

Aus dem Department für Diagnostische Labormedizin der
Universität Tübingen

Institut für Medizinische Genetik und angewandte Genomik

**Der Einfluss von Polymorphismen in Genen
nucleozytoplasmatischer
Transportproteine auf das Erkrankungsalter bei der
Spinocerebellären Ataxie Typ 3**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Gross, Katrin

2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. O. Rieß

2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. R. Schüle-Freyer

Tag der Disputation: 21.12.2020

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	X
1. Einleitung	- 1 -
1.1 Die Spinozerebelläre Ataxie Typ 3	- 1 -
1.1.1 Klinik	- 3 -
1.1.2 Therapie.....	- 5 -
1.1.3 Ätiologie und Pathogenese.....	- 7 -
1.1.4 Betrachtung der Relevanz proteolytischer Enzyme für die Pathogen- ese der SCA3.....	- 11 -
-	
1.1.5 Die intrazelluläre Lokalisation von Ataxin-3	- 13 -
1.1.6 Bekannte Einflussfaktoren auf das Erkrankungsalter der SCA3	- 14 -
1.2 High Resolution Melting Analyse mit dem Lightcycler 480.....	- 18 -
1.2.1 Nutzen des HRM	- 21 -
1.2.2 Schmelzverhalten der dsDNA	- 24 -
1.2.3 Unmarkierte Hybridisierungssonden	- 25 -
1.2.4 HRM in der molekulargenetischen Diagnostik.....	- 27 -
2. Fragestellung und Ziel der Arbeit	- 29 -
3. Material	- 30 -
3.1 Probenmaterial.....	- 30 -
3.2 Primer	- 30 -
3.3 Sonden.....	- 31 -
3.4 Enzyme.....	- 32 -
3.5 DNA-Größenmarker	- 32 -
3.6 Chemikalien und Reagenzien	- 33 -
3.7 Lösungen und Puffer.....	- 34 -
3.8 Reagenziensets.....	- 34 -
3.9 Geräte	- 34 -
3.10 Verbrauchsmaterialien.....	- 35 -
3.11 Software.....	- 35 -
3.12 Datenbanken und Serviceprogramme	- 36 -
4. Methoden	- 36 -
4.1 Primer Design	- 36 -
4.2 Konzentrationsbestimmung anhand der optischen Dichte	- 37 -

4.3	Konzentrationsabschätzung anhand der Agarose-Gelelektrophorese.....	- 38 -
4.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	- 38 -
4.5	Aufreinigung und Konzentrierung von DNA	- 40 -
4.5.1	Aufreinigung von PCR Produkten durch Ethanol-Fällung	- 40 -
4.5.2	Aufreinigung von PCR Produkten mit Magnetic Beads	- 40 -
4.6	Agarose-Gelelektrophorese	- 41 -
4.7	Sequenzierung.....	- 41 -
4.8	Restriktion von DNA	- 43 -
4.9	High Resolution Melting.....	- 44 -
4.9.1	HRM Bedingungen	- 45 -
4.9.2	Schmelzkurvenanalyse mit der LightCycler 480 Gene Scanning Software	- 48 -
4.9.3	T _m -Calling.....	- 51 -
4.10	Statistische Auswertung	- 52 -
5.	Ergebnisse.....	- 53
-		
5.1	Identifizierung von Kandidatengenomen mit SNPs in Transportproteinen und proteolytischen Enzymen.....	54
5.1.1	Festlegung der Kriterien zur Identifizierung der SNPs in den Kandidatengenomen	- 53 -
5.1.2	Selektion von Kandidatengenomen und deren SNPs anhand der festgelegten Kriterien	- 54 -
5.1.3	Kurze Charakterisierung der selektierten Kandidatengene und deren SNPs	- 56 -
5.2	Etablierung der HRM Bedingungen für die Genotypisierung der DNA Proben	- 58 -
5.2.1	Etablierung der designten Primer	- 58 -
5.2.2	Festlegung der Kriterien zum Design der Sonden für das HRM.....	- 60 -
5.2.3	Etablierung der Zusammensetzung des HRM Mastermix	- 61 -
5.2.4	Optimierung des HRM Laufzeitprotokolls	- 64 -
5.2.5	Etablierung der designten Sonden	- 66 -
5.2.6	Zusammenfassung der Etablierungsergebnisse	- 67 -
5.3	Nachweis der identifizierten SNPs in der Normalbevölkerung und Genotypisierung der Patientenproben	- 68 -
5.3.1	Nachweis der SNPs und deren Allelfrequenz in der Normalbevölkerung ..	- 68 -
5.3.2	Genotypisierung der Patientenproben mittels HRM	- 71 -
5.3.4	Verifizierung der Genotypisierungsergebnisse mittels Sequenzierung	- 75 -
5.3.5	Genotypisierung der Patientenproben auf den SNP im <i>CAST</i> Gen mittels Restriktionsverdau	- 84 -
5.4	Überprüfen des Einflusses der SNPs auf das Erkrankungsalter der SCA3 Patienten	- 90 -
5.4.1	Überprüfen des Einflusses des SNP rs7146310 in <i>IPO4</i> Exon 16 auf das Erkrankungsalter der SCA3	- 91 -

5.4.2	Überprüfen des Einflusses des SNP rs11550452 in <i>IPO4</i> Exon 17 auf das Erkrankungsalter der <i>SCA3</i>	- 94 -
5.4.3	Überprüfen des Einflusses des SNP rs205384 in <i>XPO6</i> auf das Erkrankungsalter der <i>SCA3</i>	- 97 -
5.4.4	Überprüfen des Einflusses des SNP rs205384 in <i>CAST</i> auf das Erkrankungsalter der <i>SCA3</i>	- 100 -
5.5	Zusammenfassende Betrachtung	- 103 -
6.	Diskussion	- 106 -
6.1	Selektion von Kandidatengen und Identifizierung der SNPs-	107 -
6.1.1	Es konnten 29 Kandidatengene selektiert werden	- 107 -
6.1.2	Es konnten sechs SNPs in den Kandidatengen identifiziert werden	- 108 -
6.2	Das HRM ist eine geeignete Methode zur Genotypisierung der Patientenkohorte	- 109 -
6.2.1	Für den SNP in <i>IPO4</i> Ex17 konnte ein HRM Ansatz mit unmarkierter Hybridisierungssonde etabliert werden.	- 112 -
6.2.2	Für die SNPs in <i>IPO4</i> Ex16, <i>XPO6</i> , <i>CAPN2</i> und <i>KPNA2</i> konnte ein klassischer HRM Ansatz etabliert werden	- 113 -
6.2.3	Die Genotypisierung des SNP im <i>CAST</i> Gen war mittels HRM nicht möglich.....	- 115 -
6.3	Die SNPs konnten in der Normalbevölkerung und in den Patientenproben nachgewiesen werden	- 116 -
6.3.1	Nicht alle Genotypisierungsergebnisse sind mit dem HWG vereinbar	- 117 -
6.3.2	Die Genotypisierungsergebnisse konnten durch die anschließende Sequenzierung validiert werden.....	- 119 -
6.4	Das Erkrankungsalter der <i>SCA3</i> wird durch Polymorphismen in nukleozytoplasmatischen Transportproteinen beeinflusst ...	- 120 -
6.4.1	Die SNPs rs7146310 und rs11550452 in <i>IPO4</i> haben einen signifikanten Einfluss auf das Erkrankungsalter der <i>SCA3</i>	- 121 -
6.4.3	Der SNP rs754615 in <i>CAST</i> hat keinen Einfluss auf das Erkrankungsalter der <i>SCA3</i>	- 125 -
7.	Ausblick und Fazit	- 126 -
8.	Literaturverzeichnis	- 127 -
9.	Eidstattliche Erklärung	- 139 -
11.	Danksagung	- 139 -

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Häufigkeit der SCA Untergruppen weltweit.....	- 2 -
Abbildung 2: Schematische Darstellung des <i>ATXN3</i> Gens und der Funktionseinheiten von Ataxin-3.....	- 8 -
Abbildung 3: Korrelation zwischen der Anzahl der CAG-Wiederholungen und dem Erkrankungsalter bei SCA3 Patienten.....	- 15 -
Abbildung 4: Schmelzverhalten einer heterozygoten Probe im HRM	- 19 -
Abbildung 5: HRM eines SNP mit Homozygoter und Heterozygoter Variante	- 21 -
Abbildung 6: Veränderung des Fluoreszenzsignals beim Schmelzen von dsDNA mit steigender Temperatur.....	- 24 -
Abbildung 7: HRM Ansatz mit unmarkierter Hybridisierungssonde	- 26 -
Abbildung 8: HRM Ansatz mit homozygoter und heterozygoter Probe unter Verwendung einer unmarkierten Hybridisierungssonde.....	- 27 -
Abbildung 9: DNA Größenstandards.....	- 33 -
Abbildung 10: Laufzeitprotokoll des HRM Programms.....	- 47 -
Abbildung 11: Normalisierung der Schmelzkurven	- 49 -
Abbildung 12: Temperatur Verschiebung im HRM	- 50 -
Abbildung 13: Grafische Darstellung der Schmelzkurvenunterschiede (Difference plot)	- 51 -
Abbildung 14: T_m -Calling	- 52 -
Abbildung 15: Ergebnis der PCR zur Etablierung der designten Primerpaare	- 59 -
Abbildung 16: Etablierung der $MgCl_2$ Konzentration im HRM Mastermix	- 62 -
Abbildung 17: Etablierung der DNA Menge für den HRM Ansatz.....	- 63 -
Abbildung 18: Optimierung der Anzahl der Einzelmessungen des Fluoreszenzsignals pro Grad Celsius	- 65 -
Abbildung 19: Ergebnis des HRM zur Etablierung der designten Sonden in <i>XPO6</i> ..	- 66 -
Abbildung 20: Ergebnis des HRM zur Etablierung der designten Sonden im <i>IPO 4</i> Gen	- 67 -
-	-

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 21: Nachweis des SNPs rs7146310 im <i>IPO4</i> Ex16 in CEPH-DNA Proben mittels HRM	- 70 -
Abbildung 22: Ergebnis des HRM für den SNP rs205384 in <i>XPO6</i> Gen.....	- 73 -
Abbildung 23 Ergebnis des HRM für den SNP rs1059558 im <i>KPNA2</i> Gen	- 75 -
Abbildung 24: Ergebnis der Sequenzierung der ausgewählten Proben aus dem HRM zur Typisierung des SNP rs205384 im <i>XPO6</i> Gen.....	- 77 -
Abbildung 25: Ergebnisse der Sequenzierung in Zusammenschau mit den HRM Schmelzprofilen für den SNP rs205384 im <i>XPO6</i> Gen.....	- 78 -
Abbildung 26: Ergebnis der Sequenzierung der ausgewählten Proben aus dem HRM zur Typisierung des SNP rs1059558 im <i>KPNA2</i> Gen	- 79 -
Abbildung 27: Übersicht der relativen Häufigkeit der Genotypen für die SNPs in <i>IPO4</i> , <i>XPO6</i> und <i>CAPN2</i> in allen untersuchten Patientenproben.....	- 81 -
Abbildung 28: Ergebnis des HRM für den SNP rs754615 im <i>CAST</i> Gen.....	- 85 -
Abbildung 29: Schmelzkurvenanalyse für den DNA Abschnitt um den SNP rs754615 im <i>CAST</i> Gen.....	- 86 -
Abbildung 30: Schnittstelle der Restriktionsendonuklease <i>BcoDI</i> im PCR Produkt um den SNP rs754615 im <i>CAST</i> Gen und daraus resultierende Ergebnisse der Agarose-Gelelektrophorese	- 87 -
Abbildung 31: Ergebnis des Restriktionsverdau mit der Restriktionsendonuklease <i>BcoDI</i> zur Genotypisierung des SNP rs754615 im <i>CAST</i> Gen.....	- 88 -
Abbildung 32: Übersicht der relativen Häufigkeit der Genotypen für den SNP rs754615 im <i>CAST</i> Gen.....	- 89 -
Abbildung 33: Mittleres Erkrankungsalter der SCA3 Patienten unterschieden nach dem Genotyp des SNP rs7146310 im Importin 4 Gen, Exon 16	- 91 -
Abbildung 34: Korrelation zwischen der Anzahl der CAG-Wiederholungen und dem Erkrankungsalter der SCA3 Patienten in Bezug auf die Genotypen des SNP rs7146310 im Importin 4 Gen, Exon 16.....	- 92 -
Abbildung 35: Formel zur näherungsweisen Bestimmung des Erkrankungsalters bei Kenntnis der CAG-Wiederholungen und des Genotyps für den SNP rs7146310 in <i>IPO4</i> Exon 16	- 93 -
Abbildung 36: Mittleres Erkrankungsalter der SCA3 Patienten unterschieden nach dem Genotyp des SNP rs11550452 im Importin 4 Gen, Exon 17	- 95 -

Tabellenverzeichnis

Abbildung 37: Korrelation zwischen der Anzahl der CAG-Wiederholungen und dem Erkrankungsalter der SCA3 Patienten in Bezug auf die Genotypen des SNP rs11550452 im Importin 4 Gen, Exon 17.....	- 96 -
Abbildung 38: Formel zur näherungsweisen Bestimmung des Erkrankungsalters bei Kenntnis der CAG-Wiederholungen und des Genotyps für den SNP rs11550452 in <i>IPO4Ex17</i>	- 96 -
Abbildung 39: Mittleres Erkrankungsalter der SCA3 Patienten unterschieden nach dem Genotyp des SNP rs205384 im Exportin 6 Gen	- 98 -
Abbildung 40: Korrelation zwischen der Anzahl der CAG-Wiederholungen und dem Erkrankungsalter der SCA3 Patienten in Bezug auf die Genotypen des SNP rs205384 im Exportin 6 Gen.....	- 99 -
Abbildung 41: Formel zur näherungsweisen Bestimmung des Erkrankungsalters bei Kenntnis der CAG-Wiederholungen und des Genotyps für den SNP rs205384 in <i>XPO6</i>	- 100 -
Abbildung 42: Mittleres Erkrankungsalter der SCA3 Patienten unterschieden nach dem Genotyp des SNP rs754615 im <i>CAST</i> Gen	- 101 -
Abbildung 43: Korrelation zwischen der Anzahl der CAG-Wiederholungen und dem Erkrankungsalter der SCA3 Patienten in Bezug auf den Genotyp des SNP rs754615 im <i>CAST</i> Gen.....	- 102 -

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Sequenzen aller verwendeten Primer F=Vorwärts-, R=Rückwärts Primer- -	30
Tabelle 2: Sequenzen der verwendeten Sonden	- 31 -
Tabelle 3: Verwendete Enzyme und Hersteller	- 32 -
Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Reagenzien mit Herstellerangaben	- 33 -
Tabelle 5: Verwendete Lösungen und Puffer und deren Zusammensetzung	- 34 -
Tabelle 6: Verwendete Reagenziensets.....	- 34 -
Tabelle 7: Verwendete Geräte mit Hersteller und Bezeichnung	- 34 -
Tabelle 8: Verwendete Materialien.....	- 35 -
Tabelle 9: Verwendete Software mit Entwickler und Version.....	- 35 -
Tabelle 10: Verwendete Datenbanken und Serviceprogramme	- 36 -

