige Sequenz passende Primer berechnet.
Hersteller: Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012) Primer3 - new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Research 40(15):e115
- UCSC- Genom Browser: liefert Informationen und Darstellungen des Genoms.
Verwendete Version: Human GRCh 37/hg19
Hersteller: Genome Bioinformatics Group, University of California Santa Cruz [<http://genome.ucsc.edu>]

2.4 Primer-Design

Für die Segregationsanalyse von Exon 22 des PCCA-Gens wurden mit dem online Tool „Primer3“ passende Primer ausgewählt. Folgende Primer ergaben sich dabei:

Left Primer: `tgatgtgtgcagcaattgag`

Right Primer: `gaactgcaaagagccgaatc`

Wichtige Kriterien, die beim Primer-Design beachten werden sollen:

- Ein Primer sollte eine Länge von 18-30 Nucleotiden aufweisen.
- Der Schmelzpunkt der Primer sollte zwischen 65°C-75°C liegen (wenn der Schmelzpunkt zu tief ist, dann kann eine Sequenz mit mehr CG gesucht oder der Primer verlängert werden).
- Primer sollten zu 40-60% CG enthalten und am 3`Ende ein C oder G beinhalten
- Am 5`Ende sollten zusätzlich noch 3-4 Nucleotide angefügt werden.
- Eine Balance zwischen CG-reichen und AT-reichen Regionen soll erreicht werden
- Eine Wiederholung von 4 oder mehr gleichen Basen oder Dinucleotiden ist zu vermeiden (z.B. ACCCCC oder ATATATAT).
- Weder innerhalb eines Primers noch bei forward- und reverse- Primer dürfen gleiche Sequenzen auftauchen. [19]

Die ausgewählten Primer wurden zusätzlich im UCSC mit dem online Tool „in silico PCR“ überprüft und gleichzeitig wurde sichergestellt, dass sich in den Primer keine SNPs befinden.

2.5 Segregationsanalyse

Für das PCCA-Gen wurde eine Sanger-Sequenzierung aller Proben (MR15-1 – MR15-5) durchgeführt:

- DNA-Konzentrationmessung: für alle Proben wurde zunächst die Konzentration mit „Nano Drop (ND-1000 Spectrophotometer; Hersteller: PREQLAB)“ bestimmt. Dabei ergaben sich:

Proben ID	ng/ μ l
MR15-1	111.85
MR15-2	114.01
MR15-3	188.93
MR15-4	179.13
MR15-5	198.32

Auffallend ist, dass sich für die Probe MR15-1 bei Messung mit „Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer“ eine höhere Konzentration ergibt als bei Messung mit dem Qubit[®] 2.0 Fluorometer. Dieser Umstand ist darauf zurückzuführen, dass die Messmethode mit „Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer“ eine geringere Genauigkeit aufweist, als jene mit dem Qubit[®] 2.0 Fluorometer. Für die folgende PCR –Reaktion reicht jedoch ein annähernd genauer Wert aus, um sicher zu gehen dass sich genügend DNA in den Proben befindet.

- Primer-Verdünnung: laut dem Protokoll der Firma Microsynth wurden für eine 100 μ M Standardlösung der Forward-Primer mit 255.3 μ l Wasser und der Reverse-Primer mit 217 μ l verdünnt. Als Gebrauchslösung wurde eine 1:10 Verdünnung hergestellt: jeweils 10 μ l der jeweiligen Primer und 80 μ l Wasser.
- Polymerasenkettenreaktion (PCR): alle fünf Proben und eine negativ Kontrolle wurden amplifiziert.

Mastermix	μl
HotStartMix	39
H ₂ O	26
Primer- Gebrauchslösung	6,5

Jede Probe enthielt 11 μl Mastermix und 1 μl DNA. Für die negativ-Kontrolle wurde 11 μl Mastermix mit 1 μl Wasser vermischt.

Thermocycler-Programm	
1) Inkubation 94°C	15 min
2) Inkubation 95°C	25 sec
3) Inkubation 57°C	30 sec
4) Inkubation 72°C	1 min
5) Ab Schritt 2) 33 weiter Zyklen	
6) Bei 6°C	halten

- Gelelektrophorese: Eine Gelelektrophorese wurde durchgeführt zur Kontrolle der PCR. Zunächst wurde ein 1%iges Agarosegel hergestellt:

1% Agarosegel	
Agarosepulver	1 g
Buffer TBE	100 ml
Gel Red TM Nucleic Acid	10 μl

Zu jeweils 5 μl PCR-Produkt wurden 3 μl loading-Buffer hinzugefügt. Alle Proben wurden dann gemeinsam mit 2 Standards aufgetragen. An die Elektrophoresekammer wurden 130 V angelegt bei 400 mA für 40 min.

Bedingt durch die negative Ladung der DNA, wandern die DNA-Fragmente Richtung Kathode, lange Fragmente langsamer und kurze schneller. [20] Erwartet wurde, dass bei optimaler PCR-Reaktion alle DNA-Fragmente aller Proben gleichweit wandern. Für die negativ-Kontrolle sollte sich keine Bande in der Gelelektrophorese ergeben und somit eine Probenverunreinigung ausschließen.

Unter UV-Licht konnten die erwarteten Ergebnisse bestätigt werden.

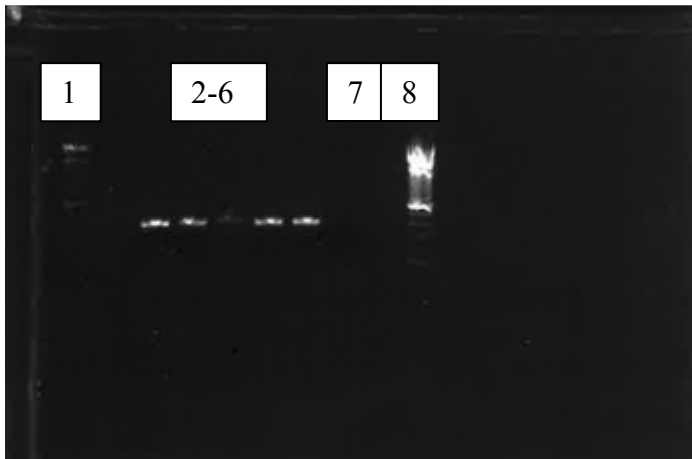


Abbildung 6: Ergebnisse der Gelelektrophorese unter UV-Licht: Auf Bahn 1 und 8 finden sich die jeweiligen Standards. Auf Bahn 2-6 wurden die einzelnen PCR-Produkte (MR15-1 -5) aufgetragen. Alle wanderten dabei erwartungsgemäß gleich weit, wodurch von einer Amplifikation gleich langer Stücke ausgegangen werden kann. Bahn 7 enthält die negativ-Kontrolle, da sich keinerlei Fluoreszenz ergab, kann eine Probenverunreinigung mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

- Sanger-Sequenzierung: die überprüften PCR-Produkte wurden im nächsten Schritt für die Sequenzierung eingesetzt:

Mastermix	μl
H ₂ O	40.15
5 fach Buffer	7.7
Big Dye 3.1.	2.75
forward Primer	1.65

Es wurde zu jeweils 0.5 μl PCR-Produkt 9.5 μl Mastermix hinzugefügt.

Thermocycler-Programm	
1) Inkubation 96°C	30 sec
2) Inkubation 50°C	15 sec
3) Inkubation 60°C	4 min
Ab Schritt 1) 24 weitere Zyklen	
4) Bei 6°C	halten

Das Prinzip hinter diesem der PCR ähnlichen Schritt verhält sich wie folgt: Dem PCR-Ansatz sind neben den vier herkömmlichen Nucleotiden, sogenannte Dideoxynucleotide beigemischt. Diese sind mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen versehen. Wird bei der Synthese nun ein solches fluoreszenzmarkiertes Nucleotid eingebaut, kommt es zum Stopp der Synthese, da die 3' OH-Gruppe fehlt, welche für die Bindung des nächsten Nucleotides benötigt wird. Es handelt sich dabei um eine sogenannte Kettenabbruch-Synthese. Statistisch gesehen kommt es nun an jeder einzelnen Position einmal zum Abbruch. [21]

Vor der Sequenzierung wurden die Proben zur Entfernung überschüssiger Reagenzien gereinigt. Um eine auswertbare Sequenzierung der reinen PCR-Produkte zu gewährleisten, wurden die Proben mittels Sephadex® G-50 Superfine (Hersteller: Sigma-Aldrich) gefiltert.

Bei der Sequenzierung kommt es in Kapillaren zur Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe, die Abfolge der Basensequenz (markiert durch vier unterschiedliche Farben) wird von einem Laser bestimmt. [21]

3 Ergebnisse – Resultate

3.1 Phänotypische Beschreibung

Die limitierten klinischen Beschreibungen der Betroffenen verhinderten eine exakte differenzialdiagnostische Zuordnung des vorhandenen Phänotyps. Aufgrund der Beschreibung des Phänotyps, die ausschließlich das Vorhandensein einer Intelligenzminderung dokumentiert, konnte auf eine nicht syndromale Intelligenzminderung geschlossen werden. Im Rahmen der folgenden Ergebnisse stellt sich aufgrund einiger Kandidatengene die Frage nach einer möglichen metabolischen Ursache. In einem solchen Fall könnten möglicherweise zusätzliche phänotypische Ausprägungen vorliegen, jedoch wurden diesbezügliche keine Angaben vom Gomal Centre of Biochemistry and Biotechnology (Gomal University Dera Ismail Khan, Khyber-Pakhtoonkhwa, 29050, Pakistan) übermittelt. Mögliche Fragestellungen an die betroffene Familie (MR15) zur weiteren Abklärung wären beispielsweise: Zeitpunkt des Auftretens der Symptomatik? Entwicklungsverzögerungen? Vermindertes Wachstum? Fütterungsprobleme? Psychomotorische Auffälligkeiten? Falls durchführbar, sollte eine genauere Abklärung des Phänotyps der Betroffenen über Kooperationspartner vor Ort noch erfolgen.

3.2 Stammbaumanalyse

Die Analyse des Stammbaumes ergab mit hoher Wahrscheinlichkeit das Vorliegen eines autosomal-rezessiven Erbgangs, da sowohl Männer als auch Frauen ca. gleich häufig betroffen sind und sich nicht in jeder Generation ein Betroffener/ eine Betroffene befindet.

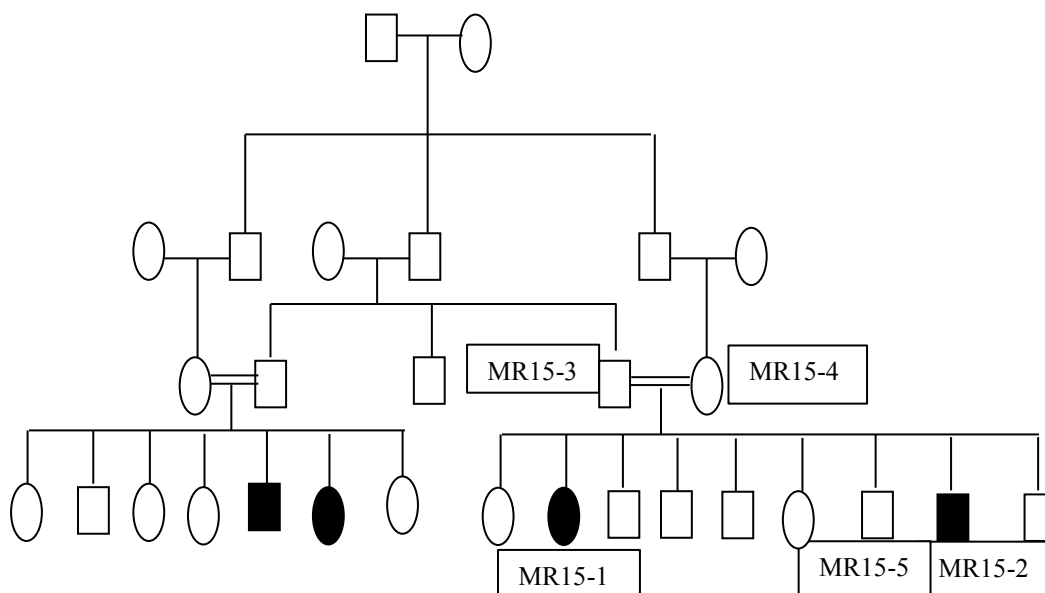


Abbildung 7: Stammbaum der MR-15 Familie. Die erhaltenen Proben wurden anonymisiert und mit MR15-1 bis MR15-5 beschriftet.

3.3 Datenauswertung der Exom Sequenzdaten

Die gesamte Analyse und Annotierung der Exomsequenzdaten wurden durch Peter Ulz (Institut für Humangenetik Graz) ausgeführt. Sämtliche Daten der Exom-Sequenzierung wurden in ein BAM-File transferiert und konnten somit im „IGV“ dargestellt und bewertet werden. Wichtig in der Beurteilung ist, ob sich die Daten in angereicherten oder nicht-angereicherten Bereiche befinden, diese „off target reads“ müssen im Zuge der Filterung entfernt werden (siehe 3.3). Die Qualität der Daten wird durch „Reads“ und „Coverage“ bestimmt. „Reads“ geben an wie oft die jeweilige Basenabfolge sequenziert wurde und „Coverage“ wie oft sich die „Reads“ für eine Base überlagern. Es sollte eine Coverage von über 50 „Reads“ erreicht werden.

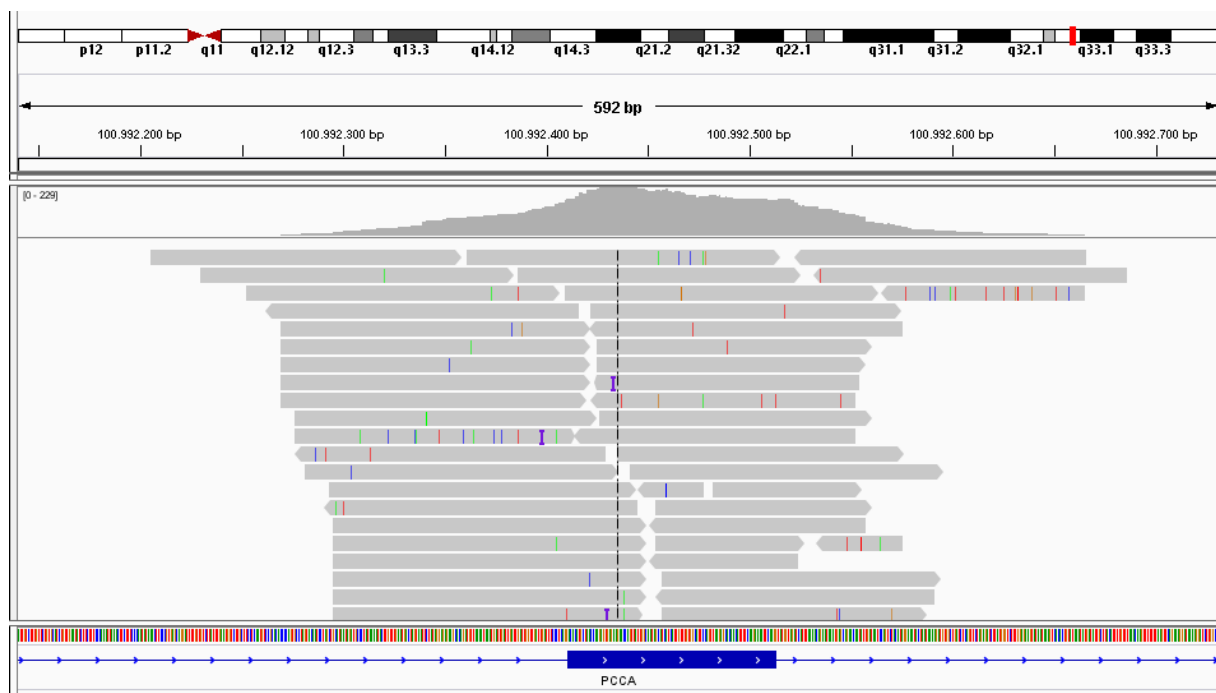


Abbildung 8: Ausschnitt des PCCA-Gens: die grauen Balken geben die „Reads“ in diesem Bereich an. Die Überlagerung der Balken die „Coverage“. Weiters kann der genaue Genbereich abgelesen werden.

3.4 Filterung der Daten

Die Daten der Exom-Sequenzierung wurden in ein VCF- File (Variant Call Format) transferiert und gespeichert. Als nächstes wurden die Ergebnisse mit dem online-Tool „Homozygosity-Mapper“ [www.homozygositymapper.org] und dem Programm „illumina Variant Studio“ ausgewertet.

Zuerst wurden im „Homozygosity-Mapper“ homozygote Bereiche identifiziert, welche größer als 4MB (= mega Basen) waren. (Abbildung 6) Da es sich um eine autosomal-rezessive Vererbung handelt, muss bei der Betroffenen die krankheitsverursachende Mutation als homozygotes Allel vorliegen. Durch die Konsanguinität in der Familie finden sich ungewöhnlich große Homozygotie-Bereiche, welche in unserer westlichen Population nicht zu erwarten wären.

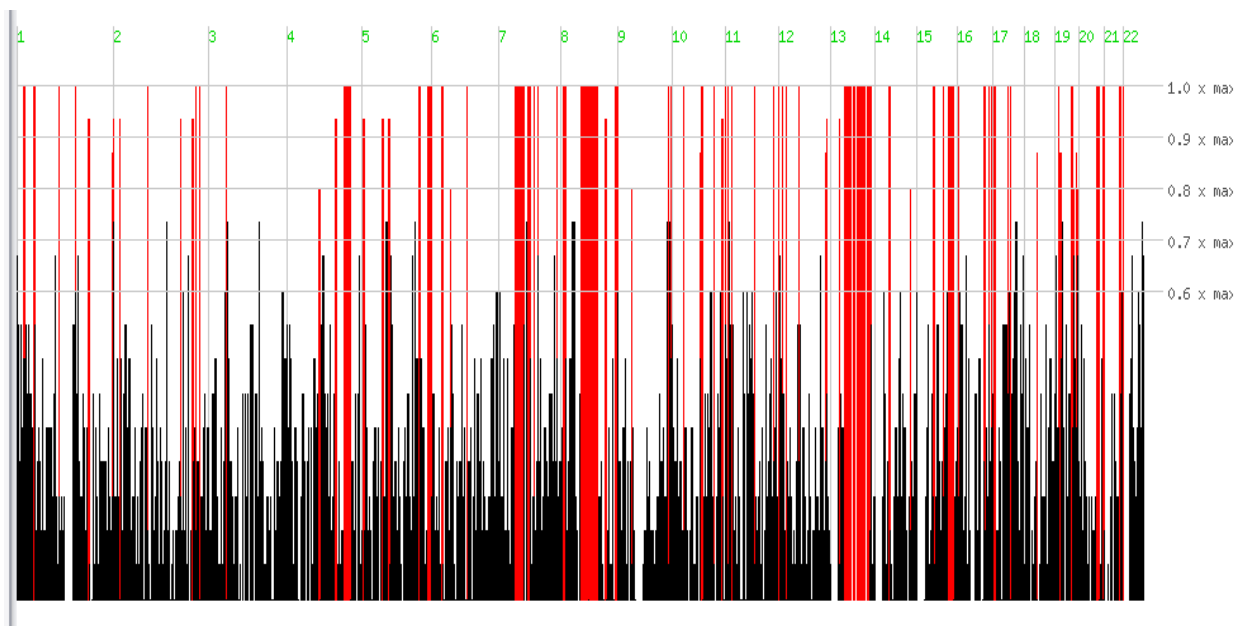


Abbildung 9: Die Nummerierung in der Abbildung bezieht sich auf die 22 Chromosomen. Die großen roten Banden zeigen die Homozygotie-Bereiche für MR15-1 an.

Dabei ergaben sich für die betroffene Person MR15-1 folgende Homozygotie-Bereiche:

chr4:145,041,750-164,435,265
chr5:169,715,038-179,071,836
chr7:40,899,967-64,853,663
chr7:74,251,390-82,581,535
chr8:7,698,527-11,872,949
chr8:52,733,148-71,012,811
chr8:72,211,834-97,239,126
chr13:36,939,758-101,287,340
chr14:34,047,414-38,061,742
chr15:81,212,521-94,884,108
chr20:42,965,863-52,192,408

Tabelle1: Position der Homozygotie-Bereiche welche Größer als 4mb waren.

Die homozygoten Regionen wurden dann in „illumina Variant Studio“ übertragen und nach SNPs (=Single Nucleotid Polymorphismen) in diesen Bereichen gesucht. Aufgrund der niedrigen Prävalenz der vorliegenden Erkrankung, wurden alle Varianten mit einer höheren Allelfrequenz als 1% aus der Analyse exkludiert.