Tabellenverzeichnis

Tabelle 11: Zusammensetzung des Mastermix mit Taqpolymerase.....	- 38 -
Tabelle 12: Zusammensetzung des Mastermix mit FastStartpolymerase	- 39 -
Tabelle 13: Temperaturprofil der Touch-Down-PCR mit Taq Polymerase.....	- 39 -
Tabelle 14: Temperaturprofil der Touch-Down-PCR mit FastStart-Polymerase.....	- 40 -
Tabelle 15: Zusammensetzung der Sequenzierungsreaktion	- 42 -
Tabelle 16: Temperaturprofil der Sequenzierungs-PCR.....	- 42 -
Tabelle 17: Zusammensetzung der Stopplösung zur Beendigung der Sequenzierreaktion	- 43 -
Tabelle 18: Restriktionsverdau mittels <i>Bco</i> DI	- 44 -
Tabelle 19: Zusammensetzung des Mastermix für das HRM ohne Hybridisierungssonde	- 46 -
Tabelle 20: Zusammensetzung des Mastermix für das HRM mit Hybridisierungssonde	- 46 -
Tabelle 21: Temperaturprofil der Touch-Down PCR für das HRM.....	- 46 -
Tabelle 22: Alle untersuchten Gene mit zugehörigen Proteinen und deren Synonyme	- 54 -
Tabelle 23: Identifizierte Kandidatengene mit ihren Polymorphismen	- 56 -
Tabelle 24: Übersicht der identifizierten Proteine mit zugehörigen SNPs	- 57 -
Tabelle 25: Sequenzen aller zur Typisierung eingesetzten Primer.....	- 60 -
Tabelle 26: Übersicht der nachgewiesenen Genotypen in den CEPH-DNA Proben mit den daraus ermittelten MAFs	- 71 -
Tabelle 27: Übersicht der absoluten Häufigkeit der Genotypen für alle mittels HRM typisierten SNPs.....	- 74 -
Tabelle 28: Übersicht der finalen Genotypisierungsergebnisse durch das HRM mit Allelfrequenzen und daraus berechneter Vereinbarkeit mit dem Hardy-Weinberg- Gleichgewicht.....	- 83 -
Tabelle 29: Übersicht der Genotypisierungsergebnisse für den SNP rs754615 mit Allelfrequenzen und daraus berechneter Vereinbarkeit mit dem Hardy-Weinberg- Gleichgewicht.....	- 89 -
Tabelle 30: Effekt des SNP rs7146310 im <i>IPO4</i> Ex16 auf das Erkrankungsalter der SCA3.....	- 94 -

Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 31: Effekt des SNP rs11550452 im <i>IPO4</i> Ex17 auf das Erkrankungsalter der SCA3	- 97 -
Tabelle 32: Effekt des SNP rs205384 im <i>XPO6</i> Gen auf das Erkrankungsalter der SCA3	- 100 -
Tabelle 33: Effekt des SNP rs754615 im <i>CAST</i> Gen auf das Erkrankungsalter der SCA3	- 102 -
Tabelle 34: Übersicht der identifizierten Gene mit Genotypisierungsergebnissen und deren Einfluss auf das AAO der SCA3	- 105 -

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
®	eingetragener Name
µl	Micro-liter
A	Adenin
AA	Aminosäureaustausch
<i>ATXN3</i>	Ataxin-3 Gen
bp	Basenpaar(e)
C	Cytosin
ca.	circa
CASP	Caspase
CAST	Calpastatin
CAPN	Calpain
CEPH	Centre d'Etude des Polymorphismes Humaines
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
DRPLA	Dentatorubrale Pallidoluysische Atrophie
dsDNA	doppelsträngige DNA
dTTP	Thymidin Triphosphat
dUTP	desoxyuridin Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPO	externe progressive Ophthalmoplegie
EUROSCA	European integrated Project on Spinocerebellar Ataxias
Ex	Exon
g	Gramm
G	Guanin
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
HapMap	haplotype mapping
HRM	high resolution melting
HWG	Hardy Weinberg Gleichgewicht
IPO	Importin
kb	Kilobasen

Abkürzungsverzeichnis

kDa	Kilodalton
LC	LightCycler
M	Molar
MAF	Mittlere Allelfrequenz
max	maximal
mg	Milligramm
min	Minute
Mio	Million
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
n	Nano
NA	Nukleotidaustausch
Na ₂ EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz- Dihydrat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Nr.	Nummer
p	pico
PCR	Polymerasekettenreaktion
Primer F	forward Primer
Primer R	reverse Primer
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunde
SARA	Scale for the assessment and rating of ataxia
siRNA	small interfering RNA
SLS	sample loading solution
SNP	single nucleotide polymorphism
ssDNA	einzelsträngige DNA
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TD	touchdown
TE	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan EDTA
Temp.	Temperatur
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
V	Volt
WHO	World Health Organisation
XPO	Exportin
z.B.	zum Beispiel
µl	Mikroliter

1. Einleitung

1.1 Die Spinozerebelläre Ataxie Typ 3

Erkrankungen, die einen Untergang von Nervenzellen bewirken, haben tiefgreifende Auswirkungen auf Physis und Psyche, denn eine Schädigung des zentralen Nervensystems ist meist irreversibel und kann vielfältige Folgen haben (Lüllmann-Rauch, 2015). Die Neurodegeneration kann mit Einschränkungen auf der Ebene der Motorik, Sensibilität oder des vegetativen Nervensystems einhergehen, abhängig von der Lokalisation des Nervenzelltodes (Sitzer, 2011). Ähnlich variabel wie die Folgen sind auch die Ursachen einer Neurodegeneration. Diese beinhalten neben den häufigen Erkrankungen wie Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer und anderen demenziellen Erkrankungen auch seltenere Krankheiten wie die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit, Motoneuronenerkrankungen wie die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) und genetische Erkrankungen wie beispielsweise die Trinukleotiderkrankungen (Riess et al. 2001). Einige der Trinukleotiderkrankungen lassen sich der Gruppe der Ataxien zuordnen. Ataxien (von griech. Ataxia = "Unordnung", "Unregelmäßigkeit") sind eine klinisch sehr heterogene Gruppe von Erkrankungen (Schöls et al. 2004). Die Störung der Koordination von Bewegungsabläufen, die sich klinisch mit einer Stand- und Gangstörung äußert, gilt als Leitsymptom. Zu der Stand- und Gangstörung treten häufig weitere zerebelläre Symptome wie eine gestörte Okulomotorik, Intentionstremor, Dysarthrie und Dysdiadochokinese. Aufgrund der breiten klinischen Symptomatik, die oft unspezifisch ist, werden in erster Linie ätiologisch-genetische Aspekte zur Klassifizierung der neurodegenerativen Ataxien herangezogen. Man unterscheidet sekundäre Ataxien bspw. verursacht durch Alkoholabusus, Vit.B 12 Mangel, entzündliche (HIV, EBV, VZV) und paraneoplastische (Paraneoplastische Kleinhirndegeneration, gynäkologische Tumore) Erkrankungen von hereditären Formen (Noorani et al. 2008; Vernino 2012; Gochard et al. 2009). Dabei werden die hereditären Formen weiter unterteilt in autosomal-rezessiv vererbte, wie die Friedreich-Ataxie als häufigste unter den vererbten Ataxien, X-Chromosomal vererbte (Pelizaeus-Merzbacher-Krankheit) und autosomal-dominant vererbte Ataxien. In der derzeitigen Nomenklatur werden Ataxien in der Gruppe der autosomal-dominant vererbten Ataxien

Einleitung

als Spinozerebelläre Ataxien (SCAs) bezeichnet. Nach derzeitigem Stand der Forschung sind 40 verschiedene SCA Untergruppen beschrieben (Sun, Lu, and Wu 2016). Die Prävalenz der SCAs unterliegt großen geographischen Schwankungen und wird auf 3-4/100.000 geschätzt (van de Warrenburg et al. 2002; Tsuji et al. 2008), womit sie zur Gruppe der seltenen Erkrankungen gezählt werden. Allgemein gilt eine Erkrankung als selten, wenn weniger als 5 von 10.000 Menschen an ihr erkrankt sind (Bundesgesundheitsministerium, 2017).

Die weltweit häufigste Form der Spinozerebellären Ataxien ist die Spinozerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3) (Schöls et al. 2004). Mit einem relativen Anteil von 42% der SCAs liegt dieser in Deutschland sogar höher als im globalen Vergleich (vgl. Abbildung 1) (Schöls et al. 1997). Aufgrund der autosomal-dominanten Vererbung haben Kinder sowie Geschwister eines betroffenen Patienten ein Risiko von 50% ebenfalls Träger der Mutation zu sein.

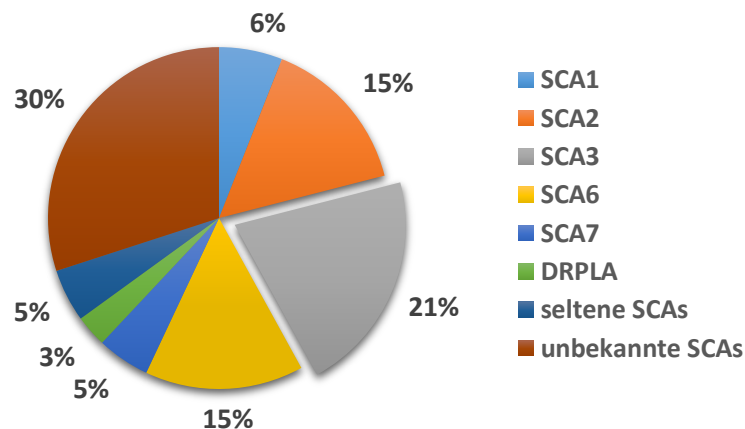


Abbildung 1: Häufigkeit der SCA Untergruppen weltweit

Die Verteilung der Untergruppen variiert weltweit sehr stark. Global als auch national betrachtet ist die SCA3 die häufigste SCA Form. (Quelle: Modifiziert nach Bird, 2012)

Vor allem in frühen Stadien der Erkrankung, wenn spezifische Symptome noch fehlen, ist die SCA3 klinisch schwer zu diagnostizieren. Daher spielt bei der Diagnosestellung neben der klinischen Untersuchung die Anamnese, mit besonderem Fokus auf die Familienanamnese, eine wesentliche Rolle. Laut aktuellen Leitlinien sollte zusätzlich immer eine Magnetresonanztomographie des Schädels (cMRT) erfolgen, um symptomatische Kleinhirnerkrankungen (zum Beispiel einen Hirninfarkt oder eine

Einleitung

Hirnblutung), die mit ähnlichen Symptomen einhergehen können, auszuschließen (Klockgether, 2012). Eine definitive Sicherung der Diagnose ist jedoch nur anhand molekulargenetischer Tests möglich (Klockgether, 2012). Im Rahmen einer fachgebundenen genetischen Beratung nach Gendiagnostikgesetz besteht die Möglichkeit einer Prädiktiven Testung. In der Beratung steht die Aufklärung über den Krankheitsursprung, das Fehlen von kausalen Therapiemöglichkeiten sowie das Risiko anderer Familienmitglieder, von der Erkrankung betroffen zu sein, im Mittelpunkt.

1.1.1 Klinik

Die SCA3 ist eine progressive neurodegenerative Erkrankung, die sich vorwiegend durch eine zerebelläre Ataxie mit Pyramidenbahnzeichen äußert. Sie kann jedoch diverse Gehirnareale betreffen und ist daher variabel mit einem dyston-rigiden extrapyramidal Syndrom, Augenbewegungsstörungen oder einer peripheren Amyotrophie durch den Untergang von Motoneuronen vergesellschaftet (Lima and Coutinho 1980). Zur klinischen Differenzierung zwischen der SCA3 und anderen Ataxieformen sind im späteren Krankheitsverlauf auftretende, für die SCA3 spezifische Symptome, entscheidend. Dazu zählen die externe progressive Ophthalmoplegie (EPO), Faszikulationen der Gesichts- und Zungenmuskulatur, Dystonie und der Pseudoexophthalmus (Lima and Coutinho 1980; Schöls et al. 1996). Das Restless-Legs-Syndrom gilt ebenfalls als relativ spezifisch für die SCA3 und tritt im Gegensatz zu den zuvor genannten Symptomen häufig auf. Die meist nächtlichen Missempfindungen und der unwillkürliche Bewegungsdrang führen bei vielen Patienten zu Schlafstörungen (Schöls et al. 1998).

Historisch begründet werden drei klinische Formen der SCA3 unterschieden (Lima and Coutinho 1980). Dabei unterscheidet man einen Typ 1, der durch einen frühen Krankheitsbeginn mit schnellem Fortschreiten der Krankheitssymptome und ausgeprägten Pyramidenbahnzeichen gekennzeichnet ist, von einem Typ 2, der sich durch das Auftreten erster Krankheitssymptome erst im mittleren Lebensalter auszeichnet. Der klinische Typ 2 ist, mit einem mittleren Erkrankungsalter zwischen dem 20. und dem 50. Lebensjahr, der häufigste Typ. Bei Patienten mit dem Typ 3 treten die ersten Symptome meist erst nach dem 45. Lebensjahr auf und die

Einleitung

Pyramidenbahnzeichen sind, wenn überhaupt, nur schwach ausgeprägt (Bettencourt and Lima 2011). Im Laufe der Jahre wurden noch zwei weitere klinische Typen beschrieben, die unter anderem mit einem Parkinson-Syndrom einhergehen (Sakai and Kawakami 1996; Tuite et al. 1995; Suite, Sequeiros, and McKhann 1986). Die klinischen Subtypen können ineinander übergehen. In einer Familie können auch mehrere Typen gleichzeitig vorkommen.

Die individuelle klinische Symptomatik wird maßgeblich durch die vom Nervenzellverlust betroffenen Gehirnareale bestimmt. Neben dem Kleinhirn kann eine Nervenzelldegeneration im Vorderhorn, Hinterstrang und im Tractus Spinocerebellaris beobachtet werden (Iwabuchi et al. 1999; Dürr et al. 1996; Robitaille et al. 1997; Yamada et al. 2001). In neuropathologischen Studien wurde wiederholt eine Depigmentierung der Substantia nigra beschrieben (Dürr et al. 1996; Iwabuchi et al. 1999; Rub et al. 2013; Seidel et al. 2012). Diese kennzeichnet die Degeneration melaninhaltiger dopaminerger Neurone in diesem Bereich des Hirnstamms, wie sie auch für den M. Parkinson beschrieben ist. Trotz des ausgeprägten Zellverlustes wurde das Auftreten von parkinsonartigen Symptomen nur selten beobachtet (Schöls et al. 2015; Tuite et al. 1995). In der MRT und SPECT konnte darüber hinaus eine Atrophie von Pons, Basalganglien und Medulla oblongata, Hirnnerven III und XIII sowie der Großhirnrinde gezeigt werden (Etchebere et al. 2001; Schulz et al. 2010; Klaes et al. 2016; Rub, Brunt, and Deller 2008). Der Verlust der Nervenzellen in den verschiedenen Gehirnarealen führt bei SCA3 Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung zu einer, im Vergleich zu Gesunden, signifikant reduzierten Gehirnmasse (Iwabuchi et al. 1999; Horimoto et al. 2011).

Obwohl es bis heute keine prospektive Verlaufsstudie der SCA3 gibt, weiß man, dass die Erkrankung primär progredient und ohne Remissionen verläuft. Wie mit Hilfe eines von dem European integrated Project on Spinocerebellar Ataxias (EUROSCA) entwickelten Fragebogen zur Schwere und Ausprägung der Symptome (Scale for the assessment and rating of ataxia = SARA) festgestellt werden konnte, hat dabei die Repeatlänge maßgeblichen Einfluss auf die Expressivität der Erkrankung. Je höher die Anzahl der CAG-Wiederholungen, desto stärker sind die Progredienz der Erkrankung und die Ausprägung der Symptome (Schmitz-Hubsch et al. 2008).

1.1.2 Therapie

Trotz intensiver Forschung konnte bisher kein kausaler Ansatz zur Therapie der SCA3 gefunden werden. Auf der Suche nach Substanzen, die den Krankheitsbeginn der SCA3 verzögern, entstanden einige vielversprechende experimentelle Ansätze. Einige Begleitsymptome wie die Dysästhesien oder Spastiken können durch den Einsatz meist sehr nebenwirkungsreicher Pharmaka abgemildert werden. Das im späteren Krankheitsverlauf auftretende Restless-Legs-Syndrom sowie die vorwiegend beim Klinischem Subtyp 2 auftretenden parkinsonartigen Symptome können in den meisten Fällen wirksam mit L-Dopamin (+Decarboxylasehemmer) oder Dopaminagonisten therapiert werden (Akpınar 1987; Buhmann, Bussopulos, and Oechsner 2003). Darüber hinaus wird L-Dopamin eingesetzt, um die Dystonie abzumildern (Nunes et al. 2015). Die medikamentöse Behandlung der Ataxie Symptomatik ist komplexer.

Eine Phase II Studie an einer heterogenen Gruppe von Patienten mit Ataxie (allerdings wahrscheinlich ohne SCA3 Patienten) konnte eine Besserung der Schwere der Ataxie (nach SARA Score) nach Einnahme von Riluzol (das bisher bei Patienten mit Amyotropher Lateralsklerose eingesetzt wird) nachweisen (Romano et al. 2015). Eine andere Studie im Mausmodell der SCA3 konnte die etwaige Verbesserung der Symptome unter Riluzol Therapie nicht bestätigen (Schmidt et al. 2016).

In der Forschung an medikamentösen Therapieansätzen konnten in jüngster Zeit einige Erfolge erzielt werden. In einem *C.elegans* Modell konnte die Wirksamkeit von Citalopram, einem selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer, auf die motorischen Symptome nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte die Anzahl der neuronalen Einschlusskörperchen durch die Behandlung mit Citalopram reduziert werden. Daher wird Citalopram aktuell als mögliche effektive Therapiemöglichkeit der SCA3 gesehen (Teixeira-Castro et al. 2015).

Auch durch den Calpain Inhibitor BDA-410 konnte im Mausmodell eine Reduktion der Ataxin-3 Aggregate erzielt werden. Zusätzlich scheint BDA-410 die Neurodegeneration im Striatum und Kleinhirn zu verhindern (Simoes et al. 2014). Die Wirkung des klassischen Antikonvulsivums Valproat, das standardmäßig zur Dauertherapie bei generalisierten Epilepsien eingesetzt wird, auf die motorischen Symptome der SCA3

Einleitung

Patienten wurde in mehreren Studien getestet. Esteves und Kollegen konnten zeigen, dass eine dauerhafte Behandlung mit Valproat im Mausmodell die motorischen Funktionen nur eingeschränkt und vorrangig in späten Krankheitsstadien verbessert. Die Behandlung hatte keinen Effekt auf die nukleären Einschlusskörperchen in den betroffenen Hirnregionen. Jedoch bewirkte die Therapie mit Valproat einen Anstieg des Proteins GRP78. Damit konnte die bereits bekannte neuroprotektive Wirkung von Valproat bestätigt werden (Esteves et al. 2015). In einer Placebokontrollierten Studie konnte ein positiver Effekt von Valproat auf die Lokomotorischen Funktionen bei SCA3 Patienten nachgewiesen werden (Lei et al. 2016).

Die meisten dieser Studien wurden in Modellen oder kleinen Patientengruppen (bis max. 36 Patienten) über relativ kurze Zeiträume durchgeführt. Studien mit ausreichend großem Patientenumfang und entsprechender Dauer, um aussagekräftige Effekte zu erfassen, sollten daher auf Basis der bisherigen Erkenntnisse geplant werden (Bettencourt and Lima 2011).

In der nicht medikamentösen Behandlung der SCA3 stehen Allgemeinmaßnahmen wie eine Physiotherapie, Logopädie (vor Allem beim Vorliegen einer Dysphagie) sowie eine psychologische Betreuung im Vordergrund. Es konnte nachgewiesen werden, dass regelmäßige Physiotherapie (ein bis zweimal pro Woche) einen langanhaltenden, positiven Effekt auf die Ataxie hat (Ilg et al. 2009). Diese interdisziplinäre Betreuung sollte im Rahmen der Anbindung an eine Spezialambulanz mit entsprechenden Angeboten zur Teilnahme an Studien erfolgen.

In jüngster Zeit konnten einige neue Erkenntnisse im Bereich der Gentherapie erlangt werden. Dadurch rücken Therapieansätze dieser Art stärker in den Fokus. Die Möglichkeiten der Gentherapie umfassen die Anwendung von small interfering RNAs (siRNAs) (Wu, Peng, and Wang 2015). Die therapeutische Wirksamkeit dieser Methode konnte von Alves und Kollegen im Rattenmodell nachgewiesen werden (Alves et al. 2008). Essenziell erschien dabei zunächst die Differenzierung zwischen Wildtyp- und mutiertem Transkript, um die Expression und Funktion des Wildtyp Ataxin-3 zu erhalten. Dies wurde mit Hilfe eines Single nukleotide polymorphisms (SNPs) am 3' Ende der CAG Einheit erreicht. Ein weiterer Ansatz zeigt, dass durch den Einsatz von Antisense Oligonukleotiden die mutierte mRNA gebunden und allelspezifisch

Einleitung

stummgeschaltet werden kann. Es wird vermutet, dass diese Antisense Oligonukleotide anhand der Anzahl der CAG-Wiederholungen zwischen Wildtyp- und mutiertem Ataxin-3 unterscheiden können (Hu et al. 2009). Eine andere Studie im Rattenmodell impliziert jedoch, dass eine nicht allelspezifische Stilllegung der Transkripte keinen negativen Effekt auf die Schwere der Symptomatik hat (Alves et al. 2010).

1.1.3 Ätiologie und Pathogenese

Genetisch wird die SCA3 zu den sogenannten Polyglutaminerkrankungen gezählt. Zu dieser Gruppe zählen neben der SCA3 noch andere SCAs wie die SCA 1,2,6,7,17 und die Dentatorubro-Pallidoluyische Atrophie (DRPLA). Aber auch Erkrankungen, die eine höhere Prävalenz zeigen, wie bspw. der Morbus Huntington oder die spinobulbäre Muskelatrophie gehören zu diesem Formenkreis (The Huntington's Disease Collaborative Research Group 1993; Cha and Dure 1994). Die Expansion des Trinukleotids CAG bildet dabei die gemeinsame Mutationsgrundlage. Das repetitive Codon CAG codiert für die Aminosäure Glutamin, wodurch bei der Translation des betroffenen Gens eine expandierte Wiederholung der Glutamine entsteht. 1994 wurde entdeckt, dass das Krankheitsgen der SCA3, das *ATXN3*, eine CAG Wiederholungsregion aufweist, die bei Erkrankten verlängert ist (Kawaguchi et al. 1994). Die Anzahl dieser Trinukleotidwiederholungen im *ATXN3* Gen beträgt in gesunden Individuen 12-44 (Lima et al. 2005; Gan et al. 2015) gegenüber 52-87 in Erkrankten (Dürr et al. 1996; Maciel et al. 2001; Lima et al. 2005). Nur sehr selten wurden Allele mittlerer Länge (um die 50 CAG Repeats) beobachtet, die in den meisten Fällen nicht mit dem Phänotyp der SCA3 einhergehen (Padiath et al. 2005; Maciel et al. 2001). Es kommt also erst bei der Überschreitung eines Schwellenwertes zur Ausbildung des Phänotyps.

Das die Trinukleotidwiederholung enthaltende *ATXN3* Gen liegt auf Chromosom 14 (Takiyama et al. 1993) und umfasst 11 Exons mit der CAG Wiederholungsregion in Exon 10 (Ichikawa et al. 2001). *ATXN3* codiert für die Deubiquitinase Ataxin-3, die ein Molekulargewicht von 40-43 kDa aufweist (Costa Mdo and Paulson 2012). Am N-Terminus trägt Ataxin-3 eine Josephin-Domäne, mit einem Cystein im katalytischen

Einleitung

Zentrum. Ubiquitinketten können dadurch katalytisch gespalten werden (Nicastro et al. 2005; Antony et al. 2009). Innerhalb der Josephin Domäne liegen zwei Nukleäre Exportsignale (NES) an den Stellen 71 und 141 sowie zwei Ubiquitinbindungsstellen (UIMs) (Mao et al. 2005). Daran anschließend finden sich zwei Ubiquitin interagierende Motive (UIMs) (Tzvetkov and Breuer 2007; Masino et al. 2003). An diesen Stellen besteht die Möglichkeit, Ubiquitinketten zu binden. Weiter in Richtung C-terminus folgt der Polyglutaminbereich. Noch vor diesem liegt ein Nukleäres Lokalisationssignal (Antony et al. 2009). Abbildung 2 zeigt den Aufbau des *ATXN3* Gens und die Domänen von Ataxin-3.

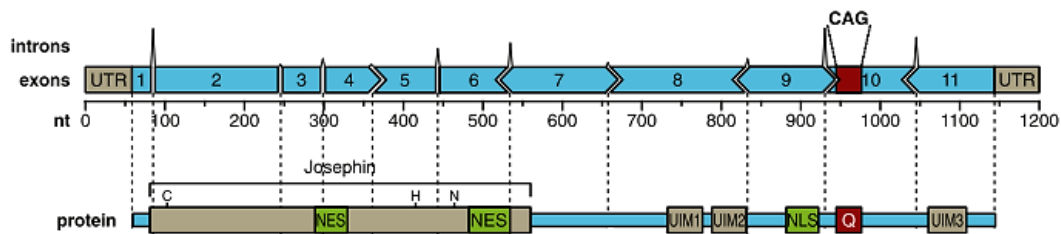


Abbildung 2: Schematische Darstellung des *ATXN3* Gens und der Funktionseinheiten von Ataxin-3

Das *ATXN3* Gen liegt auf dem langen Arm von Chromosom 14 und besteht aus elf Exons mit der CAG Wiederholungssequenz in Exon 10. Das Protein Ataxin-3 besteht aus der am N-Terminus gelegenen Josephin Domäne, welche wichtige Aminosäuren für dessen Deubiquitinase Aktivität (Cystein (C), Histidin (H) und Asparagin (N)) und zwei Nukleäre Exportsignale (NES) enthält. Der C-Terminale Teil des Proteins enthält drei Ubiquitin interagierende Motive (UIMs), ein Nukleäres Lokalisationssignal (NLS) und die Polyglutamineinheit (Q). nt: Nucleotides (Quelle: Modifiziert nach(Evers, Toonen, and van Roon-Mom 2014)

Die physiologische Funktion von Ataxin-3 ist nicht vollständig aufgeklärt. Ataxin-3 ist wahrscheinlich Teil von vielen verschiedenen Stoffwechselwegen innerhalb der Zelle. Beispielsweise wird vermutet, dass es an der Qualitätskontrolle von Proteinen beteiligt ist und dabei den Abbau von fehlgefalteten Proteinen im Rahmen des Ubiquitin-Proteasom-Systems triggert (Schmitt et al. 2007; Yamada et al. 2004). Ubiquitin wird genutzt, um Proteine für den Abbau durch Proteasome zu markieren. Durch verschiedene Arbeitsgruppen konnte eine Ubiquitinierung durch Ataxin-3 nachgewiesen werden (Burnett, Li, and Pittman 2003; Nijman et al. 2005; Mao et al. 2005). Die

Einleitung

Beteiligung von Ataxin-3 beim proteasomalen Abbau von Proteinen wurde durch die Identifikation des Interaktionspartners Rad23 bestätigt. Der Proteinkomplex aus Ataxin-3 und Rad23 transportiert Proteine, die für den Abbau bestimmt sind in Richtung des Proteasoms (Riess et al. 2008). Rad23 interagiert dabei mit einer Proteasomuntereinheit. Auch ein Einfluss auf den Abbau von Proteinen aus dem Endoplasmatischen Retikulum wurde beschrieben (Zhong and Pittman 2006). Ataxin-3 kann an das Valosin Containing Protein (VCP) binden (Zhong and Pittman 2006). Eine der Funktionen von VCP ist die Regulation des Abbaus fehlgefalteter Proteine des Endoplasmatischen Retikulums. Dieser Vorgang wird als Endoplasmatic-Reticulum-associated-degradation (ERAD) bezeichnet (Zhong and Pittman 2006; Liu and Ye 2012).

Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass Ataxin-3 maßgeblichen Anteil an der Organisation des Zytoskeletts haben könnte. Die Mikotubuli verlieren bei fehlendem Ataxin-3 ihre geordnete Struktur. Dadurch verliert die Zelle ihre Form und rundet sich ab (Rodrigues et al. 2010). Auch Neuroprotektion wird als Eigenschaft von Ataxin-3 vermutet (Warrick et al. 2005). Ataxin-3 ist also an der Regulation und Stabilisierung vieler verschiedener Proteine in den unterschiedlichsten Stoffwechselwegen beteiligt.

Eine Einschränkung der Transkription als möglicher pathogenetischer Einflussfaktor, wie bei anderen Polyglutaminerkrankungen, wird diskutiert (Steffan et al. 2000; Li et al. 2002). Ataxin-3 hat repressive Wirkung auf die Transkription bestimmter Gene. Fällt diese Eigenschaft aufgrund der veränderten Struktur im polyglutaminhaltigen Ataxin-3 weg, könnte es zur Überexpression der Proteine kommen. Die Veränderung der Transkription durch mutiertes Ataxin-3 konnte von Evert und Kollegen in Zellkultur nachgewiesen werden (Evert et al. 2006).