Weiters wurden alle SNPs herausgefiltert deren Genotyp heterozygot ist. Heterozygote SNPs in Homozygotie-Bereichen zumeist in intronischen Bereichen lokalisiert, und sind als Artefakte einzustufen, da in diesen Bereichen oft zu wenige „Reads“ für einen Abschnitt vorhanden sind, um dafür eine gültige Aussage über den Genotyp zu machen. Zwei weitere heterozygote SNPs fanden sich im Randbereich eines Homozygotie-Bereiches und sind vernachlässigbar, da in diesen Bereichen von einer gewissen Ungenauigkeit der Homozygoty Mapping Analyse ausgegangen werden kann. Eine visuelle Überprüfung all dieser heterozygoten SNPs erfolgte im „IGV“.

In einem nächsten Schritt wurde nach der möglichen Auswirkung der Variation auf Basensequenz bzw. Aminosäuresequenz (Rubrik „Consequences“ siehe Abbildung 10) gefiltert.

Für die gesamten Exom-Daten ergaben sich bei Auswertung mit dem Programm „PhenIX“ folgende Übersicht aller Varianten:

missense	11547
stopgain	148
splicing	161
frameshift truncation	145
frameshift elongation	120
frameshift substitution	3
inframe insertion	130
inframe substitution	0
stoploss	40
frameshift duplication	12
inframe duplication	2
startloss	1
ncRNA exonic	2955
ncRNA splicing	14
UTR3	987
UTR5	1302
synonymous	9385
intronic	7783
ncRNA intronic	156
upstream	169
downstream	59
intergenic	582
error	1

Tabelle 2: es werden sämtliche Varianten, welche sich nach der Exom-Sequenzierung aus den Daten ergaben, näher klassifiziert. Neben der Art der Variante ist die dazugehörige Anzahl angegeben.

Varianten, für die folgende „Consequences“ angegeben sind, wurden nicht in die weitere Analyse miteinbezogen: downstream gene variant, upstream gene variant, missense variant, intron variant, non coding –exon- variant, prime-UTR-variant, splice region variant und leer (d.h. das Programm „illumina Variant studio“ konnte keine Aussage über die Art der Variante treffen).

Ausgewählt wurden schließlich jene SNPs deren „Consequences“ missense variant, splice region variant und leer waren.

Entfernt wurde auch jene Daten, deren Qualität nicht zufriedenstellend (FBQualDepth) und somit auch nicht aussagekräftig war. (Abbildung 6)

Gene	Variant	Chr	Coordinate	Type	Genotype	Exonic	Filters	Quality	Consequence	Allele Freq
TMEM154	A>G/G	4	153565567	snv	hom	yes	PASS	372973	missense_variant, spli	0
N/A	A>G/G	5	175353627	snv	hom	no	PASS	82124		0
ARL10	T>C/C	5	175792583	snv	hom	yes	PASS	5633	missense_variant	0
GPRIN1	T>C/C	5	176025938	snv	hom	yes	PASS	74865	missense_variant	0,32
PROP1	T>C/C	5	177422876	snv	hom	yes	PASS	284763	missense_variant	0,14
N/A	A>G/G	7	46732428	snv	hom	no	PASS	82959		0,69
TNS3	G>A/A	7	47342710	snv	hom	yes	PASS	72063	missense_variant	0,05
ABCA13	A>G/G	7	48545976	snv	hom	yes	PASS	28305	missense_variant	0
FIGNL1	T>C/C	7	50514693	snv	hom	yes	PASS	306948	missense_variant	0
DDC	T>C/C	7	50611735	snv	hom	yes	PASS	350062	missense_variant	0,78
SUMF2	C>A/A	7	56136260	snv	hom	yes	PASS	261175	missense_variant	0,14
UPK3B	T>C/C	7	76144560	snv	hom	yes	PASS	35225	missense_variant	0,82
SGK223	C>T/T	8	8235092	snv	hom	yes	PASS	37046	missense_variant	0
C8orf74	C>T/T	8	10530218	snv	hom	yes	PASS	136605	missense_variant	0,92
FAM167A	A>C/C	8	11301753	snv	hom	yes	PASS	96836	missense_variant	0,27
N/A	A>G/G	8	11872723	snv	hom	no	PASS	28937		0,64
RP1	G>A/A	8	55540787	snv	hom	yes	PASS	531873	missense_variant	0
LY96	A>G/G	8	74917084	snv	hom	yes	PASS	316866	missense_variant	0,92
PEX2	A>G/G	8	77895865	snv	hom	yes	PASS	297698	missense_variant	0,82
DPY19L4	G>C/C	8	95746966	snv	hom	yes	PASS	455843	missense_variant	0
FREM2	T>C/C	13	39263714	snv	hom	yes	PASS	1459	missense_variant	0
KBTBD7	G>A/A	13	41767978	snv	hom	yes	PASS	95881	missense_variant	0
LRCH1	T>C/C	13	47260054	snv	hom	yes	PASS	147066	missense_variant	0,14
EBPL	C>T/T	13	50237257	snv	hom	yes	PASS	219929	missense_variant	0
CKAP2	A>G/G	13	53035925	snv	hom	yes	PASS	188058	missense_variant	0,05
GPC6	A>G/G	13	95055466	snv	hom	yes	PASS	314674	missense_variant	0
FARP1	T>C/C	13	99093094	snv	hom	yes	PASS	115703	splice_region_variant,	0
PCCA	G>A/A	13	101167821	snv	hom	yes	PASS	148864	splice_region_variant,	0
INSM2	A>G/G	14	36004075	snv	hom	yes	PASS	97102	missense_variant	0,32
GOLGA6L10	T>C/C	15	82636940	snv	hom	yes	PASS	13271	splice_region_variant,	0
GOLGA6L10	C>T/T	15	82637061	snv	hom	yes	PASS	34592	missense_variant	0
GOLGA6L10	C>T/T	15	82637079	snv	hom	yes	PASS	29083	missense_variant	0
TICRR	T>C/C	15	90144615	snv	hom	yes	PASS	170189	missense_variant	0,73
GDPGP1	A>G/G	15	90784207	snv	hom	yes	PASS	62899	missense_variant	0,05
PRC1,PRC1-A	G>T/T	15	91524841	snv	hom	yes	PASS	157515	missense_variant	0,23
RGMA	A>C/C	15	93588336	snv	hom	yes	PASS	297197	missense_variant	0
N/A	G>A/A	20	43090584	snv	hom	no	PASS	60514		0,05
ADA	C>T/T	20	43264927	snv	hom	yes	PASS	166593	splice_region_variant,	0,96
TMEM189-UE	T>C/C	20	48770159	snv	hom	yes	PASS	1253	missense_variant	0,09
FAM65C	G>A/A	20	49225233	snv	hom	yes	PASS	64844	missense_variant	0,18
KCNG1	C>G/G	20	49620689	snv	hom	yes	PASS	185744	missense_variant	0

Abbildung 10: zeigt einen Ausschnitt der Daten nach der endgültigen Filterung.

3.5 Priorisierung der gefilterten Varianten

Die weitere Auswertung der Daten um die krankheitsverursachende Mutation zu finden, erfolgte über vier unterschiedliche Analyseansätze:

Kandidatengenanalyse:

In einem ersten Schritt wurden alle SNPs mit zugehörigen Genen, welche sich nach der letzten Filterung ergaben, mit der Datenbank „ID Gene Database Project“ abgeglichen, in welcher ID-assoziierte Gene gelistet sind. Dabei kam es zu einer Übereinstimmung von drei Genen: PEX2 (OMIM: 170993), ADA (OMIM: 608958) und PCCA (OMIM: 232000). Da von einer Vollständigkeit dieser Datenbank nicht ausgegangen werden kann, mussten anderen Strategien verfolgt werden, um einerseits die übereinstimmenden Gene zu bestätigen und andererseits weitere mögliche Übereinstimmungen zu finden.

Bewertung der Varianten im „UCSC Genome Browser“:

Im „UCSC Gene Browser“ wurden in sämtlichen Homozygotie-Bereichen jene SNPs näher betrachtet, welche als „OMIM-Genes“ gelistet sind, also eine Zuordnung zu einem Phänotyp besteht. Im Hinblick auf einen ID-assoziierten Phänotyp ergaben sich dabei: PEX2, ADA, PCCA, DDC (OMIM: 107930) und GPC6 (OMIM: 604404).

Bewertung struktureller Veränderungen:

Zur Bewertung struktureller Veränderungen (z.B. Deletion) in Homozygotie-Bereichen wurden die Exom-Daten in ein sogenanntes „lumpy-File“ überführt. Dieses zeigt sämtliche strukturelle Veränderungen im Exom der Betroffenen. Für die Homozygotie-Bereiche fanden sich zwei strukturelle Veränderungen (chr13:98721250, chr4:150726426) in Form von einer möglichen Deletion und einer Translokation. Im „IGV“ wurden diese überprüft. Dabei zeigte sich, dass diese strukturellen Veränderungen nicht bewertbar waren, da sie sich in tief-intronischen Regionen befinden. Außerdem wird dieser Bereich nicht durch genügend „Reads“ abgedeckt, um eine gültige Aussage zu treffen.

Phänotypcharakterisierung mittels PhenIX:

Die gefilterten Daten (nur Varianten aus den Homozygotie-Bereichen) wurden in Form einer VCF-Datei in das Programm „PhenIX“ eingegeben und nach einer Phänotyp-Genotyp Korrelation für ID gesucht. Der verwendete HPO (=Human Phenoty Ontology) Term war HP:0001249 (=intellectual disability). Sämtliche gelisteten Varianten im Programm „PhenIX“ sind in möglichen Krankheitsgenen lokalisiert. Varianten in Genen, die bisher noch keiner hereditären Erkrankung zugeordnet sind, werden nicht priorisiert. Zusätzlich werden sämtliche Varianten in nicht-codierenden Bereichen und stille Mutationen herausgefiltert. Die Listung der Ergebnisse erfolgt durch „dbnSFP“ (=database for nonsynomyous SNPs‘ functional predictions), d.h. die Varianten werden proirisiert auf Grund von Frequenz, Pathogenität, Qualität und Vererbungsmodus. Varianten in folgenden Genen ergaben sich durch die Auswertung mit „PhenIX“:

- 1) GPC6 (OMIM: 604404)
- 2) RP1 (OMIM: 603937)
- 3) ARL10
- 4) KCNG1
- 5) DPY19L4
- 6) GOLGA6L10
- 7) EBPL
- 8) TMEM154
- 9) KBTBD7

Die Analyse mit „PhenIX“ ergab acht Kandidatengene, jedoch ist zu beachten, dass es zu den Genen (Nr.3-9) keinen phänotypischen OMIM-Eintrag gibt. Die Gene Nr.3-9 kamen somit als Kandidatengene nicht in Frage, da sie laut OMIM keine Zuordnung zu einem Phänotyp haben. Warum andere bereits über UCSC gefunden Kandidatengene hier nicht angezeigt wurden, kann daran liegen, dass diese von „dbnSFP“ nicht priorisiert wurden. PCCA wird höchstwahrscheinlich nicht als Kandidatengen erkannt, da „PhenIX“ diese als stille Mutationen klassifiziert.