Die Verlängerung des Polyglutaminbereiches in mutiertem Ataxin-3 induziert eine Konformationsänderung. Dadurch werden die Stabilität, der Abbau, die intrazelluläre Lokalisation sowie die Interaktionen mit anderen Proteinen beeinflusst. Der genaue pathophysiologische Prozess, der durch die CAG-Wiederholungen im *ATXN3* Gen hervorgerufen wird, bleibt jedoch unklar. In seiner mutierten Form hat Ataxin-3 neurotoxische Eigenschaften, die zu einem gezielten Neuronenuntergang führen. Jedoch sind nur Neuronen in bestimmten Hirnregionen betroffen. Insbesondere das Kleinhirn, das Vorderhorn, die Hinterstränge und der Tractus Spinocerebellaris sind von der

Einleitung

Nervenzelldegeneration beeinträchtigt (Iwabuchi et al. 1999; Dürr et al. 1996; Robitaille et al. 1997; Yamada et al. 2001). Aufgrund der ubiquitären Expression des krankhaft veränderten Proteins lässt sich der selektive Untergang der Neuronen nicht erklären.

Anders als physiologisches Ataxin-3 hat expandiertes Ataxin-3 eine hohe Neigung, pathologische Aggregate im Zellkern zu bilden (Chai et al. 2002). Sogenannte Intranukleäre Einschlusskörperchen oder Nuclear Inclusions (NIs) (Paulson, Perez, et al. 1997). Eine solche Proteinaggregation, wenn auch außerhalb des Nukleus, kennt man von anderen Erkrankungen wie der Alzheimer Krankheit, dem Morbus Parkinson oder den seltenen Prionenerkrankungen. Ataxin-3 als Genprodukt wird zwar ubiquitär in vielen unterschiedlichen Geweben und Zelltypen exprimiert (Paulson, Das, et al. 1997), die neuronalen Einschlusskörperchen finden sich jedoch überwiegend in den Gehirnanaren, die von der Neurodegeneration betroffen sind.

Analysen der Zusammensetzung dieser Kerneinschlusskörperchen ergaben, dass sie hauptsächlich den Teil des Proteins beinhalten, in dem die Polyglutamineinheit liegt (Schmidt et al. 1998). Die Ausbildung der Aggregate scheint durch die Proteolyse des Ataxin-3 und daraus resultierenden C-Terminalen Fragmenten, gesteigert. Es wird vermutet, dass die Polyglutaminhaltigen Fragmente als Ursprung der Aggregationsreaktion wirken. Dabei scheint auch die Länge des Polyglutaminabschnitts entscheidend für die Bildung der NIs zu sein, denn lange Polyglutamin Abschnitte gehen mit einer höheren Rate an Aggregaten einher (Teixeira-Castro et al. 2011).

Ein weiterer Mechanismus, der zur Formation der Kerneinschlusskörperchen beizutragen scheint, ist der Ubiquitin-Proteasom-Weg. Ubiquitin und verschiedenste Proteasomale Untereinheiten können in den NIs nachgewiesen werden (Chai, Koppenhafer, Shoemith, et al. 1999; Schmidt et al. 2002). Ubiquitin wird zur Markierung von Proteinen, die dem Abbau durch Hydrolyse zugeführt werden sollen, verwendet. Das führt zu der Vermutung, dass die intranukleären Einschlusskörperchen ein Endprodukt eines zellulären Abwehrmechanismus zum Abbau toxischer Polyglutaminproteine (PolyQ-Proteine) sind. Dafür spricht auch das Vorhandensein von Hitzeschockproteinen in den Einschlusskörperchen. Neben Ubiquitin, Proteasomuntereinheiten und Hitzeschockproteinen enthalten die NIs auch Transkriptionsfaktoren (Chai, Koppenhafer, Bonini, et al. 1999; Schmidt et al. 2002).

Einleitung

Die Verteilung der Proteasomuntereinheiten innerhalb der nukleären Einschlusskörperchen lässt einen Funktionsverlust der Proteasomen vermuten (Schmidt et al. 2002). Diese Tatsache unterstützt die Hypothese, dass der intranukleäre Einschluss ein Versuch der Zelle sein könnte, die toxischen PolyQ-Proteine zu eliminieren.

Ob die intranukleären Einschlusskörperchen einen direkten toxischen Effekt haben, wird daher kontrovers diskutiert. Während zunächst angenommen wurde, dass die Einschlusskörperchen den zentralen Mechanismus des Zelluntergangs widerspiegeln, werden sie inzwischen von viele Autoren als Zeichen des Versuchs der Zelle, mutiertes Ataxin-3 zu entsorgen gesehen (Paulson, Perez, et al. 1997; Schmidt et al. 1998; Shao and Diamond 2007). Dafür spricht auch, dass sie sowohl in von der Degenration betroffenen Gehirnarealen als auch in solchen, von denen angenommen wird, dass sie bei der SCA3 keiner Veränderung unterliegen, vorkommen (Paulson, Perez, et al. 1997; Schöls et al. 2004; Rub et al. 2006). Darüber hinaus korreliert die Anzahl der Aggregate nicht mit der Schwere der Neurodegeneration (Rub et al. 2006).

Unklar bleibt also, ob die Kerneinschlusskörperchen mit ursächlich für die Pathologie der SCA3 sind oder als Folge der Elimination der PolyQ-Proteine entstehen. Aktuell werden die löslichen Polyglutaminfragmente, die durch die proteolytische Spaltung von Ataxin-3 durch Caspasen und Calpaine entstehen, als wichtige Einflussfaktoren in der Pathogenese der SCA3 gesehen.

1.1.4 Betrachtung der Relevanz proteolytischer Enzyme für die Pathogenese der SCA3

Die Kerneinschlusskörperchen enthalten nur den PolyQ Bereich beinhaltenden C-Terminus des Ataxin-3 (Schmidt et al. 1998). Daraus ergab sich früh die Vermutung, dass Ataxin-3 vor der Bildung dieser Einschlusskörperchen enzymatisch gespalten wird (Schmidt et al. 1998). An dieser Spaltung sind Caspasen und Calpaine beteiligt (Haacke, Hartl, and Breuer 2007; Simoes et al. 2014; Wellington et al. 1998; Jung et al. 2009). Durch die proteolytische Spaltung des Ataxin-3 wird der nukleozytoplasmatische Transport möglich. Calpaine und Caspasen regulieren sich gegenseitig durch

Einleitung

Aktivierung und Inhibition. Calpaine können durch den Inhibitor Calpastatin spezifisch gehemmt werden.

Calpaine sind eine Gruppe von ubiquitär exprimierten Calciumabhängigen Cysteinproteasen. Die Calpain-vermittelte Proteolyse von Ataxin-3 scheint, auf Grundlage der beobachteten Fragmentlängen und Antikörperbindungen, vor allem an den Aminosäuren 60, 221 und 260 stattzufinden (Haacke, Hartl, and Breuer 2007; Simoes et al. 2012; Hubener et al. 2013). Calpain 2 zeigt dabei eine besonders hohe Beteiligung an der proteolytischen Spaltung. Es konnte gezeigt werden, dass das mutierte Ataxin-3 mit expandiertem Polyglutaminbereich affiner für die Zersetzung durch Calpaine an Stelle der Aminosäure 260 ist, als Wildtyp Ataxin-3. Durch die Hemmung von Calpain durch den Calpaininhibitor Calpastatin wird die Tendenz von Ataxin-3, sich zu Aggregaten zu formieren, gesenkt (Haacke, Hartl, and Breuer 2007). Umgekehrt führt eine Hemmung von Calpastatin zu einer höheren Anzahl der NIs, was eine stärker ausgeprägte Neurodegeneration im Kleinhirn sowie einen verstärkten Phänotyp bedingt (Hubener et al. 2013).

Die Calpainabhängige Proteolyse von Ataxin-3 wurde auch als Ursache der neuronalen Spezifität in der Pathologie der SCA3 vorgeschlagen. Calpaine benötigen für ihre proteolytische Aktivität einen erregungsabhängigen Calciumeinstrom. Die Proteolyse durch Calpaine kann demnach nur in Neuronen, jedoch nicht in Fibroblasten oder Gliazellen stattfinden (Koch et al. 2011).

Caspasen sind auch an der Pathogenese zahlreicher anderer Polyglutamin Erkrankungen beteiligt (Sanchez Mejia and Friedlander 2001; Kim et al. 2001; Ellerby et al. 1999). Im Ataxin-3 Protein konnten mehrere Schnittstellen für Caspasen identifiziert werden. Durch Mutation dieser Schnittstellen wird die Proteolyse durch die Caspase 1 stark behindert (Berke et al. 2004). Eine Hemmung der Caspase 1 und 3 konnte die Aggregatbildung jedoch nicht signifikant verringern (Koch et al. 2011).

Die steigende Evidenz der Beteiligung der Calpaine und Caspasen an der Proteolyse von Ataxin-3, legt eine bedeutende Rolle dieser in der Pathogenese der SCA3 nahe. Nach der sogenannten "Toxischen Fragment Hypothese" werden daher die durch die proteolytische Spaltung entstehenden, zur Aggregation neigenden

Einleitung

Polyglutaminfragmente als zentraler Einflussfaktor der Pathogenese gesehen (Evers, Toonen, and van Roon-Mom 2014; Hubener et al. 2013; Haacke et al. 2006; Berke et al. 2004; Koch et al. 2011).

1.1.5 Die intrazelluläre Lokalisation von Ataxin-3

Die intrazelluläre Lokalisation von Ataxin-3 wird durch verschiedene Mechanismen reguliert. Ataxin-3 ist ubiquitär in der Zelle vorhanden und kann im Nukleus, in den Mitochondrien oder im Zytoplasma lokalisiert sein (Pozzi et al. 2008; Tait et al. 1998). In Neuronen ist Ataxin-3 jedoch vorwiegend im Zytoplasma zu finden (Trottier et al. 1998; Paulson, Das, et al. 1997).

Der Nukleozytoplasmatische Transport von Ataxin-3 kann vom Zytoplasma in den Kern und in umgekehrter Richtung erfolgen (Trottier et al. 1998; Pozzi et al. 2008). Er wird von einem schwachen Kernlokalisierungssignal (NLS) und zwei Kernexportsignalen (NES) beeinflusst, dem NES 77 und 141, die beide in N-terminaler Richtung der CAG Wiederholungsregion liegen (Antony et al. 2009; Macedo-Ribeiro et al. 2009). NES 77 überlappt mit einer Ubiquitin Bindungsstelle. Kernlokalisierungssignale können von Karyopherinen, welche Teil der sogenannten Kernpore sind, erkannt werden. Die Kernpore fungiert als Eintrittstor für Proteine in den Zellkern sowie in umgekehrter Richtung. Unklar ist die Rolle des Kernlokalisierungssignals, welches in der Nähe der Polyglutamineinheit zu finden ist. Wird die Aminosäuresequenz aus welcher sich das NLS zusammensetzt gelöscht oder mutiert, zeigt sich kein Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation von Ataxin-3 (Breuer et al. 2010; Mueller et al. 2009).

Als entscheidender, die Lokalisation von Ataxin-3 bestimmender Faktor, konnte kürzlich das Karyopherin α -3 identifiziert werden (Sowa et al. 2018). KPNA3 bestimmt neben der Lokalisation die Aggregation und damit die Toxizität von Ataxin-3. Im Mausmodell sowie in Versuchen mit *Drosophila* führt ein gezieltes ausschalten von KPNA3 zu einem abgemilderten neurologischen Phänotyp.

Einleitung

Die posttranslationale Modifikation durch Phosphorylierung scheint ebenfalls Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation von Ataxin-3 zu haben. Der Kernimport von wildtyp und mutiertem Ataxin-3 wird anscheinend von der Phosphorylierung der Reste Serin 236 im Ubiquitininteraktionsmotiv 1 und Serin340/352 im UIM2 beeinflusst. Die Phosphorylierung an diesen Stellen führt zu einer zunehmenden intranukleären Lokalisation von Ataxin-3 (Mueller et al. 2009). Mutationen in diesem Bereich reduzieren hingegen die Anzahl der Kerneinschlusskörperchen.

Darüber hinaus wird die intrazelluläre Lokalisation von Ataxin-3 von Stressreizen wie bspw. oxidativem Stress beeinflusst. Je mehr Stressoren vorhanden sind, desto stärker akkumuliert Ataxin-3 im Zellkern (Reina, Zhong, and Pittman 2010).

Eine weitere Region, die für die intrazelluläre Lokalisation von Ataxin-3 eine Rolle spielen könnte, liegt innerhalb der ersten 27 Aminosäuren des Proteins (Pozzi et al. 2008).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Lokalisation von Ataxin-3 innerhalb der Zelle von vielen verschiedenen Einflussfaktoren abhängt. Für die Pathogenese der SCA3 spielt die Lokalisation vermutlich eine entscheidende Rolle. Wie bereits beschrieben, scheint der Kerntransport ein Auslöser für die Induktion der Neurodegeneration zu sein. Bichelmeier und Kollegen konnten schließlich zeigen, dass die nukleäre Lokalisation Voraussetzung für die Ausbildung des Phänotyps der SCA3 ist (Bichelmeier et al. 2007). Die Relevanz der Lokalisation für die Pathogenese ist jedoch Gegenstand aktueller Diskussionen.

1.1.6 Bekannte Einflussfaktoren auf das Erkrankungsalter der SCA3

Das mittlere Erkrankungsalter der SCA3 liegt bei ca. 40 Jahren. Es variiert jedoch zwischen 4 (Carvalho et al. 2008) und 75 Jahren. Die mittlere Überlebenszeit beträgt ca. 21 Jahre (Kieling et al. 2007).

Statistisch gesehen besteht eine inverse Korrelation zwischen dem Erkrankungsalter und der Anzahl der CAG-Wiederholungen im *ATXN3* Gen (Schöls et al. 1996; Maciel et al. 1995). Wie in Abbildung 3 dargestellt, erkranken die Patienten demnach umso früher, je

Einleitung

mehr CAG-Wiederholungen vorliegen. Jedoch erklärt die Anzahl der CAG-Wiederholungen das Erkrankungsalter nur zu ca. 55% (van de Warrenburg et al. 2002). Es handelt sich daher um eine rein statistische Aussage, mit der noch nicht auf den Zeitpunkt erster Symptome bei der getesteten Person geschlossen werden kann. Das variable Erkrankungsalter unter Patienten mit ähnlicher Repeatlänge weist darauf hin, dass es noch andere Einflussfaktoren auf das Erkrankungsalter geben muss.