3.6 Auswahl des Kandidatengenes

Nach der Datenbearbeitung wurde von den möglichen Kandidatengenen das PCCA-Gen für die weitere Segregationsanalyse ausgewählt. Die Wahl fiel auf das PCCA-Gen, da dessen Phänotyp Propionazidämie am mit der phänotypischen Beschreibung der Betroffenen Übereinstimmung zeigt. Andere Kandidatengene wurde aus unterschiedlichen Gründen nicht ausgewählt. Eine Mutation im PEX2-Gen könnte sich phänotypisch als Zellweger-Syndrom zeigen. Im Falle der Betroffenen wird jedoch eine nicht-syndromale Ursache vermutet. Die Phänotypen Retinitis pigmentosa (Gen: RP1), Adenosindeaminase-Mangel (Gen: ADA), Omodysplasie (Gen: GPC6) und Aromatische L-Aminosäure Decarboxylase-Mangel (Gen: DDC) weisen zusätzliche charakteristische Symptome auf, welche in der Beschreibung des Phänotyps der Betroffenen nicht aufscheinen [8].

Für das untersuchte betroffene Individuum ergab sich im PCCA-Gen eine Mutation auf Position chr13:101167821(GRCh37/hg19), wobei es zu einem Basenaustausch von G zu A kommt (g.101167821 G>A, c.2040 G>A, NM_000282, rs369982920).

Es handelt sich dabei um eine stille Mutation, da sich für beide Basen die Aminosäure Alanin ergibt. Der Basenaustausch ist direkt vor einer „splice donor site“ noch im exonischen Bereich lokalisiert (siehe Abbildung 11) Die Variante könnte somit eine mögliche Auswirkung auf das „splicing“ haben.

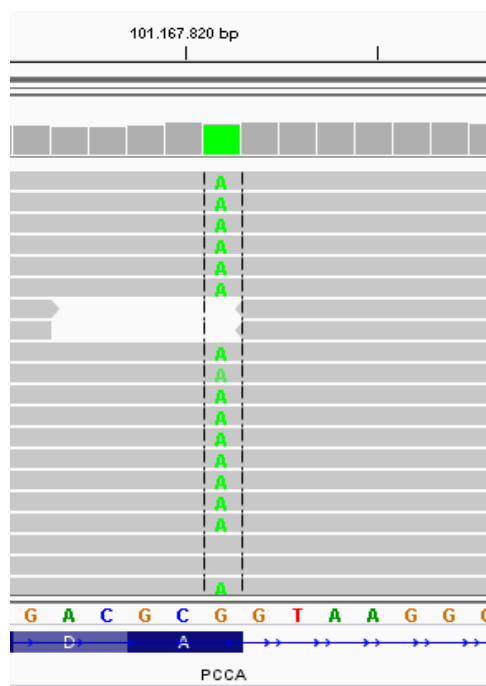


Abbildung 11: Ausschnitt aus dem „IGV“. Es findet ein Austausch von G zu A genau vor einer „splice donor site“ statt. Eine ausreichende „Coverage“ (57) ermöglicht eine gültige Aussage über diesen Bereich.

Um mögliche Auswirkungen auf das „Splicing“ ausschließen zu können, beziehungsweise zu bestätigen, wurde im nächsten Schritt die Referenz--Sequenz des Exon 22 des PCCA-Gens in ein „splice-site-prediction- Programm (Berkeley Drosophila Genome Project)“ eingegeben. Dieses Programm erfasst ausschließlich Gene, welche als „splice donor site „ GT und als „splice acceptor site“ AG haben. Das Ergebnis wird in einem Score für eine potentielle „splice site“ angegeben.

Bei diesen Analysen ist gemäß den Angaben von „Berkeley Drosophila Genome Project“ mit ca. 5% falsch-positiven Ergebnissen zu rechnen. Zu 6% werden korrekte „splice donor sites“ und zu 9% korrekte „splice acceptor sites“ als solche nicht erkannt.

Für das Referenzgenom ergab sich für die betroffene „Splice Donor Site“ von Exon 22 des PCCA ein Score von 1.

Wird nun dieselbe Exon-Sequenz mit der Variante der Betroffenen eingegeben, so ergibt sich eine Reduktion des Scores auf 0.81. Eine Verringerung des Scores weist darauf hin, dass die „splice donor site“ des veränderten Exons 22 nicht mit derselben Sicherheit wie beim Referenzgenom erkannt werden kann. Folglich steht die Mutation im Verdacht eine Auswirkung auf die „splice donor site“ zu haben.

Donor site predictions for hg19_dna :

Start	End	Score	Exon	Intron
565	579	0.97	gtacaag	gtgaatat
700	714	1.00	agacgag	gtaagggc
1169	1183	0.95	ttacttg	gtaaataa
1377	1391	0.85	ttccag	gtacactt
1560	1574	0.61	aaatcag	gtagttgg

Donor site predictions for hg19_dna :

Start	End	Score	Exon	Intron
565	579	0.97	gtacaag	gtgaatat
700	714	0.81	agacgag	gtaagggc
1169	1183	0.95	ttacttg	gtaaataa
1377	1391	0.85	ttccag	gtacactt
1560	1574	0.61	aaatcag	gtagttgg

Abbildung 12: Ergebnisse des „splice prediction – Programmes (Berkeley Drosophila Genome Project)“: rot umrandet die Ergebnisse für die „splice site donor prediction“ für Exon 22 von PCCA. Blau umrandet im oberen Bild die Referenzsequenz und im unteren Bild die Mutation der Betroffenen (G>A).

Betrachtet man nun im Vergleich die „splice consensus sequence“ wird deutlich, dass die Base Guanin vor der „splice donor site“ wahrscheinlicher ist als Alanin.



Abbildung 13: (Bildauschnitt) zeigt die „Splice consensus sequence“. Rot umrandet die Basen der „splice donor site“ (GT) und die Base am 5' Ende davor.

Bezugnehmend auf die Variante im Exon 22 des PCCA-Gens (G>A) lässt sich im „UCSC“ Genome Browser zeigen, dass die Base Guanin an der Position chr13:101.167.821 in vielen Spezies hochkonserviert ist (Abbildung 14). Bei einer Variante von G>A ergibt sich eine Allelfrequenz von 0,0016%; d.h. eine solche ist sehr selten. Andererseits handelt es sich bei der gefundenen Variante um eine stille Mutation, bei der jedoch die Aminosäure Alanin nicht konserviert ist (Abbildung 15).

Alignment block 1 of 8 in window, 101167804 - 101167825

B	D	Human	GTCAAGCCTGGAGACGG	Ggt-aa
B	D	Chimp	GTCAAGCCTGGAGATGG	Ggt-aa
B	D	Gorilla	GTCAAGCCTGGAGACGG	Ggt-aa
B	D	Orangutan	GTCAAGCCTGGAGACGG	Ggt-aa
B	D	Gibbon	GTCAAGCCTGGAGACGG	Ggt-aa
B	D	Rhesus	GTCAAGCCTGGAGACAG	Ggt-aa
B	D	Crab-eating macaque	GTCAAGCCTGGAGACAG	Ggt-aa
B	D	Baboon	GTCAAGCCTGGAGACAG	Ggt-aa
B	D	Green monkey	GTCAAGCCTGGAGACAG	Ggt-aa
B	D	Marmoset	GTCAAGCCTGGAGACAT	Ggt-aa
B	D	Squirrel monkey	GTCAAGCCTGGAGACAT	Ggt-aa
B	D	Bushbaby	GTCAAGCCC GGCGACAT	Ggt-aa
B	D	Chinese tree shrew	GTCAAGCCTGGAGACAT	Ggt-aa
B	D	Squirrel	GTCAAGCCAGGGGACAT	Ggt-aa
B	D	Lesser Egyptian jerboa	GTCAAGCCTGGAGACAT	Ggt-aa
B	D	Prairie vole	GTCAAGCCTGGAGACAG	Ggt-aa
B	D	Chinese hamster	GTCAACCCCGGAGACAT	Ggt-aa
B	D	Golden hamster	GTCAAGCCAGGAGACAT	Ggt-aa
B	D	Mouse	GTCAAGCCTGGAGACAT	Ggt-aa
B	D	Rat	GTCAAGCCTGGAGACAT	Ggt-aa
B	D	Naked mole-rat	GTCAAGCCTGGAGACAT	Ggt-ag

Abbildung 14: zeigt einen Ausschnitt aus dem „UCSC Genome Browser“. Dargestellt wird der Bereich chr13: 101.167.804-101.167.825. Auf Position chr13:101.167.821 (rot markiert) ist zu erkennen, dass Guanin in andern Spezies ebenfalls konserviert ist.