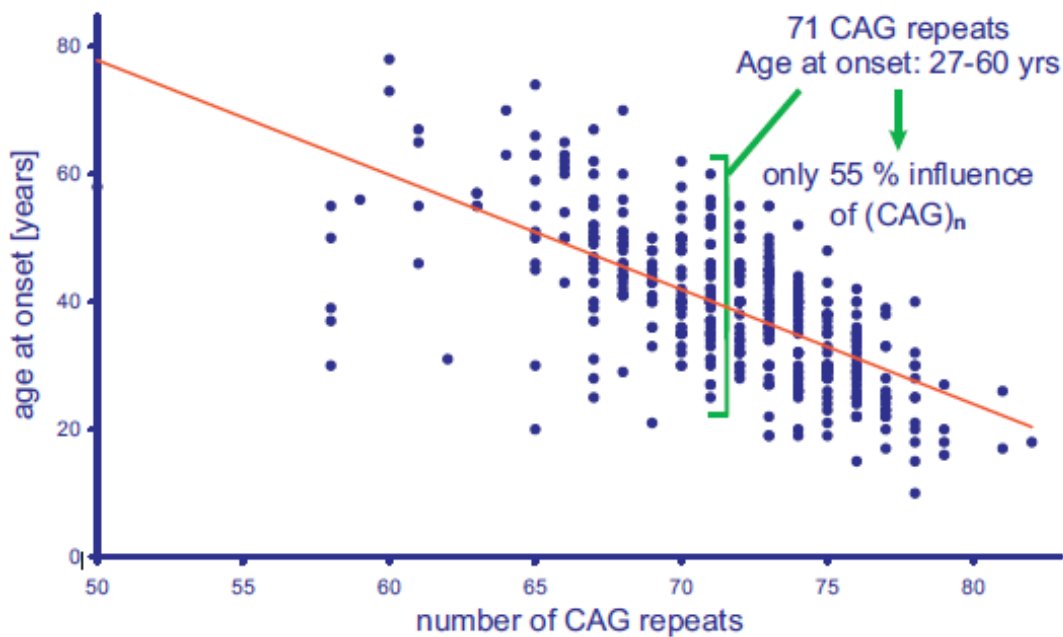


Abbildung 3: Korrelation zwischen der Anzahl der CAG-Wiederholungen und dem Erkrankungsalter bei SCA3 Patienten

Je höher die Anzahl der CAG-Wiederholungen im *ATXN3* Gen, desto früher erkranken die Betroffenen. Patienten mit 60 CAG-Wiederholungen erkranken etwa um das 70. Lebensjahr. Dagegen erkranken Patienten mit über 75 Wiederholungen bereits vor dem 30. Lebensjahr. Allerdings trägt dieser Faktor nur ca. 43% - 55% zum Erkrankungsalter bei. Daher muss es noch weitere Faktoren geben, die Einfluss auf das Erkrankungsalter der SCA3 nehmen.

Epigenetische Faktoren zeigen einen Einfluss auf das Erkrankungsalter der SCA3. Eine DNA-Methylierung in der Promotorregion des *ATXN3* Gens scheint geringfügig Einfluss auf das Erkrankungsalter der SCA3 Patienten zu nehmen (Emmel et al. 2011). Wang und Kollegen konnten erst kürzlich beobachten, dass bei Patienten mit frühem

Einleitung

Krankheitsbeginn die Methylierung der Promotorregion von *ATXN3* wesentlich stärker ausgeprägt ist (Wang et al. 2017).

Es konnte gezeigt werden, dass zwei SNPs im Exon 10 des *ATXN3* Gens einen Einfluss auf das Erkrankungsalter der SCA3 haben (Schmidt et al., 2012). Dabei handelt es sich um den Polymorphismus rs12895357, der direkt in 3' Richtung an die Trinukleotidwiederholung in Exon 10 grenzt, sowie um den Polymorphismus rs7158733, der sich etwas weiter in 3' Richtung befindet. Der SNP rs7158733 führt zu einer Nonsense-Mutation, der SNP rs12895357 zu einer Missense-Mutation mit Aminosäureaustausch. Es wird angenommen, dass es dadurch zu einer Instabilität des Proteins kommt. Ataxin-3 könnte daher in seiner Funktion oder Interaktion mit anderen Proteinen beeinträchtigt werden.

Des Weiteren beeinflusst Antizipation das Erkrankungsalter der Patienten betroffener Familien. Der Genabschnitt mit den CAG-Wiederholungen verhält sich bei der Vererbung an die nächste Generation instabil. Das führt in den meisten Fällen zu einer höheren Anzahl an CAG-Wiederholungen bei den Nachkommen des Betroffenen. Verlängerungen um bis zu acht Triplets sind beschrieben. Dieses Phänomen tritt gehäuft bei paternalen Transmission auf (Igarashi et al. 1996; Maruyama et al. 1995; Takiyama et al. 1993). Dabei spielt auch das Alter des übertragenden Elternteils zum Zeitpunkt der Konzeption eine Rolle (Souza et al. 2016). Diese dynamische Eigenschaft des *ATXN3* Gens führt dazu, dass Nachkommen eines Patienten tendenziell früher erkranken, als der Patient selbst. Zusätzlich ergibt sich ein höheres Risiko eines frühen Erkrankungsalters für Nachkommen betroffener Väter. Eine kürzlich veröffentlichte Studie konnte zeigen, dass familiäre Einflussfaktoren zu ca. 10% der Variabilität des Erkrankungsalters beitragen (de Mattos et al. 2018).

Homozygotie tritt bei der SCA3 sehr selten auf. Die wenigen Patienten, die Homozygot sind, zeigen wesentlich stärker ausgeprägte Krankheitssymptome und einen früheren Krankheitsbeginn, was einen Gendosiseffekt vermuten lässt (Carvalho et al. 2008; Lang et al. 1994; Lerer et al. 1996; Sobue et al. 1996).

Neben der Anzahl der CAG-Wiederholungen im mutierten Allel wurde auch die Anzahl der Wiederholungen im nicht von der CAG Expansion betroffenen *ATXN3* Allel als

Einleitung

unabhängiger positiver Vorhersagewert für das Erkrankungsalter beschrieben (Franca et al. 2012). In der Metaanalyse von de Mattos und Kollegen konnte die Zunahme der CAG Länge im nicht betroffenen *ATXN3* Allel die Vorhersage des Erkrankungsalters jedoch nicht signifikant verbessern (de Mattos et al. 2018).

Des Weiteren nimmt auch die CAG Expansion in anderen Genen Einfluss auf das Erkrankungsalter. Es konnte gezeigt werden, dass eine hohe Zahl an CAG-Wiederholungen in den Genen *ATXN2* und *ATXN1* zu einem früheren Erkrankungsbeginn der SCA3 führen. Im Gegensatz dazu führt eine geringe Zahl an CAG-Wiederholungen im *HTT* Gen zu einem herabgesetzten Erkrankungsalter (Tezenas du Montcel et al. 2014). Dieser zusätzliche Effekt auf das Erkrankungsalter wurde auch für die CAG Expansion in mehreren anderen Kandidatengenen vermutet. So wurde dieser Einfluss für *CACNA1A*, *ATXN7*, *TBP*, *ATN1* beschrieben. Einzig *ATXN2* verbessert die Vorhersage des Erkrankungsalters signifikant. Wobei das Vorhandensein von einem *ATXN2* Allel mit 27-33 CAGs bereits mit einem früheren Erkrankungsalter korreliert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass *ATXN2* als Einflussfaktor zusätzlich zur Anzahl der CAG Wiederholungen 0,39% zur Erklärung des Erkrankungsalters beiträgt (de Mattos et al. 2018). Dieser Zusammenhang lässt auf eine biologische Interaktion dieser Gene schließen.

Obwohl von zwei Arbeitsgruppen berichtet wurde, dass ein familiärer Faktor unabhängig von der Anzahl der CAG-Wiederholungen das Erkrankungsalter der SCA3 mitbeeinflusst, konnte ein solcher Faktor bisher nicht identifiziert werden (DeStefano et al. 1996; van de Warrenburg et al. 2005). Zunächst wurde vermutet, dass es bei Frauen im Vergleich zu ihren Brüdern mit ähnlicher Länge der Polyglutamineinheit zu einer späteren Manifestation der Krankheit kommt (Kawakami et al. 1995). Andere Autoren konnten jedoch keinen Einfluss des Geschlechts auf das Erkrankungsalter nachweisen (Dürr et al. 1995). Doch in der jüngst erschienen Studie von de Mattos und Kollegen wurde wiederholt dargelegt, dass männliche Patienten durchschnittlich früher erkranken und dieser Effekt unter Patienten mit besonders langen CAG Wiederholungseinheiten besonders stark ausgeprägt ist (de Mattos et al. 2018).

Die gleiche Arbeitsgruppe beschreibt einen Einfluss der Herkunft auf das Erkrankungsalter. Die Untersuchung umfasste Gruppen aus Europa, Asien, Nord- und

Einleitung

Zentralamerika sowie Brasilien. Dabei konnte die Herkunft die Vorhersage des Erkrankungsalters um 8,34% verbessern (de Mattos et al. 2018). Unter zusätzlicher Berücksichtigung der Anzahl der CAG Wiederholungen, dem familiären Effekt und dem *ATXN2* Genotyp konnte in dieser Arbeit ein Regressionsmodell erstellt werden, welches 73,5 % des Erkrankungsalters erklärt.

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass ähnlich wie beim Morbus Parkinson auch Umweltfaktoren wie ein gesunder Lifestyle den Ausbruch der Erkrankung verzögern.

Es gilt dabei immer zu beachten, dass die Länge der Polyglutamineinheit nicht präzise bestimmt werden kann, da der Genabschnitt einem somatischen Mosaik unterliegt (Cancel et al. 1998). In den verschiedenen Zellen eines Individuums kann sich die Anzahl der CAG-Wiederholungen demnach unterscheiden. Die Anzahl der CAG-Wiederholungen in Zellen des ZNS stimmt daher bspw. nicht immer mit der in Lymphozyten überein. Es kommt sogar zu Unterschieden zwischen Lymphozyten Subpopulationen.

1.2 High Resolution Melting Analyse mit dem Lightcycler 480

Es gibt viele Möglichkeiten, Sequenzunterschiede wie SNPs zu genotypisieren. Bei den meisten Methoden wird die zu untersuchende DNA Region zunächst mittels PCR amplifiziert. Die anschließende Analyse reicht von simplen Methoden wie dem Restriktionsverdau durch Endonukleasen mit anschließender Agarosegelelektrophorese bis zu komplexen Techniken unter Verwendung von Massenspektrometrie (Tost and Gut 2002). Methoden, bei denen keine Weiterbearbeitung nach Zugabe der Proben DNA notwendig ist, sogenannte Closed tube Verfahren, sind erfolgsversprechend.

Das High Resolution Melting (HRM) ist eine solche Closed tube Methode zur Detektion von Sequenzunterschieden in PCR Amplifikaten. Dabei werden die Sequenzunterschiede anhand des durch einen Basenaustausch veränderten Schmelzverhaltens der Doppelstrang DNA (dsDNA) sichtbar gemacht (Wittwer et al. 2003).

Einleitung

Das Schmelzverhalten von dsDNA wird durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst (siehe Kapitel 1.2.2). Dazu gehören die Länge, der GC Gehalt und die Sequenz des DNA Fragments (Taylor 2009). Kommt es zu einer Änderung der Sequenz durch einen Basenaustausch, verändert sich die Schmelztemperatur T_m . Dabei bedingt ein Austausch von A/T zu G/C einen Anstieg der Schmelztemperatur um 0.8-1.4°C (Liew, M. et al, 2004). Zeichnet man das Schmelzverhalten über die Zeit auf, äußert sich dieser Austausch in einem späteren Abschmelzen der Allelvariante mit dem Basenpaar G/C.

Durch die beschriebenen Unterschiede im Schmelzverhalten lassen sich neben homozygoten Allelvarianten auch Heterozygoten nachweisen. Heterozygote DNA Proben bilden sogenannte Heteroduplexe. Es lagern sich Einzelstränge, die an der Stelle des SNP nicht komplementäre Basen tragen, zu einem Doppelstrang zusammen (s.Abbildung 4). Da diese weniger stabil sind, denaturieren sie bereits bei geringerer Temperatur und generieren so, gemeinsam mit den in der Probe enthaltenen Homoduplexen, eine von der Schmelzkurve der homozygoten DNA Proben variierende Schmelzkurve.

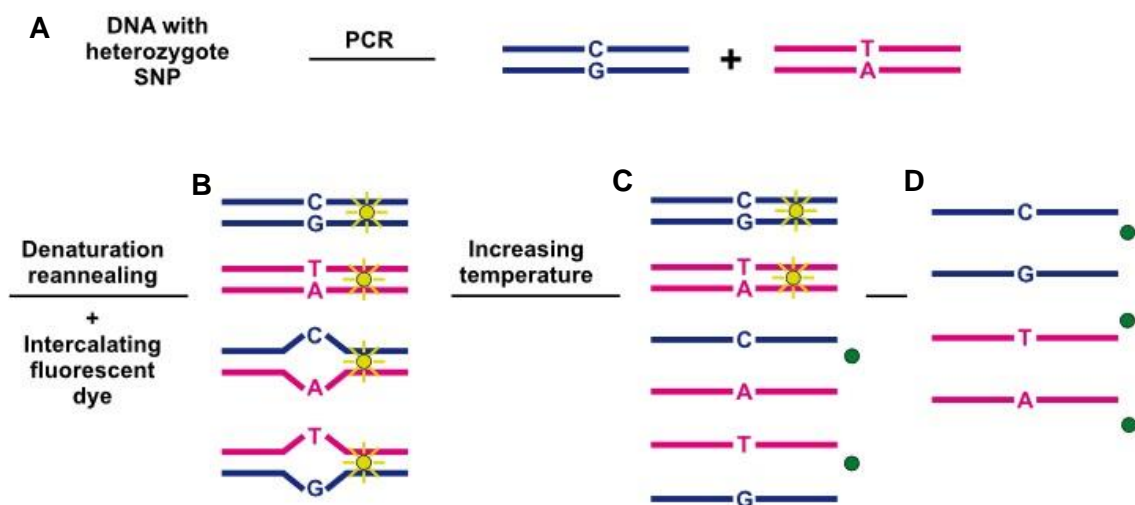


Abbildung 4: Schmelzverhalten einer heterozygoten Probe im HRM

Im Anschluss an die PCR (A) wird die Temperatur zunächst erhöht, bis die gesamte dsDNA denaturiert vorliegt. Die zufällige Zusammenlagerung der Einzelstränge erfolgt dann durch Abkühlen der Proben. Es bilden sich neben Homoduplexen auch Heteroduplexe (B). Wird die Temperatur erhöht, schmelzen die Heteroduplexe vor den Homoduplexen (C). Wird die Temperatur weiter gesteigert, schmelzen auch die Homoduplexe und setzen den interkalierten Farbstoff frei (D). (Quelle: www.roche-applied-science.com)

Einleitung

Für die Detektion der Schmelzkurvenunterschiede wird ein Fluoreszenzfarbstoff genutzt. Dieser ist in dem für das High Resolution Melting verwendeten LightCycler 480 HRM Master-Kit von Roche enthalten. Mit Hilfe dieses Farbstoffes, der zwischen die Basen von Nukleinsäuremolekülen interkaliert und bei Bindung sein Absorptionsspektrum verändert, wird das Abschmelzen des DNA Doppelstrangs visualisiert (Graham et al. 2005). Mit steigender Temperatur denaturieren, wie in Abbildung 6 dargestellt, immer mehr Doppelstränge zu Einzelsträngen. Der interkalierte Farbstoff wird dadurch aus der Bindung gelöst, verliert seine Fluoreszenzeigenschaft und das Fluoreszenzsignal nimmt ab. Die Veränderung der Fluoreszenzintensität über die Zeit wird vom LightCycler detektiert und in eine Schmelzkurve überschrieben.

Durch die Analyse der generierten Schmelzkurven können mit der im hierfür verwendeten LightCycler 480 II von Roche Diagnostics GmbH enthaltenen Gene Scanning Software sowohl heterozygote als auch homozygote Allelvarianten identifiziert werden (s. Abbildung 5) (Palais, Liew, and Wittwer 2005). Im Vergleich zur häufigeren homozygoten Variante verschiebt sich die Schmelzkurve der selteneren homozygoten Variante aufgrund der veränderten Schmelztemperatur auf der x-Achse. Die Schmelzkurven der heterozygoten Proben unterscheiden sich durch die Ausbildung von Heteroduplexen eindeutig in ihrer Form von denen der homozygoten Proben. Die beobachtete Schmelzkurve setzt sich in diesem Fall aus dem Abschmelzen der Heteroduplexen und Homoduplexen zusammen.

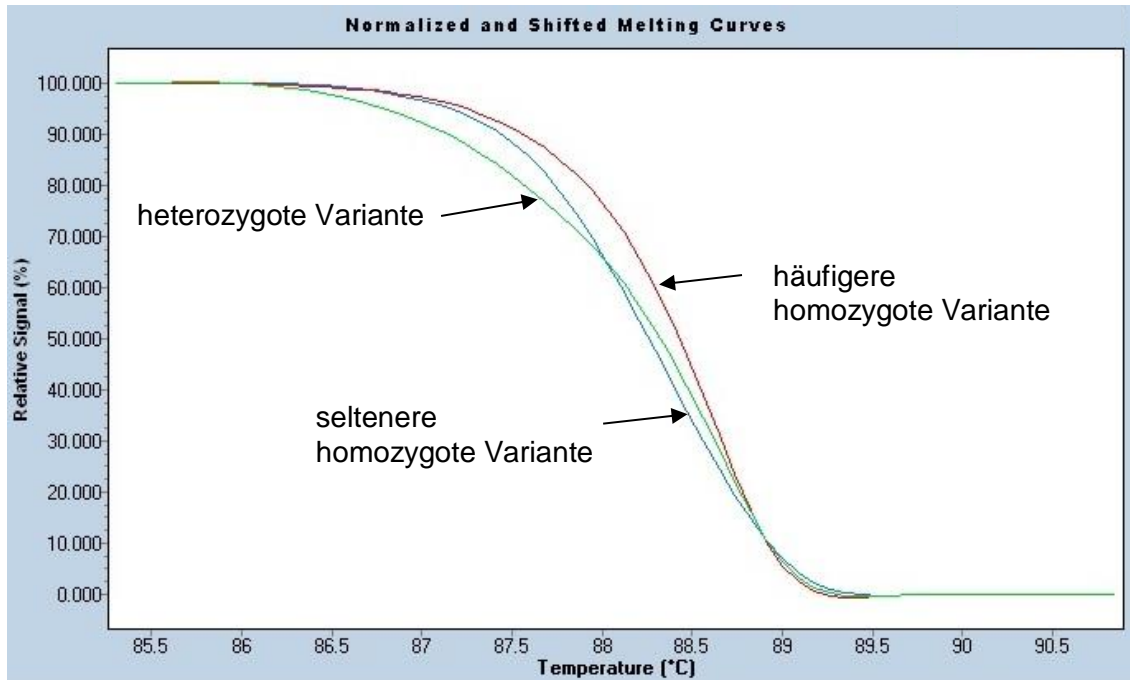


Abbildung 5: HRM eines SNP mit Homozygoter und Heterozygoter Variante

Es wurde das relative Fluoreszenzsignal bei kontinuierlich ansteigender Temperatur aufgezeichnet. Es sind drei unterschiedliche Schmelzkurven erkennbar. Im Vergleich zur häufigeren homozygoten Probe (rot) ist die Schmelzkurve der selteneren homozygoten Variante (blau) auf der x-Achse verschoben. Die Heterozygote Variante (grün) ist durch die sich unterscheidende Form der Schmelzkurve klar differenzierbar.

1.2.1 Nutzen des HRM

Das HRM zählt zu den sogenannten Closed tube Verfahren. Da durch die PCR eine ausreichend hohe Konzentration DNA zur Schmelzanalyse amplifiziert wird, muss das Reaktionsgefäß zwischen der Amplifikation und der Analyse im LightCycler nicht mehr geöffnet werden. Dies gewährleistet ein homogenes geschlossenes System, welches keine weiteren Bearbeitungsschritte mehr erfordert. Dadurch unterscheidet sich das HRM von anderen Methoden zur Genotypisierung wie der single strand conformational polymorphism analysis (SSCP), der denaturing high performance liquid chromatography (dHPLC) oder der denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Bei all diesen Methoden muss das PCR Produkt auf ein Gel oder eine andere Matrix zur Auftrennung und anschließenden Detektion aufgetragen werden (Orita et al. 1989; Lerman and Silverstein 1987; Xiao and Oefner 2001). Manche benötigen zusätzliche Arbeitsschritte, welche chemische oder enzymatische Reaktionen beinhalten. Jede

Einleitung

Weiterbearbeitung lässt das Risiko der Kontamination steigen (Elenitoba-Johnson and Bohling 2001). Durch die Anwendung der HRM Methode wird das Risiko für eine Kontamination der Proben signifikant gesenkt.

Konventionelle Closed tube Techniken benötigen fluoreszenzmarkierte Sonden, welche kostenintensiv sind und nur eine Allelform detektieren können. Im Gegensatz dazu benötigt die Genotypisierung mittels HRM keine teuren fluoreszenzmarkierten Sonden, und eine einzige unmarkierte Sonde kann multiple Allele detektieren.

Das HRM ermöglicht darüber hinaus die Detektion der SNPs unabhängig von ihrer Position im untersuchten DNA Abschnitt. Sogar multiple SNPs, die nahe beieinander liegen, können unterschieden werden. Dabei ist die Detektion unabhängig von der Art des SNPs möglich (Reed and Wittwer 2004). Es lassen sich mittels HRM mehr als zwei Allele unterschieden (Tindall et al. 2009). Dies ist am einfachsten unter Verwendung von bereits sequenzierten Proben, die als Standard in die Versuchsreihe integriert werden. Multiple Allele können auch von einer unmarkierten Sonde erkannt werden (Kapitel 1.2.3), während andere Methoden stets eine Sonde pro Allel benötigen. Vossen und Kollegen konnten zeigen, dass mit einer unmarkierten Sonde bis zu zehn verschiedene Allele differenziert werden können (Vossen et al. 2009).

Ein weiterer Vorteil ergibt sich aus der neuen Generation der Fluoreszenzfarbstoffe. Obwohl SYBR Green I zwischen einigen Varianten mit unterschiedlicher Schmelztemperatur wie bspw. größeren Deletionen, Wiederholungsregionen und Methylierungen differenzieren kann, ist es schwierig, Heteroduplexe mit SYBR Green zu detektieren. Auch die Genotypisierung mit unmarkierten Sonden im Anschluss an eine asymmetrische PCR war mit SYBR Green I nicht erfolgreich (Zhou et al. 2004). Da nur Konzentrationen verwendet werden können, die kompatibel mit den PCR Bedingungen sind, SYBR Green I kann dann jedoch nicht zwischen alle DNA Doppelstränge interkalieren. Die für das HRM verwendeten Farbstoffe detektieren dagegen alle Doppelstränge in einer Lösung, da sättigende Konzentrationen die PCR nicht hemmen (Erali, Palais, and Wittwer 2008; Herrmann et al. 2006).

Das HRM ist unkompliziert durchführbar und hat eine signifikante Zeitersparnis zur Folge. Die Leistung von DNA Schmelzanalysen hängt von deren Auflösung ab.

Einleitung

Studien, unter Verwendung von UV Absorption benötigten mehrere Stunden, um hochauflösende Daten zu generieren. Im Vergleich dazu kann das HRM viel schneller, mit 10 bis 100-facher Datendichte durchgeführt werden (Wittwer et al. 2003). Es wird demnach ein wesentlich höherer Durchsatz als bei den üblicherweise verwendeten Methoden zum Mutationsscanning erreicht (Taylor and Taylor 2004). Dabei können bis zu 384 Proben gleichzeitig untersucht werden. Je mehr Proben untersucht werden, desto größer ist der Informationsgewinn bzw. die Sensitivität der Untersuchung.

Sobald die Bedingungen für das HRM einmal etabliert wurden, müssen diese nicht mehr den verschiedenen Amplifikaten angepasst werden. Es kann im Gegensatz zu vielen anderen verbreiteten Methoden derselbe Ansatz für alle Amplifikate gewählt werden (Taylor and Taylor 2004; Chou, Lyon, and Wittwer 2005). Mit einem geringen Arbeitsaufwand wird so eine relevante Zeitersparnis erzielt (Montgomery et al. 2007). Die Struktur der DNA wird durch die HRM Analyse nicht verändert oder zerstört. Demnach können im Anschluss weitere Untersuchungen wie Sequenzierung oder Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt werden (Vossen et al. 2009). Eine signifikante Kostenersparnis entsteht, da im Unterschied zu anderen Methoden wie beispielsweise der SSCA, dHPLC oder DGGE keine anschließenden Trennverfahren nötig sind (Taylor 2009).

Das HRM ist darüber hinaus hoch sensitiv und spezifisch. Es hat bei der Suche nach heterozygoten SNPs in Produkten bis 1000bp eine Sensitivität von 97% und eine Spezifität von 99%. Für PCR Produkte < 300bp konnten Reed und Kollegen sogar eine Sensitivität von 100% beobachten (Reed and Wittwer 2004). Die Fehlerrate hängt demnach von der DNA Produktgröße ab. Die wenigen Varianten, die nicht mittels Schmelzen der Amplifikate erkannt werden können, können anhand unmarkierter Sonden genotypisiert werden. Zusammenfassend stellt das HRM eine einfach zu handhabende, flexible, kostengünstige, nicht destruktive Methode mit sehr hoher Sensitivität und Flexibilität dar.

1.2.2 Schmelzverhalten der dsDNA

Die Temperatur, bei der 50 Prozent der dsDNA in Einzelsträngen vorliegt, wird als Schmelztemperatur T_m bezeichnet (s. Abbildung 6). Der T_m -Wert einer dsDNA ist abhängig von ihrer Länge, ihrer Sequenz und ihrem GC Gehalt.

Je höher der Anteil an Guanin und Cytosin innerhalb der dsDNA, desto höher liegt die Schmelztemperatur. Diese Tatsache lässt sich durch die Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen erklären. Während zwischen Guanin und Cytosin drei Wasserstoffbrückenbindungen bestehen, werden Adenin und Thymin nur durch zwei Wasserstoffbrücken verbunden. Es muss also mehr Energie in Form von Wärme aufgebracht werden, um die Bindung zwischen Guanin und Cytosin zu trennen.

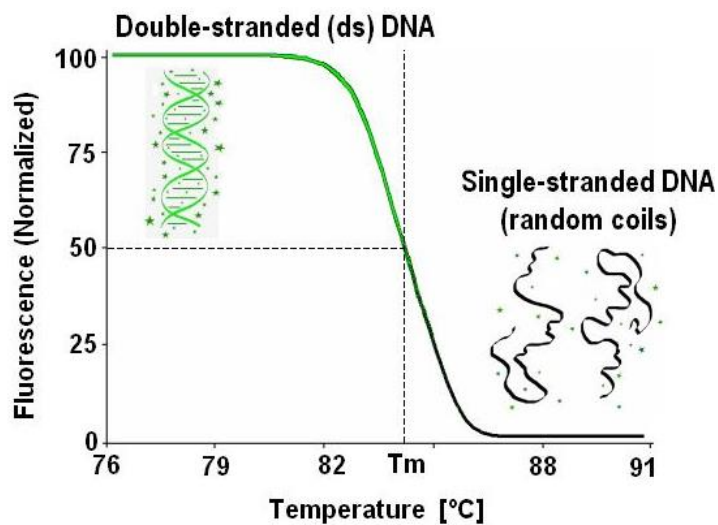


Abbildung 6: Veränderung des Fluoreszenzsignals beim Schmelzen von dsDNA mit steigender Temperatur

Mit steigender Temperatur denaturieren die Doppelstränge zu Einzelsträngen. Zu Beginn der Messung besteht ein starkes Fluoreszenzsignal, da die DNA zu diesem Zeitpunkt vollständig als Doppelstrang vorliegt. Mit steigender Temperatur dissoziieren immer mehr Doppelstränge zu Einzelsträngen. Der interkalierte Farbstoff löst sich und die Fluoreszenzintensität nimmt ab. Die Temperatur bei 50% Signalstärke wird als Schmelztemperatur T_m festgelegt. (Quelle: dna.utah.edu)

Einleitung

Um ein homogenes Schmelzprofil zu erhalten, muss der GC Gehalt gleichmäßig über den DNA Doppelstrang verteilt sein. Finden sich Bereiche innerhalb der dsDNA mit besonders hohem GC Gehalt, führt das zu einer zeitlich versetzten Denaturierung und damit zu zusätzlichen Schmelzdomänen. Unterschiede im Schmelzverhalten können dann nicht mehr auf Veränderungen der Sequenz zurückgeführt werden. Der T_m Wert ist in diesem Fall nicht definiert. Die Wahrscheinlichkeit für zusätzliche Schmelzdomänen steigt auch mit der Länge des DNA Abschnitts.

Um das Vorhandensein von mehreren Schmelzdomänen auszuschließen, kann das Schmelzverhalten vorab virtuell untersucht werden.

1.2.3 Unmarkierte Hybridisierungssonden

Durch die Entstehung der Heteroduplexe ist die Differenzierung zwischen homozygoten und heterozygoten Proben eindeutig. Der Unterschied zwischen den Schmelzkurven der homozygoten Allelvarianten ist geringer (Liew et al. 2004). Besonders die homozygoten Genotypen der sogenannten Basenpaar neutralen SNPs lassen sich durch eine Schmelzkurvenanalyse manchmal nicht eindeutig unterscheiden (Gundry et al. 2008). Ursächlich dafür ist, dass die ausgetauschte Base im SNP keine Veränderung im Energiegehalt hervorruft. Die Schmelztemperatur unterscheidet sich dann um höchstens 0.40°C . Im Vergleich dazu bewirken SNPs in welchen ein Allel den Genotyp A :: T und das Andere den Genotyp G :: C trägt (diese machen ca. 84% aller SNPs im menschlichen Genom aus) einen Unterschied von ca. 1°C . Der geringe Unterschied der Schmelztemperatur der Basenpaar neutralen SNPs kann sogar unter den besten Bedingungen und mit den sensibelsten Instrumenten durch eine einfache Schmelzanalyse der Amplifikate nicht sicher detektiert werden (Montgomery et al. 2007).

Um die Schmelzprofile dieser Varianten trotzdem unterscheiden zu können, könnten beispielsweise eine quantitative Heteroduplexanalyse (Palais, Liew, and Wittwer 2005) oder Snapback Primer (Zhou et al. 2008) verwendet werden. In dieser Arbeit werden sogenannte unmarkierte Hybridisierungssonden zur Differenzierung dieser Varianten genutzt (Zhou et al. 2004). Diese erlauben dabei die Typisierung fast aller Genotypen (Vossen et al. 2009).