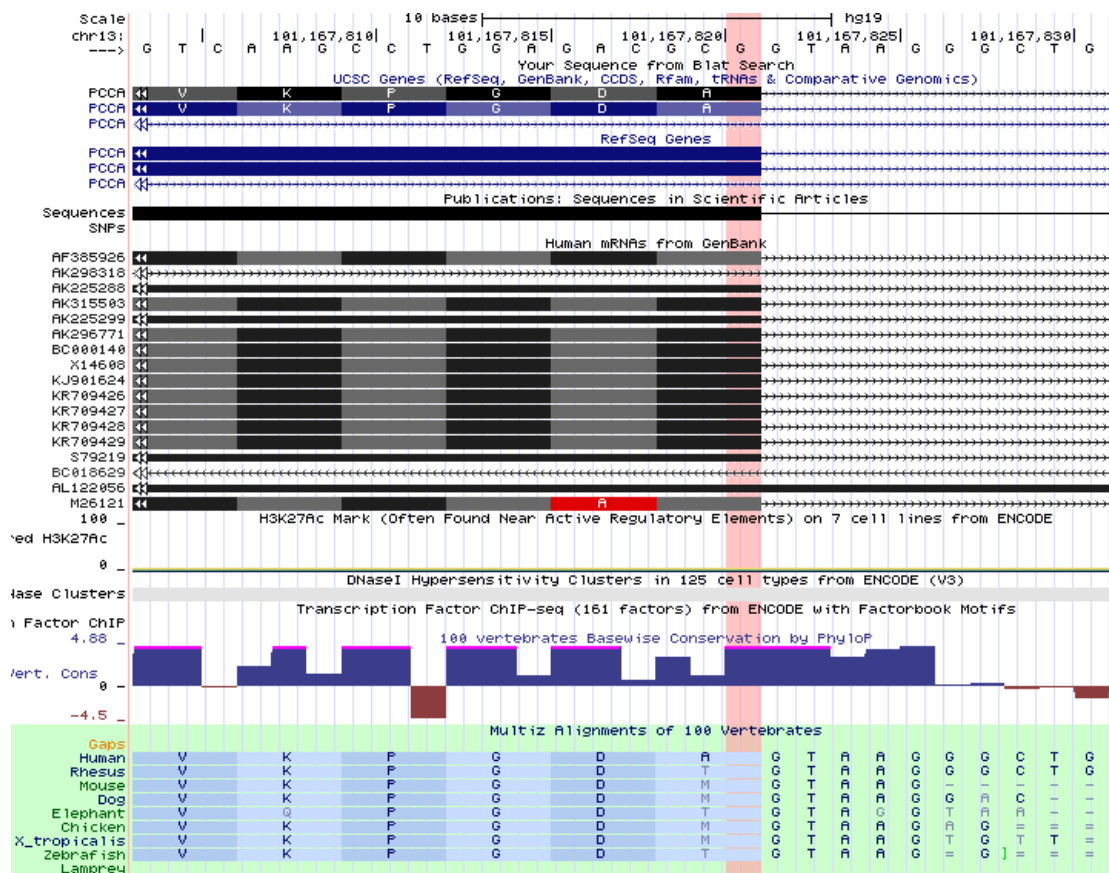


Abbildung 15: zeigt einen Ausschnitt aus dem „UCSC Genome Browser“. Die Position chr13:101.167.821 ist mit einem rosa Balken markiert. Es zeigt sich, dass die Aminosäure Alanin in anderen Spezies nicht konserviert ist.

3.7 Ergebnisse der Segregationsanalyse

Um PCCA als Kandidatengen zu bestätigen wurde eine Sanger-Sequenzierung für alle Familienmitglieder (deren Proben zugänglich waren MR1-1 – MR15-5) durchgeführt. Dabei sollte sich für beide betroffenen Familienmitglieder eine homozygote Mutation (+/+) ergeben. Die beiden Eltern (MR15-3 und MR15-4) müssten heterozygot (+/-) sein, da sie beide nicht-betroffen sind, aber betroffene Kinder haben. Der nicht-betroffene Bruder (MR15-5) müsste heterozygot (+/-) oder homozygot (-/-) sein. Folgende Ergebnisse zeigten sich nach der Sequenzierung:

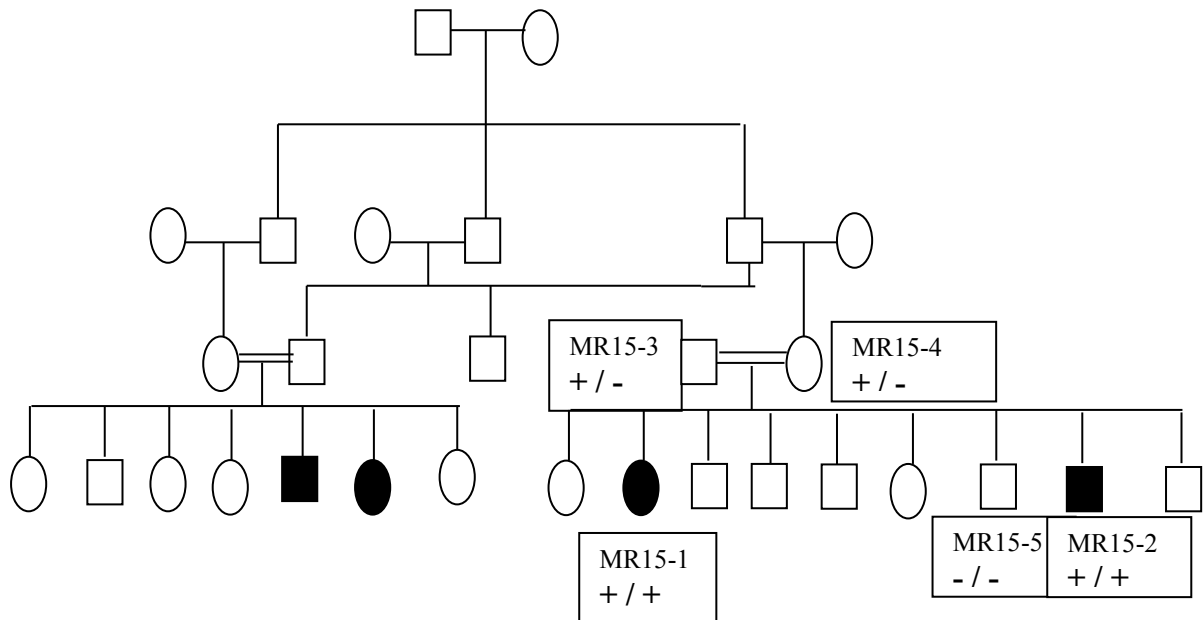
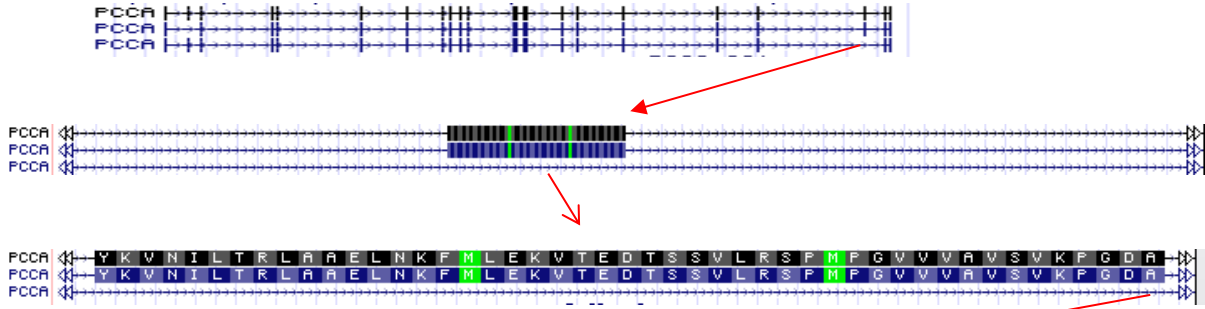
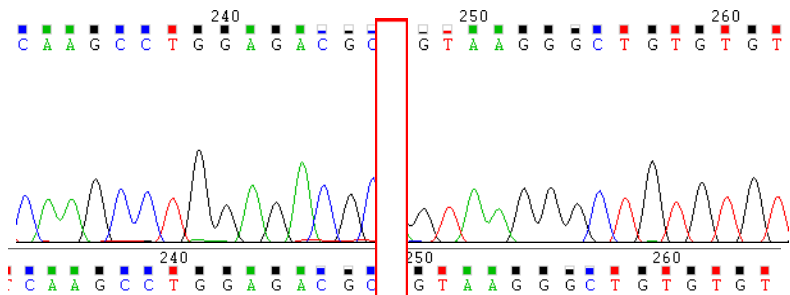


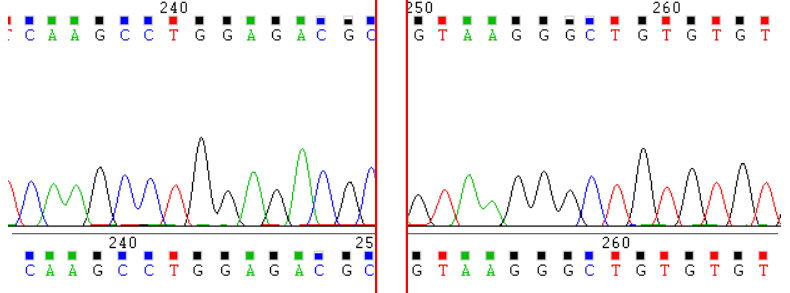
Abbildung 16: Stammbaum der MR15-Familie. Neben jedem untersuchten Individuum finden sich jeweils die Bezeichnungen für homozygot mit Variante (+/+), heterozygot (+/-) oder homozygot ohne Variante (-/-).



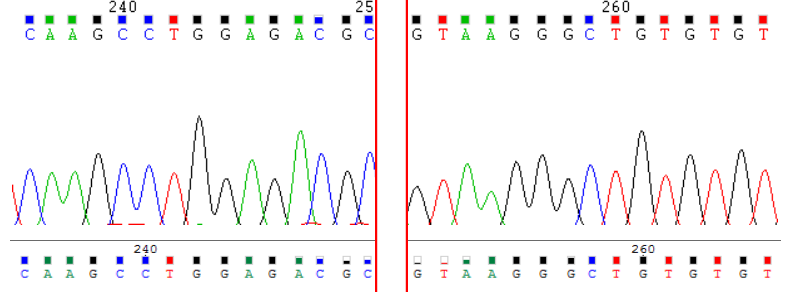
MR15-1



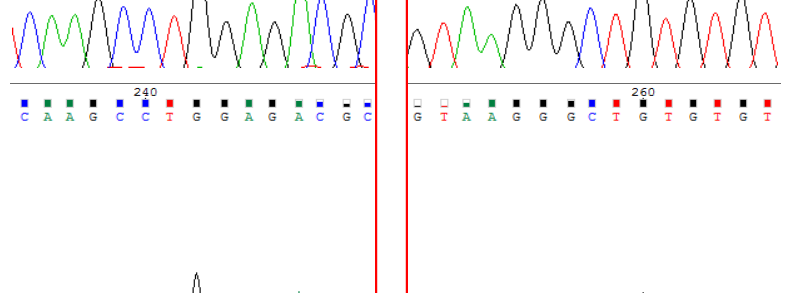
MR15-2



MR15-3



MR15-4



MR15-5

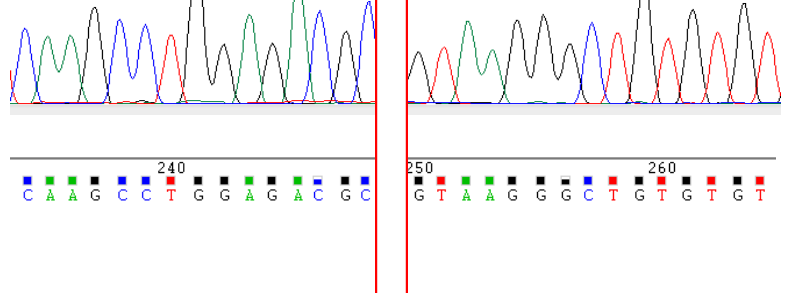


Abbildung 13: zeigt die Position der Variante mittels „UCSC Genome Browser“.[<http://genome.ucsc.edu>]. Darunter Darstellung der Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung mittels „Chromas“. An der markierten Position lässt sich bei den Betroffenen (MR15-1 und MR15-2) der Basenaustausch von G zu A ablesen. MR15-3 und MR15-4 sind für das Allel heterozygot und MR15-5 ist homozygot dafür, also ein Wildtyp.