Einleitung

Diese Sonden binden, wie in Abbildung 7 zu erkennen ist, komplementär an den Bereich, in dem sich der SNP befindet. Der T_m -Wert dieser Verbindungen liegt weit unter dem der dsDNA. Daher liegt die detektierte Schmelzkurve zeitlich vor der Schmelzkurve der Amplifikate.

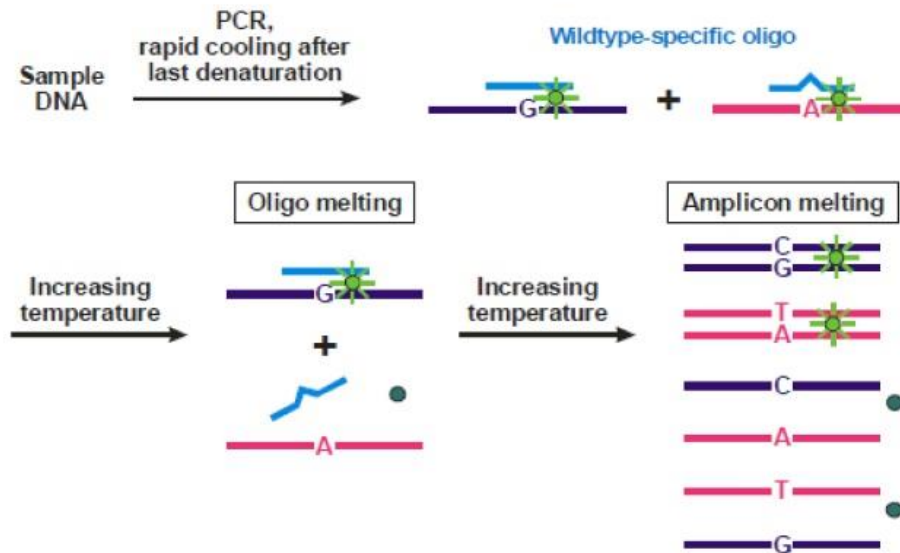


Abbildung 7: HRM Ansatz mit unmarkierter Hybridisierungssonde

Die Proben werden im Anschluss an die PCR abgekühlt. Die PCR Amplifikate lagern sich zu Doppelsträngen zusammen. Zusätzlich bilden sich Paarungen zwischen DNA Einzelsträngen und den unmarkierten Sonden. Mit steigender Temperatur schmelzen zunächst die Paarungen aus Sonde und nicht komplementärer Base im SNP. Daraufhin lösen sich die Sonden von den übrigen DNA Strängen. Wird die Temperatur weiter erhöht, schmelzen auch die Amplifikate voneinander ab. Jeder dieser Schritte generiert eine Veränderung im Fluoreszenzsignal, welche vom LightCycler 480 aufgezeichnet wird. (Quelle: www.roche-applied-science.com)

Die Sonde ist nur zu einer der Varianten im SNP komplementär. Entsprechend ist die Bindung der Sonde an diese Variante stabiler und der T_m -Wert liegt höher. Dies zeigt sich in der generierten Schmelzkurve durch einen späteren Peak im Vergleich zum Abschmelzen der Sonde von der nicht komplementären Variante. Bei einer heterozygoten Probe resultieren daher zwei Peaks in der Schmelzkurve (s. Abbildung 8).

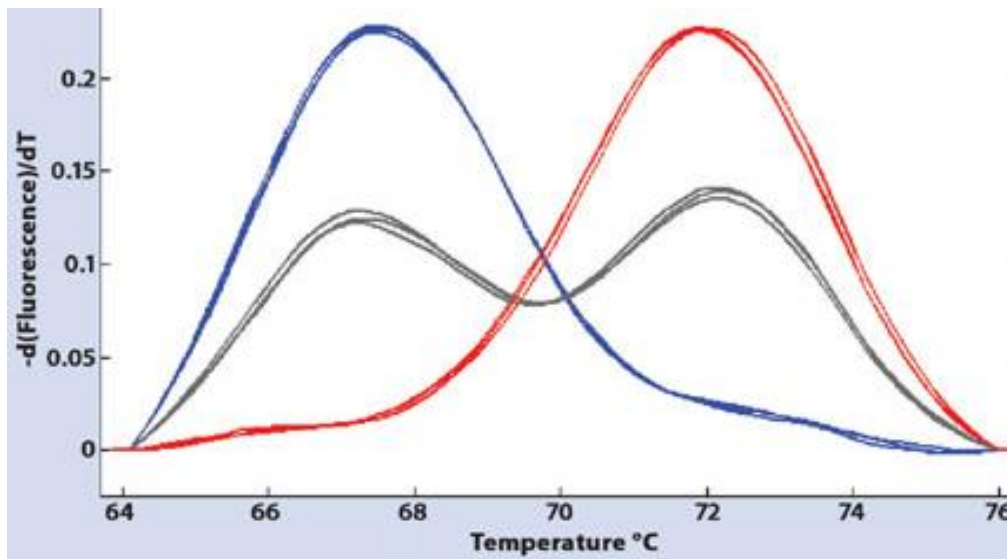


Abbildung 8: HRM Ansatz mit homozygoter und heterozygoter Probe unter Verwendung einer unmarkierten Hybridisierungssonde

Abgebildet ist die Fluoreszenzintensität während der Temperaturerhöhung von 64°C bis 76°C. Durch das Abschmelzen der Sonden von den DNA Fragmenten werden deutlich sichtbare Peaks hervorgerufen. Die Sonde schmilzt zuerst von den DNA Strängen mit nicht komplementärer Base an der Stelle des SNP ab und ruft den ersten Peak (blau) hervor. In diesem Versuchsansatz sind demnach zwei Proben mit nicht komplementärer Base vorhanden. Mit steigender Temperatur löst sich die Sonde von den zwei DNA Strängen mit komplementärer Base, was wiederum einen Fluoreszenzpeak (rot) hervorruft. Die drei heterozygoten Proben (grau) generieren entsprechend einen doppelten Peak. (Quelle:(deSilva and Blackett 2007))

1.2.4 HRM in der molekulargenetischen Diagnostik

Die zwei Hauptanwendungsgebiete für das HRM sind die gezielte Genotypisierung bekannter SNPs (Liew et al. 2004) sowie die Suche nach unbekanntem Varianten (Gene Scanning) (Reed and Wittwer 2004). Diese können auch gleichzeitig im selben Amplifikat erfolgen. Kombiniert man das HRM mit einer rapid cycle PCR, stellt es die ideale Methode zur individuellen DNA Diagnostik dar.

Die Bedeutung des HRM ist im letzten Jahrzehnt in vielen Bereichen der molekularen Diagnostik gestiegen. In der klinischen Praxis ist vor allem die Verwendung als Methode zum Mutationsscreening denkbar. De Leeneer und Kollegen konnten zeigen, dass dies selbst für sehr große Gene wie die Breast Cancer Gene 1 und 2 (*BRCA1* und *BRCA2*) möglich ist (De Leeneer et al. 2009). Für das *BRCA1* Gen, ein

Einleitung

Tumorsuppressorgen, dessen Mutationen mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für ein Mammakarzinom einhergeht, konnte bereits ein vielversprechender Ansatz entwickelt werden (van der Stoep et al. 2009).

Die Detektion von SNPs als Basisdiagnostik in der sogenannten stratifizierten Medizin gewinnt immer mehr an Bedeutung (Bruzzone and Steer 2015). Anwendung könnte das HRM bspw. in der individualisierten Pharmakotherapie finden. Warfarin ist ein Antikoagulant mit enger therapeutischer Breite. Bei falscher Dosierung kann es zur Blutungsneigung oder zu einer ausgeprägten Thrombophilie kommen. Die erforderliche Dosis hängt unter anderem von Sequenzvarianten in Enzymen ab, die für die Metabolisierung von Warfarin zuständig sind. Eine schnelle Genotypisierung dieser Loci um die erforderliche Dosis näherungsweise zu bestimmen, könnte viele Patienten vor Komplikationen bewahren (Reed, Kent, and Wittwer 2007).

Das HRM könnte auch genutzt werden, um RNA Sequenzvarianten mit Hilfe einer reversen Transkriptase zu detektieren. Kombiniert mit rtPCR, Quantifizierung und Genotypisierung derselben Probe in einem Versuchsansatz könnte dies beispielsweise in der Hepatitis C Diagnostik Anwendung finden (Reed, Kent, and Wittwer 2007).

2. Fragestellung und Ziel der Arbeit

Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der CAG-Wiederholungen im *ATX3* Gen direkten Einfluss auf das Erkrankungsalter der SCA3-Patienten nimmt. Je länger der CAG-Abschnitt, desto früher erkranken die Patienten. Man weiß, dass die Anzahl der CAG-Wiederholungen nur ca. 43%-55% zum Erkrankungsalter beiträgt. Unklar ist, welche weiteren Faktoren das Erkrankungsalter signifikant beeinflussen. Es ist daher wahrscheinlich, dass bislang unbekannte Polymorphismen einen Anteil zum Erkrankungsalter der SCA3-Patienten beitragen.

Ataxin-3 ist bei Betroffenen im Zellkern lokalisiert, wo es intranukleäre Einschlusskörperchen bildet. Es könnten daher Proteine, die am nukleozytoplasmatischen Transport beteiligt sind, auf die Lokalisation von Ataxin-3 einwirken. Wird die Aktivität dieser Transportproteine durch Polymorphismen verändert, hätte dies direkten Einfluss auf den Pathomechanismus. Ataxin-3 wird außerdem von Caspasen und Calpaine gespalten, bevor es zur Ausbildung der spezifischen Kerneinschlusskörperchen kommt. Erst durch diese proteolytische Spaltung wird der nukleozytoplasmatische Transport möglich. Nach der sogenannten "Toxischen Fragment Hypothese" werden daher die durch die Spaltung entstehenden Polyglutaminfragmente als zentraler Einflussfaktor der Pathogenese der SCA3 gesehen.

Aus diesem Grund ist es Ziel dieser Arbeit, SNPs in für solche Transportproteine sowie an der proteolyse von Ataxin-3 beteiligten Enzyme kodierenden Genen zu identifizieren sowie deren Einfluss auf das Erkrankungsalter zu bestimmen.

Zu diesem Zweck werden SNPs zur Typisierung ausgewählt, die einen Einfluss auf den Pathomechanismus der SCA3 vermuten lassen. Für diese SNPs sollen optimale Bedingungen zur Typisierung mittels High Resolution Melting (HRM) etabliert werden. Das HRM ermöglicht eine schnelle sowie hoch sensitive und spezifische Genotypisierung der Patienten anhand der Detektion von Unterschieden in der Schmelzkurvenanalyse. Durch die Ermittlung der Genotypen für die zu untersuchenden SNPs in den Patientenproben und das bekannte Erkrankungsalter dieser Patienten soll letztendlich ermittelt werden, welchen Beitrag die Veränderungen in den untersuchten Proteinen zum Erkrankungsalter und zur Pathogenese der SCA3 leisten.

3. Material

3.1 Probenmaterial

Im Rahmen des EUROSCA-Konsortiums wurden innerhalb von sechs Jahren europaweit insgesamt über 580 Proben von SCA3-Patienten gesammelt. Einer Analyse dieser Proben zu Forschungszwecken wurde von jedem der Patienten ausdrücklich zugestimmt. Klinische Daten wie bspw. das Erkrankungsalter und die Familienzugehörigkeit dieser Patienten wurden genauso wie deren Anzahl an CAG-Wiederholungen im *ATXN3* Gen in einer Datenbank hinterlegt. In vorausgegangenen Mutationscreenings konnte festgestellt werden, dass die Qualität der Patienten DNA zur Genotypisierung ausreichend gut ist. Die in dieser Arbeit verwendeten 492 Patientenproben stammen allesamt aus dem Pool des EUROSCA-Konsortiums.

Zur Etablierung der PCR und HRM Bedingungen wurden DNA Proben aus der CEPH Studie verwendet. Diese standen in großer Menge und hoher Konzentration zur Verfügung. Der begrenzte Bestand an Patienten DNA wurde dadurch geschont.

3.2 Primer

Tabelle 1: Sequenzen aller verwendeten Primer F= Vorwärts-, R=Rückwärts Primer

Die Primersequenzen sind in 5'→3' Richtung aufgeführt.

Bezeichnung	Sequenz [5'-3']
XPO6-Ex18-F1	TCTGCCACAAAGAACAATGC
XPO6-Ex18-F2	GCTTCAGGTTGCGATAGTCC
XPO6-Ex18-R1	CAGAGAATGAGCAGCAGTGG
XPO6-Ex18-R2	TCTCTTGTAGGCCCAGGTGT
IPO4-Ex17-F1	ACCACCTTTGGTCCCCTAG
IPO4-Ex17-R1	GTCCAGTGGGAAGACAGGAG
IPO4-Ex17-F2	GGTGCTAATGGAGCCCTTG
IPO4-Ex16-F1	ATCTGCACAGGCTGAAGGTC
IPO4-Ex16-R1	GAGCCATTGGTGAGGAGAGA
CAST-Ex23-F1	GCGGAGTGTCTTGTGGTCT

Bezeichnung	Sequenz [5' - 3']
CAST-Ex23-F2	AATCTAAGGCCGCTGCTC
CAST-Ex23-R1	AGTGACAGGAGGAGGCAGAA
CAST-Ex23-R2	TCAGGGGGTGCTGACTGTAT
CAPN2-Ex17-F2	TCTGTATGTGAAGGGCACAGA
CAPN2-Ex17-R3	CCCTGGAGCACATTAAGGA
KPNA2-Ex08-F1	GCTCACCAACCCCAAACTA
KPNA2-Ex08-R1	AACACTGACAAGGAATGGGACT
KPNA2-Ex08-F2	CTCCTGCCCTAAGAGCCATA
KPNA2-Ex08-R2	AAGGAATGGGACTAATCCATGA

Sämtliche Primer wurden von Metabion International AG, Martinsried bezogen. Die Konzentration der gelieferten Stocklösungen betrug 100 pmol/µl. Aus diesen wurden Arbeitslösungen mit einer Konzentration von 10 pmol/µl hergestellt. Die Verdünnung erfolgte mit sterilem H₂O (Ampuwa). Die Stocklösungen wurden mit laborinternen fortlaufenden Nummern versehen und genau wie die Arbeitslösungen bei -20 °C gelagert. Die tatsächlich zur Genotypisierung verwendeten Primer sind in Tabelle 25 aufgeführt.