3.8 PCCA-Gen und Propionazidämie

5.8.1 PCCA-Gen

Das PCCA-Gen liegt auf Chromosom 13 (chr13q32, chr13:100.741.269-101.182.691 [<http://genome.ucsc.edu>]) und codiert die alpha-Untereinheit ein Enzym namens Propionyl-CoA-Carboxylase. Sechs alpha-Untereinheiten und 6 beta-Untereinheiten (werden von PCCB-Gen codiert) bilden gemeinsam das funktionelle Enzym. Zusätzlich kann das Vitamin Biotin an die alpha-Untereinheit binden. [22]

Das Enzym Propionyl-CoA-Carboxylase ist in den Mitochondrien exprimiert und wird für den Abbau von Aminosäuren und Fettsäuren mit ungerader Anzahl von Ketten und Cholesterol benötigt.

Aminosäuren (Methionin, Threonin, Isoleucin, Valin), Lipide und Cholesterol werden in einigen Schritten zu Propionyl-CoA umgewandelt. Propionyl-CoA wird mit Hilfe der Propionyl-Coa-Carboxylase und Biotin unter Verbrauch von ATP zu Methylmalonyl-CoA umgewandelt. [22,23] In einem nächsten Schritt entsteht Succinyl-CoA, welches nun in den Citratzyklus eingehen kann zur Energiegewinnung. [23]

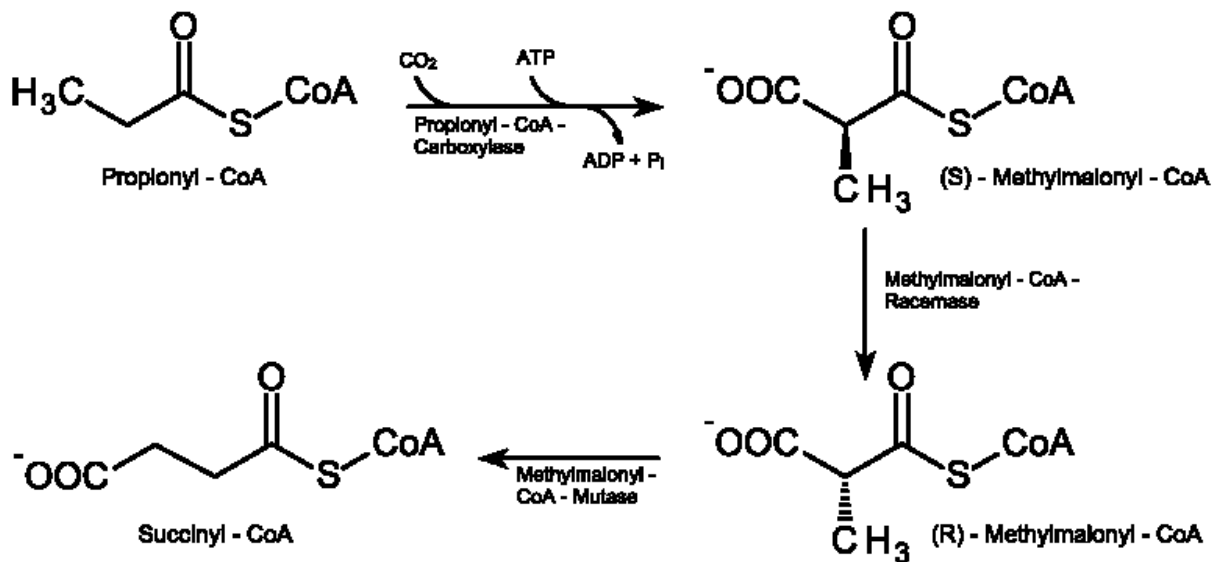


Abbildung 18: der Abbauweg von Propionyl-CoA zu Succinyl-CoA.

5.8.2 Propionazidämie

Propionazidämie (OMIM: 606054) ist gekennzeichnet durch ein Defizit der Propionyl-CoA-Carboxylase, d.h. sie fehlt komplett oder es liegt eine verringerte Enzymaktivität vor. Charakteristisch für diese Krankheit sind Episoden von metabolischer Dekompensation, neuronalen Dysfunktionen und möglichen Kardiomyopathien. [24]

5.8.2.1 Ätiologie

Ursächlich ist die Mutation des PCCA- oder PCCB-Gen, welche autosomal-rezessiv vererbt wird. [24] Durch das Defizit der Propionyl-CoA-Carboxylase können Propionyl-CoA und andere potentiell schädigende Verbindungen (siehe Abbildung 19) nicht weiter abgebaut werden, somit reichern sich viel zu hohe toxische Levels im Blut an. Diese führen zur Schädigung des Nervensystems und verursachen weitere assoziierte Krankheiten (siehe Symptomatik). Außerdem wird über den Krebszyklus weniger Energie gewonnen, da Propionyl-CoA nicht zu Succinyl-CoA abgebaut wird. [22]

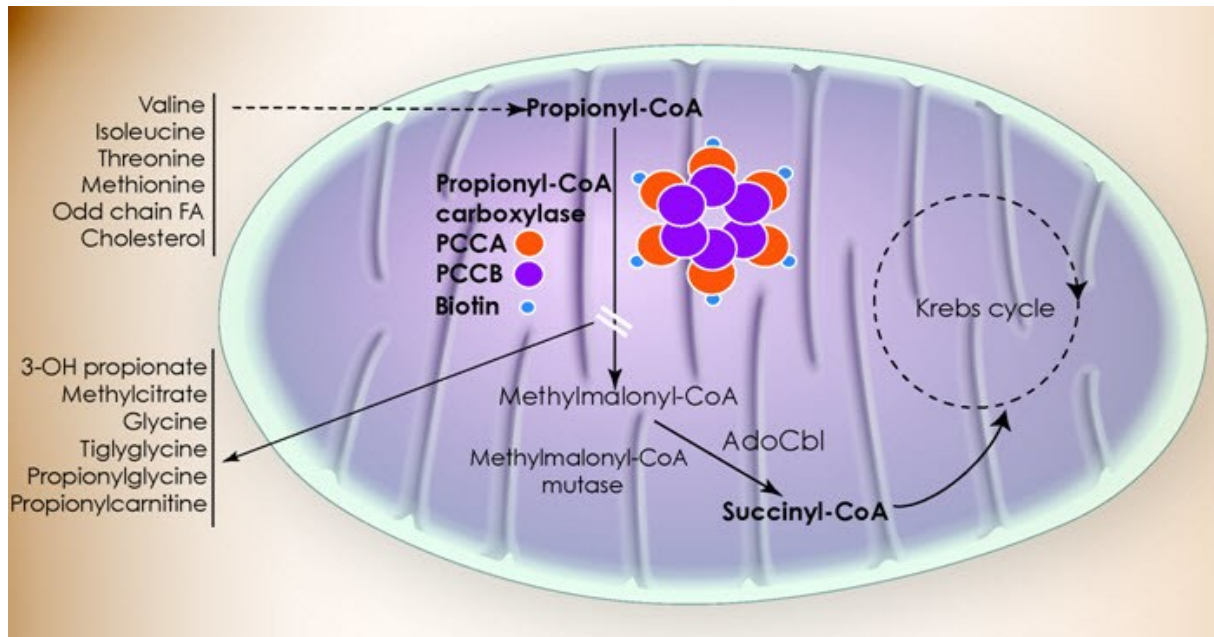


Abbildung 19: zeigt den Abbauweg von Propionyl-CoA zu Succinyl-CoA und jene Verbindungen, welche durch die unzureichende Arbeit der Propionyl-CoA-Carboxylase entstehen. [24]

5.8.2.2 Epidemiologie

Die Prävalenz liegt bei 1:100,000 weltweit [24], wobei sich besonders hohe Prävalenzen in Ländern wie beispielsweise Saudi Arabien, bei der Inunitbevölkerung und Amish-Gruppierungen finden. [26]

5.8.2.3 Klinische Krankheitsformen

Propionazidämie lässt sich in folgende Formen einteilen:

- Schwere „neonatal-onset“ Form: Neugeborene leiden an Fütterungsproblemen, Erbrechen, Lethargie, Krampfanfällen und Koma. [25] Hinzu kommt eine Panzytopenie innerhalb weniger Stunden bis Wochen nach der Geburt. [24]
- Periodische „late-onset“ Form: Die Krankheit wird erst nach einem Jahr oder später bemerkbar durch Episoden von metabolischer Dekompensation. Auslöser solcher Episoden können Fieber, Erbrechen oder ein Trauma sein. Zusätzlich kann es zu akuten neurologischen Krisen wie beispielsweise Dystonie, Rigor oder Demenz kommen. [24]

- Chronisch progressive Form: Sie ist gekennzeichnet durch Gedeihstörungen, chronisches Erbrechen, psychomotorische Defizite, Hypotonie, Krampfanfälle, Bewegungsstörungen, Intelligenzminderung, optische Neuropathie, Kardiomyopathie, Pankreatitis, Dermatitis und immunologische Dysfunktionen. [24]

5.8.2.4 Symptomatik

Die Symptomatik der Propionazidämie kann sehr unterschiedlich sein und variiert je nach Ausprägung der Krankheit. Folgend werden die häufigsten Symptome aufgelistet:

- Metabolische Dekompensation: Besonders in den ersten Lebensjahren können wiederholt Episode von metabolischer Dekompensation auftreten. Zur Symptomatik zählen beispielsweise Azidose, Hyperammonämie, Krampfanfälle und Enzephalopathie. Auslöser für solche Dekompensationen können Krankheit, Operationen oder andere metabolische Stressoren sein. Durch diese kommt es zum Abbau von Proteinen und somit zur Anhäufung von Aminosäuren, unter diesen befinden sich auch jene Aminosäuren, welche bei einer Propionazidämie nicht abgebaut werden können.
- Entwicklungsverzögerung: Diese ergibt sich aufgrund von Fütterungsproblemen und Erbrechen.
- Neurologische Symptomatik: Dazu zählen Hypotonie, Entwicklungsverzögerung, neurokognitive Defizite, schlaganfallähnliche Episoden, Krampfanfälle und Bewegungsstörungen. Betroffene neigen zu Basalganglienläsionen, besonders während Episoden metabolische Dekompensation. Basalganglieninfarkte können sich durch schlaganfallähnliche Episoden, Dystonie, Choreoathetose, Hemiplegie und veränderten mentalen Status präsentieren.
- Kardiomyopathien: Ist eine sehr häufige Symptomatik der Propionazidämie und kann bis zum Herzversagen führen.
- Arrhythmien: In Form von verlängerter QT-Zeit, Synkopen und Herzstillstand.
- Pankreatitis
- Dermatologische Symptomatik: Die Acrodermatitis enteropathica wird durch das Fehlen von essenziellen Aminosäuren ins besonderes Isoleucin ausgelöst. Dieser Mangel ergibt sich durch die therapeutische Protein-Diät.

- Hämatologische Symptomatik: Während einer akuten Dekompensation zeigen sich Neutropenie, Thrombozytopenie und selten Panzytopenie. Zusätzlich sind Betroffene anfälliger für Infektionen.
- Seltene Komplikationen: chronisches Nierenversagen, Verlust des Gehörs, Optikusatrophie und vorzeitige Ovarialinsuffizienz. [25]

5.8.2.5 Differenzialdiagnostik

Differenzialdiagnostisch sollte an eine Neugeborenenroseptis, Pylorusstenose, Kardiomyopathie oder andere Ursache für eine Azidose (z.B. diabetische Ketoazidose) gedacht werden. [25] Besonders im Hinblick auf die schwere neonatale Form müssen Kuhmilchallergie, Zölliakie oder Immundefizite als mögliche Ursachen in Betracht gezogen werden. [24]

5.8.2.6 Diagnostik

Diagnostisch kann im Neugeborenencreening Propionazidämie durch erhöhte Werte von Propionyl-Carnitin nachgewiesen werden. In Urinanalysen finden sich 3-Hydroxy-Propionat, Methyl-Citrat, Propionyl-Glycin und Propionyl-Carnitin, welche zwischen metabolischen Krisen persistieren. Symptomatische Patienten/ Patientinnen präsentieren sich während einer metabolischen Krise mit Azidose, Ketose, einer vergrößerten Anionlücke, Hyperlactämie, Hyperglycinämie, Hyperammonämie, Hyperglykämie und Zytopenie.

In der Pränataldiagnostik besteht die Möglichkeit das Fruchtwasser auf Propionyl-Carnitin, Methyl-Citrat und 3-Hydroxy-Propionat zu testen. Außerdem könnten direkt Mutationen in einer DNA-Probe nachgewiesen werden. [24]

Die Bestätigung der Diagnose Propionazidämie benötigt den Nachweis eines Defizits in der Enzymaktivität der Propionyl-CoA-Carboxylase oder einer Mutation im PCCA- bzw. PCCB-Gen. [24]

5.8.2.7 Therapie

Behandlung von akuter Dekompensation:

Die akute Dekompensation ist als Notfall zu betrachten und bedarf sofortiger Handlung. Zuerst sollte eine Behandlung des auslösenden Faktors erfolgen und die Proteinzufuhr gestoppt werden. Wichtig dabei ist eine ausreichende Kalorien Zufuhr beispielsweise in intravenöser Form zu gewährleisten. Ein Ausgleich des Säure-Basen-Haushaltes ist in der Akutsituation ebenfalls entscheidend. Eine Hyperglykämie und metabolische Azidose sind zu vermeiden. Im Falle der Hyperammonämie kann die Therapie mit Natriumbenzonat, Natriumphenylacetat oder einer Hämodialyse erfolgen. Die Gabe von intravenösem Carnitin soll der Entgiftung über die Niere förderlich sein. [24,25]

Prävention einer primären Manifestation:

Eine individuelle Diät bei der propionische Substanzen (Methionin, Threonin, Isoleucin, Valin) vermieden werden, sollte eingehalten werden. Dabei zu beachten ist, dass ein normaler Proteinstoffwechsel gesichert ist. Falls benötigt auch mit nasogastraler oder gastrostomaler Ernährung. Fasten ist auf jeden Fall zu vermeiden und bei Krankheit sollte auf eine vermehrte Kalorienaufnahme geachtet werden. Medikamentös stehen L-Carnitin, Metronidazol (um die Propionatproduktion der Bakterien der Darmflora zu verringern) und Carbamyl-Glutamat zur Verfügung. Individuell kann zusätzlich eine medikamentöse Therapie gegen Epilepsie und Herzarrhythmie notwendig sein. In äußeren Fällen kann eine Lebertransplantation indiziert sein, vor allem bei häufigen Dekompensationen, unkontrollierbarer Hyperammonämie oder zurückgebliebenen Wachstum. [25]

Prävention von Langzeitkomplikationen:

Die Proteinaufnahme soll regelmäßig von einem Ernährungsberater kontrolliert werden um einen vollständigen Proteinmangel zu vermeiden. Ein solcher Mangel führt beispielweise zu einem verzögerten Wachstum und einem Mangel an essentiellen Aminosäuren. [25]

5.8.2.8 Prognose

Frühzeitige Erkennung der Krankheit und vorzeitige Therapie metabolischer Dekompensationen wirken sich positiv auf die Prognose von Patienten/ Patientinnen aus. [27]

Eine richtige auf den Patienten/ die Patientin abgestimmte Ernährung kann möglicherweise die intellektuelle Entwicklung positiv beeinflussen. [24]

Häufige Entgleisungen des Stoffwechsels jedoch verschlechtern die psychomotorische Entwicklung. [28]

6 Diskussion

In dieser Arbeit wurde eine konsanguine Familie mit einer nicht-syndromalen Intelligenzminderung molekulargenetisch untersucht. Dabei ergab sich als eine mögliche Ursache der Intelligenzminderung eine Variante im PCCA-Gen (g.101167821 G>A, c.2040 G>A) in Form einer „splice site – Mutation“.

Fraglich ist ob diese Variante tatsächlich eine Auswirkung auf das „splicing“ des Exons 22 hat und diese auch krankheitsverursachend ist. Möglich wäre, dass die „splice donor site“ von Exon 22 nicht mehr erkannt wird und Exon 22 so während des „splicings“ entfernt wird. Sollte das der Fall sein, würde das Fehlen von Exon 22 keine Auswirkung auf die nachfolgenden Exons haben, da es sich bei der Anzahl der Basen von Exon 22 um ein Vielfaches von drei handelt und es so zu keinem „frameshift“ kommt. Jedoch könnte die Bildung der Struktur der alpha-Untereinheit der Propionyl-CoA-Decarboxylase durch das Fehlen von Exon 22 negativ beeinflusst werden und die Funktionsweise des gesamten Enzyms einschränken. Dieses Defizit der Propionyl-CoA-Dexcarboxylase würde im Phänotyp der Propionazidämie resultieren. Sollte es sich wirklich nur um ein Defizit und nicht um eine komplette Funktionsunfähigkeit des Enzyms handeln, kann im Falle der Betroffenen der Familie MR15 möglicherweise von einem milderem Phänotyp ausgegangen werden. Zu erwähnen ist, dass in einer Isoform (NM_001178004.1) Exon 22 nicht vorhanden ist (siehe Abbildung 17). Auch das könnte ein Hinweis darauf sein, dass es beim Fehlen von Exon 22 zur Ausprägung eines milderem Phänotyps kommt.

Zusätzlich stützt die Publikation „Propionic Acidemia: Identification of Twenty-Four Novel Mutations in Europe and North America“ [29] die These, dass es durch die „splice site-Mutation“ zu einer Entfernung des Exons 22 kommt und dadurch die alpha-Untereinheit der Propionyl-CoA-Decarboxylase in ihrer Funktion eingeschränkt wird. In der genannten Arbeit konnten die Autoren eine „splicing-Mutation“ identifizieren, die dazu führt, dass Exon 23 durch das „splicing“ überlesen wird und es zu einem sogenannten „exon skipping“ kommt. Als Folge ergibt sich, dass die Biotinin bindende Domäne der alpha-Untereinheit eliminiert wird. Phänotypisch resultiert daraus die milde „late-onset“ Form der Propionazidämie. Patienten/ Patientinnen mit großen Deletionen, Insertionen und „missense-Mutationen“ leiden im Gegensatz dazu oft an einer schwereren Form der Krankheit. [29] Es ist möglich, dass Exon22, welches für Teile der Biotinin bindende Domäne codiert, vielleicht auf ähnliche oder gleiche Art die Funktionalität der alpha-Untereinheit der Propionyl-CoA-Dexcarboxylase negativ beeinflusst.

Allgemein ist zu sagen, dass 10% aller pathogenen Mutationen „splice sites“ betreffen. Im PCCA- und PCCB-Gen kommen „missense-Mutationen“ am häufigsten vor. Insertionen, Deletionen und „splicing-Mutationen“ sind dagegen seltener. [30]

Zur Abklärung der Variante und deren möglichen Folgen auf das „splicing“ könnte eine RNA-Untersuchung durchgeführt werden. Dafür würden jedoch erneut Blutproben der Familie MR15 und ein Aufklärungsgespräch nötig sein. Es könnten sich dabei Probleme ergeben, da die Kommunikation mit der Familie nur über dritte möglich ist und diese möglicherweise einer weiteren Blutabnahme nicht mehr zustimmt. Sollten keine Proben mehr zugänglich sein, wäre eine RNA-Analyse über „minigene-Vektoren“ denkbar. Dafür würden die bereits vorhandenen DNA-Proben ausreichen. Bei dieser Methode werden ausgewählte DNA-Fragmente in einem Vektor eingebracht und anschließend in eukariotischen Zellen (z.B. Bakterien) expremiert und so die Konsequenzen der potentiellen Splice-Varianten beurteilt.[31] Zur Anwendung könnte auch das CRISPR Cas9-System kommen, bei dem eukaryotische Zellen mit ausgewählten DNA-Fragmenten verändert werden.[32] Jedoch sind diese Methoden zur Gewinnung von mRNA sehr viel aufwendiger und komplexer. Die Analyse der mRNA beziehungsweise cDNA würde klären, ob nach dem „splicing“ das Exon 22 des PCCA-Gens noch vorhanden ist. Sollte Exon 22 fehlen, wäre bewiesen, dass die exonische Variante (chr13:101.167.821 G>A) eine Auswirkung auf das „splicing“ und in weiterer Folge auf die Aminosäurekette der resultierenden PCCA Proteins hat. Für den Fall, dass die „splice site-Mutation“ das „splicing“ von Exon 22 nicht beeinflusst, müssen durch geänderte, stringendere Filterkriterien nach weiteren potentiell pathogenen Varianten gesucht werden. Sollte dies nicht zeilführend sein, könnte es auch nötig werden „Whole Genome Sequencing“ durchzuführen, um Varianten in intergenetischen und tief intronischen Bereichen zu identifizieren.

Problematiken innerhalb dieser Arbeit waren einerseits die limitierten klinischen Angaben über den Phänotyp der betroffenen Familienmitglieder und die Anzahl der rekrutierten Probanden. Wie im Stammbaum ersichtlich (siehe Abbildung 7) befinden sich auch im anderen Zweig der Familie Betroffene. Deren DNA war jedoch nicht zugänglich. In weiterer Folge sollte daher versucht werden auch diese Familienmitglieder zu rekrutieren, um die Aussagekraft der Segregationsanalysen zu erhöhen.

Weiterführende Probleme, welche sich nach der Diagnosestellung der Propionazidämie ergeben können, betreffen die therapeutischen Möglichkeiten.

Dabei stellt sich die Frage in wie weit die betroffene Familie Zugang zu spezifischer medizinischen Versorgung hat und ob Diätpläne verwirklicht werden können.

Nach endgültiger Bewertung des pathogenen Potentials der Mutation sollte der Familie erneut eine genetische Beratung angeboten werden, um über Optionen der genetischen Abklärung und Therapieformen zu informieren.

7 Literaturverzeichnis

- [1] Häbler, Prof Dr Frank. „Worum es geht: Ausgangslage, Definition und Klassifikation“. In Intelligenzminderung, S. 9–16. Manuale psychischer Störungen bei Kindern und Jugendlichen. Springer Berlin Heidelberg, 2011.
- [2] Vissers, Lisenka E. L. M., Christian Gilissen, und Joris A. Veltman. „Genetic Studies in Intellectual Disability and Related Disorders“. Nature Reviews Genetics 17, Nr. 1 (Januar 2016). S. 9–18.
- [3] Häbler, Prof Dr Frank. „Was ist erklärbar? Ursächliche Zusammenhänge und Häufigkeit“. In Intelligenzminderung, S. 17–22. Manuale psychischer Störungen bei Kindern und Jugendlichen. Springer Berlin Heidelberg, 2011.
- [4] Ropers H. H. Genetik der geistigen Behinderung- Einführung und Überblick; Medizinische Genetik Nr. 21, S.197-201; Springer Berlin Heidelberg, 2009
- [5] „ICD-10-GM-2016 F70-F79 Intelligenzstörung ICD10“. 13. März 2016. <http://www.icd-code.de/icd/code/F70-F79.html>.
- [6] Gillessen-Kaesbach G. Syndromale Formen geistiger Behinderung; Medizinische Genetik Nr.21, S. 209-216
- [7] Murken J., Grimm T.,Holinski-Feder E., Zerres K. Humangenetik. 8. Auflage, S.462, Thieme
- [8] „OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man“. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University School of Medicine; 9. März 2016; <http://omim.org/>.
- [9] Tzschad A. Genetik der nicht syndromalen geistigen Behinderung; Medizinische Genetik Nr. 21, S. 231-239; Springer Berlin Heidelberg, 2009
- [10] Moog U., Hoffmann G. F., Zschocke J. Gestige Behinderung infolge Stoffwechselkrankheit; Medizinische Genetik Nr. 21, S. 202-208; Springer Berlin Heidelberg, 2009
- [11] Uyanik G., Hehr U. Angeborene Hirnfehlbildungen und geistige Behinderung; Medizinische Genetik Nr.21, S. 217-223; Springer Berlin Heidelberg, 2009
- [12] Reis A., Rauch A. Chromosomale Ursachen der geistigen Behinderung; Medizinische Genetik Nr. 21, S. 237-245; Springer Berlin Heidelberg, 2009
- [13] Murken J., Grimm T.,Holinski-Feder E., Zerres K. Humangenetik. 8. Auflage, S.219,230-231, Thieme
- [14] Murken J., Grimm T.,Holinski-Feder E., Zerres K. Humangenetik. 8. Auflage, S.196, Thieme

- [15] Häßler, Prof Dr Frank. „Der Blick auf das Besondere: störungsspezifische Diagnostik“. In *Intelligenzminderung*, S. 24-48. Manuale psychischer Störungen bei Kindern und Jugendlichen. Springer Berlin Heidelberg, 2011.
- [16] Murken J., Grimm T., Holinski-Feder E., Zerres K. *Humangenetik*. 8. Auflage, S.161, Thieme
- [17] Häßler, Prof Dr Frank. „Der Blick voraus: Verlauf und Prognose“. In *Intelligenzminderung*, S.142-148. Manuale psychischer Störungen bei Kindern und Jugendlichen. Springer Berlin Heidelberg, 2011
- [18] illumina. Nextera Rapid Capture Enrichment Reference Guide. Januar 2016
- [19] „Primer Design Tips & Tools“. Zugegriffen 18. Oktober 2016.
<https://www.thermofisher.com/at/en/home/products-and-services/product-types/primers-oligos-nucleotides/invitrogen-custom-dna-oligos/primer-design-tools.html>.
- [20] Murken J., Grimm T., Holinski-Feder E., Zerres K. *Humangenetik*. 8. Auflage, S.117, Thieme
- [21] Murken J., Grimm T., Holinski-Feder E., Zerres K. *Humangenetik*. 8. Auflage, S.106-108, Thieme
- [22] Reference, Genetics Home. „PCCA“. Genetics Home Reference. Zugegriffen 10. Juli 2016. <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/PCCA>.
- [23] Dorlöchter, Ludger, M. Radke, und M. Müller. *Pädiatrie auf den Punkt gebracht*. Walter de Gruyter, 1999. S. 350
- [24] „Orphanet: Propionic acidemia“. Zugegriffen 10. Juli 2016.
http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=GB&Expert=35.
- [25] Carrillo-Carrasco, Nuria, und Charles Venditti. „Propionic Acidemia“. In *GeneReviews*(®), herausgegeben von Roberta A. Pagon, Margaret P. Adam, Holly H. Ardinger, Stephanie E. Wallace, Anne Amemiya, Lora JH Bean, Thomas D. Bird, u. a. Seattle (WA): University of Washington, Seattle, 1993.
- [26] Reference, Genetics Home. „propionic acidemia“. *Genetics Home Reference*. Zugegriffen 10. Juli 2016. <https://ghr.nlm.nih.gov/condition/propionic-acidemia>.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92946/>.
- [27] „Über PA | Propionazidämie Foundation“. Zugegriffen 24. Juli 2016.
<http://www.pafoundation.com/de/sample-page/>.
- [28] „Propionacidämie auf Verein für Angeborene Stoffwechselstörungen (VfASS)“. Zugegriffen 24. Juli 2016.

- [29] Pérez, B., L. R. Desviat, P. Rodríguez-Pombo, S. Clavero, R. Navarrete, C. Perez-Cerdá, und M. Ugarte. „Propionic Acidemia: Identification of Twenty-Four Novel Mutations in Europe and North America“. *Molecular Genetics and Metabolism* 78, Nr. 1 (Januar 2003): 59–67.
- [30] Desviat, Lourdes R., Sonia Clavero, Celia Perez-Cerdá, Rosa Navarrete, Magdalena Ugarte, und Belen Perez. „New Splicing Mutations in Propionic Acidemia“. *Journal of Human Genetics* 51, Nr. 11 (2006): 992–997.
- [31] Passarge, Eberhard. *Taschenatlas Humangenetik*. Georg Thieme Verlag, 3.Auflage, 2008. S.38, 44
<http://vfass.de/stoffwechselstorungen/organoacidurien/propionacidamie/>.
- [32] Ran, F. Ann, Patrick D. Hsu, Jason Wright, Vineeta Agarwala, David A. Scott, und Feng Zhang. „Genome Engineering Using the CRISPR-Cas9 System“. *Nature Protocols* 8, Nr. 11 (November 2013): 2281–2308. doi:10.1038/nprot.2013.143.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Überblick über die Präparation der Proben für die Sequenzierung

[aus Nextera Rapid Capture Exome Kit; Hersteller: illumina]

Abbildung 2: Auswertung des Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer nach der

Tagmentierung

Abbildung 3: Auswertung des Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer nach der

Amplifikation

Abbildung 4: Auswertung des Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer nach der zweiten

Amplifikation

Abbildung 5: Überblick über die einzelnen Sequenzierungsschritte

[Lu, Yuan, Yingjia Shen, Wesley Warren, und Ronald Walter. „Next Generation Sequencing in Aquatic Models“. In *Next Generation Sequencing - Advances, Applications and Challenges*, herausgegeben von Jerzy K. Kulski. InTech, 2016. <http://www.intechopen.com/books/next-generation-sequencing-advances-applications-and-challenges/next-generation-sequencing-in-aquatic-models>.]

Abbildung 6: Ergebnisse der Gelelektrophorese

Abbildung 7: Stammbaum der MR15-Familie

Abbildung 8: Ausschnitt aus dem „IGV“ am Beispiel von PCCA

Abbildung 9: Homozygotie-Bereiche von MR15-1

Abbildung 10: Daten nach endgültiger Filterung

Abbildung 11: Ausschnitt aus dem „IGV“ mit Darstellung der Mutation des PCCA-Gens

Abbildung 12: Ergebnisse für die „splice site prediction“

Abbildung 13: zeigt die „Splice consensus sequence“

[Bildausschnitt von: Patel, Abhijit A., und Joan A. Steitz. „Splicing double: insights from the second spliceosome“. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4, Nr. 12 (Dezember 2003): 960–70. doi:10.1038/nrm1259.]

Abbildung 14: Ausschnitt aus dem „UCSC Genom Browser“, Dargestellt wird die konservierte Base Guanin. [<http://genome.ucsc.edu>]

Abbildung 15: Ausschnitt aus dem „UCSC Genom Browser“, Dargestellt wird die

Aminosäure Alanin, welche nicht konserviert ist. [<http://genome.ucsc.edu>]

Abbildung 16: Stammbaum der Familie MR15 mit den Bezeichnungen homozygot (+/+) / (-/-) und heterozygot (+/-)

Abbildung 17: Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung und Darstellung der Position der Mutation im UCSC [<http://genome.ucsc.edu>]

Abbildung 18: der Abbauweg von Propionyl-CoA zu Succinyl-CoA.
[https://fr.wikipedia.org/wiki/M%C3%A9thylmalonyl-coenzyme_A_%C3%A9pim%C3%A9rase]

Abbildung 19: zeigt den Abbauweg von Propionyl-CoA und jene Verbindungen welche durch die unzureichende Arbeit der Propionyl-CoA-Carboxylase entstehen [20]