3.3 Sonden

Tabelle 2: Sequenzen der verwendeten Sonden

Bezeichnung	Sequenz [5' - 3']
XPO6-Ex18-S-P	TGAGGCTGGCGTGGTTGATGG
XPO6-Ex18-R-S-P	CCATCAACCAGGCCAGCCTCA
IPO4-Ex17-S-P	AGGTAGACGACCCTGACTTGCGG
IPO4-Ex17-R-S-P	CCGCAAGTCAGCGTCGTCTACC
IPO4-Ex16-S-P	CAGCAGCGAGGCCTGGGCAG
IPO4-Ex16-R-S-P	CTGCCCAGGTCTCGCTGCTG
CAST-Ex23-S-P	GAGGCTGTGTGTCGGACCTC
CAPN2-Ex17-S-P	GCCAAGATATCAAGTCAGATGGC
KPNA2-Ex08-S-P	CATCACAGCCGGCCGCCAGGA

Sämtliche Sonden wurden von Metabion International AG, Martinsried bezogen. Sie wurden vom Hersteller am 3' Ende mit einer Phosphorylierung markiert. Die Konzentration der gelieferten Stocklösungen betrug 100 pmol/µl. Aus diesen wurden Arbeitslösungen mit einer Konzentration von 10 pmol/µl hergestellt. Die Verdünnung erfolgte mit sterilem Wasser für Injektionszwecke (Ampuwa). Die Stocklösungen wurden mit laborinternen fortlaufenden Nummern versehen und genau wie die Primer bei -20 °C gelagert.

3.4 Enzyme

Tabelle 3: Verwendete Enzyme und Hersteller

Enzym	Hersteller
OneTaq DNA Polymerase	New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main, D
FastStart Polymerase	New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main, D
<i>Bco</i> DI (10000 U/ml)	New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main, D
<i>Mme</i> I (2000 U/ml)	New England BioLabs GmbH, Frankfurt am Main, D

Für alle aufgeführten Enzyme wurde der vom Hersteller bereitgestellte Puffer verwendet.

3.5 DNA-Größenmarker

Folgende Abbildung 9 zeigt die DNA-Größenstandards, welche entsprechend den Vorgaben der Hersteller zur qualitativen sowie quantitativen Analyse von DNA-Fragmenten verwendet wurden.

Material

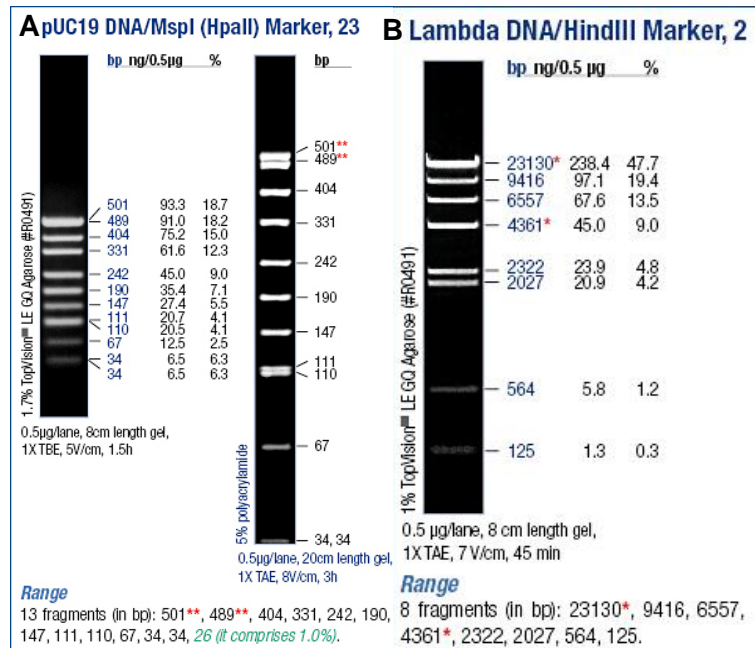


Abbildung 9: DNA Größenstandards

A: pUC19 DNA/MspI (HpaII) Marker, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D **B:** Lambda DNA/HindIII Marker, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D

3.6 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Reagenzien mit Herstellerangaben

Bezeichnung	Hersteller
Ampuwa (steriles Wasser für Injektionszwecke)	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, D
Desoxynukleotide (dNTPs) 10mM	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
DNA-Ladepuffer 6x	Promega, Madison, WI, USA
GenomeLab DNA Size Standard Kit – 600	Beckman Coulter, Beverley, MA, USA
Glycogen	Beckman Coulter, Beverley, MA, USA
Lambda/HindIII DNA Größenmarker	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
pUC19/Msp3I DNA Größenmarker	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D

In Tabelle 4 nicht aufgeführte Chemikalien wurden in größtmöglicher Reinheit von folgenden Herstellern bezogen: Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe; Fresenius Kabi AG, Bad Homburg; Invitrogen GmbH, Karlsruhe; Merck KGaA, Darmstadt; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim.

3.7 Lösungen und Puffer

Tabelle 5: Verwendete Lösungen und Puffer und deren Zusammensetzung

Bezeichnung	Zusammensetzung
DNA Ladepuffer 10x	8% (w/v) Ficoll 0,05% (w/v) Bromphenolblau in 1x TBE
TBE Puffer 10x	890mM Tris 890mM Borsäure 20mM EDTA (pH 8,0)
3M Natriumacetat (pH 5,2)	3M Natriumacetat mit Essigsäure 100% auf pH 5,2 titriert
100mM Na ₂ EDTA (pH 8,0)	100mM Na ₂ EDTA mit 5M NaOH auf pH 8,0 titriert

Alle Lösungen und Puffer wurden mit Ampuwa angesetzt. Die Lagerung erfolgte entsprechend ihrer Zusammensetzung bei Raumtemperatur oder bei 4°C.

3.8 Reagenziensets

Tabelle 6: Verwendete Reagenziensets

Kit	Hersteller
Agencourt AMPure	Beckman Coulter, Beverley, MA, USA
GenomeLab DTCS Quick Start Kit	Beckman Coulter, Beverley, MA, USA
LightCycler 480 High resolution Melting Master Kit	Roche Diagnostics, Mannheim, D
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden, D

3.9 Geräte

Tabelle 7: Verwendete Geräte mit Hersteller und Bezeichnung

Gerät	Bezeichnung und Hersteller
Gelelektrophoresekammern	Bio-rad Laboratories GmbH, München, D
LightCycler	LightCycler 480 II, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D

Material

NanoDrop	NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, NanoDrop Technologies, Wilmington, USA
Photometer	Ultraspec 3100 pro Amersham Biotech Bioscience Europe GmbH, Freiburg, D
Sequenzierer	CEQ 2000 Genetic Analysis System, Beckman Coulter, Beverly, MA, USA
Thermo Cycler	G-storm, AlphaMetrix Biotech GmbH, Rödermark, D
Vakuumzentrifuge	Vakuumzentrifuge Concentrator 5301, Eppendorf AG, Hamburg, D

3.10 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8: Verwendete Materialien

Kit	Hersteller
Easy Peel Thermo Scientific	ABgene House, Surrey, UK
Easy Pierce Strong Metallfolie	peqLab, Erlangen, D
LightCycler 480 Sealing Folie	Roche Diagnostics, Mannheim, D
LightCycler 480 Multiwell Plate 96	Roche Diagnostics, Mannheim, D
LightCycler 480 Multiwell Plate 384	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Reaktionsgefäß, 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Reaktionsgefäß, 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg, D
Sequenzierplatte 96-well	Greiner bio-one, Frickenhausen, D

3.11 Software

Tabelle 9: Verwendete Software mit Entwickler und Version

Software	Entwickler	Version
GenomeLab Genetic Analysis System	Beckman Coulter, Beverly, MA, USA	Instrument Version 8.1.1 Software Version 10.2.4
LightCycler Software	480 Idaho Technology Inc., Salt Lake City, UT, USA	Release 1.5.0 SP4, Version 1.5.0.39
Microsoft Excel 2010	Microsoft Corp., Redmond, WA, USA	Version 14.0.5128.5000

NanoDrop ND-1000	NanoDrop Technologies, Wilmington, NC, USA	Version 3.6.0
Chromas Lite	Technelysium Pty Ltd, Brisbane, AU	Version 2.3
Biostep ArgusX1	Biostep, Jahnsdorf, D	Version 3.3.0

3.12 Datenbanken und Serviceprogramme

Tabelle 10: Verwendete Datenbanken und Serviceprogramme

Datenbanken und Serviceprogramme	URL
BLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
DNA Melting Analysis	http://.dna.utah.edu/umelt/um.php
Hardy Weinberg Calculator	http://emerald.tufts.edu/courtlab
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
NEBcutter	http://tools.neb.com/NEBcutter2/
NHLBI Exome Sequencing Project	http://evs.gs.washington.edu/EVS/
Oligonucleotid Calculation	http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html
Olgionukleotiddesign	http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/
Primer3 Version 0.4.0	http://frodo.wi.mit.edu/primer3/
Reverse Complement	http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html
1000 Genomes	http://browser.1000genomes.org/index.html

4. Methoden

4.1 Primer Design

Alle für die PCRs und die Genotypisierung mittels HRM benötigten Oligonukleotide wurden mit Hilfe des online verfügbaren Programms Primer 3 (s. Tabelle 10) erstellt. Das Primer-Design erfolgte anhand festgelegter Kriterien. Die Amplifikate für das HRM sollten eine Länge von 400bp nicht überschreiten. Der zu untersuchende SNP sollte möglichst mittig zwischen den beiden Primern liegen. Um die Ausbildung von Primer-Dimern zu vermeiden, wurde darauf geachtet, dass die Primersequenz weder selbstkomplementär noch komplementär zur Sequenz des zweiten Primers ist. Innerhalb

Methoden

der Zielsequenz durften bis auf den Bereich um den zu untersuchenden SNP keine weiteren Primerbindungsstellen vorkommen. Die Länge der Primer sollte zwischen 18-25 bp liegen und der GC-Gehalt idealerweise 40-60% betragen. So konnte die optimale Schmelztemperatur (T_m) von ca. 60°C für die spätere Genotypisierung mittels HRM gewährleistet werden. Darüber hinaus wurde beachtet, dass die T_m der beiden Primer möglichst nahe beieinander lag. Lange Poly-A, -T, -G oder -C Sequenzen wurden vermieden.

Um die festgelegten Parameter zu verifizieren wurde die in Tabelle 9 aufgeführte Software verwendet. Mit den so designten Primerpaaren wurde in einer *in silico* PCR das Vorhandensein von zusätzlichen PCR Produkten ausgeschlossen. Auf diese Weise wurden für jeden SNP mindestens zwei Primerpaare designt, von denen während der folgenden Etablierung das effizienteste Primerpaar ausgewählt wurde (s. Kapitel 5.2.1).

4.2 Konzentrationsbestimmung anhand der optischen Dichte

Sowohl die Konzentration der DNA in den CEPH-Proben als auch die der Patientenproben war zunächst unbekannt. Die Konzentrationsbestimmung dieser Stocklösungen erfolgte mit dem NanoDrop ND-1000-Spektrophotometer. Die optische Dichte (OD) der aufgetragenen Lösung wird von dem Gerät bei einer Wellenlänge von 260nm gemessen. Die entsprechende Software (Tabelle 9) bestimmt daraus die Konzentration sowie die Reinheit der in der Probe enthaltenen DNA. Etwaige Verunreinigungen durch Substanzen, welche die optische Dichte beeinflussen würden wie bspw. Proteine oder Lösungsmittel, konnten dadurch ausgeschlossen werden.

Für die Messungen wurde 1 µl DNA aufgetragen. Es wurden jeweils drei Proben gemessen und aus den Messwerten das arithmetische Mittel berechnet. Als Referenz diente steriles H₂O. Aus den so ermittelten DNA Konzentrationen der Stocklösungen konnten Verdünnungen entsprechend dem Bedarf für die Polymerasekettenreaktionen (PCRs) bzw. das HRM hergestellt werden.

4.3 Konzentrationsabschätzung anhand der Agarose-Gelelektrophorese

Um die Menge der einzusetzenden DNA für die Sequenzierreaktionen bestimmen zu können, wurde die Konzentration der Proben mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese abgeschätzt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte dabei durch den Vergleich der Bandenintensität der DNA Probe mit jener des pUC19/Msp31 DNA Größenmarkers im Agarosegel.

Die Fragmentlängen sowie die aufgetragene Menge des pUC19/Msp31 DNA Größenmarkers waren bekannt. So konnte dieser als Referenz zur Quantifizierung der DNA eingesetzt werden.

4.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein *in vitro*-Amplifikationsverfahren von definierten DNA-Sequenzen. Der zyklisch verlaufende Prozess der PCR beruht auf drei aufeinander folgenden Reaktionsschritten. Im ersten Schritt, der Denaturierung, kommt es zum Aufschmelzen des DNA Doppelstranges. Darauf folgt in Schritt zwei die Anlagerung der Primer. Die zwei gegenläufigen Oligonukleotide binden spezifisch an die Enden der DNA Einzelstränge. Sie dienen so als Startmolekül der Amplifikation. Der dritte Schritt umfasst die Synthese des fehlenden, komplementären Einzelstranges durch eine hitzestabile DNA-Polymerase aus freien Nukleotiden. Diesen Schritt bezeichnet man als Polymerisation. Durch mehrfache Wiederholung der Reaktionsschritte kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung des spezifischen DNA-Abschnitts.

Zur Amplifikation der DNA Fragmente wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Primerpaare sowie die Polymerase OneTaq von NEB, Frankfurt verwendet. Die PCR wurde im Thermo Cycler von G-Storm durchgeführt.

Nachfolgende Tabelle 11 und Tabelle 12 führen die Zusammensetzung der verwendeten Mastermixe für die Standard PCR mit Taq- bzw. FastStart-Polymerase auf.

Tabelle 11: Zusammensetzung des Mastermix mit Taqpolymerase

Methoden

Bestandteil	Volumen [μl]
DNA-Template	2
OneTaq Standard Buffer (NEB)	4
dNTPs (2mM)	1,6
Primer forward (10 pmol/ μ l)	0,8
Primer reverse (10 pmol/ μ l)	0,8
OneTaq DNA Polymerase(NEB)	0,1
H ₂ O (Ampuwa)	ad 20

Tabelle 12: Zusammensetzung des Mastermix mit FastStartpolymerase

Bestandteil	Volumen [μl]
DNA-Template	2
OneTaq Standard Buffer (NEB)	4
dNTPs (2mM)	1,6
Primer forward (10 pmol/ μ l)	0,8
Primer reverse (10 pmol/ μ l)	0,8
OneTaq DNA Polymerase (NEB)	0,1
H ₂ O (Ampuwa)	ad 20

Um die Spezifität der PCR zu erhöhen, wurde ein Touch-Down Temperaturprofil angewendet. Nachfolgende Tabelle 13 und Tabelle 14 zeigen das standardmäßig verwendete Temperaturprofil der Touch-Down PCR.

Tabelle 13: Temperaturprofil der Touch-Down-PCR mit Taq Polymerase

PCR-Schritt	Zeit [s]	Temperatur [$^{\circ}$C]	Wiederholungen
Verlängerte Denaturierung	240	94	
Denaturierung	15	94	} 10
Primer Anlagerung	30	65 (-1 $^{\circ}$ C/Zyklus)	
Polymerisation	60	68	
Denaturierung	15	94	} 25
Primer Anlagerung	30	55	
Polymerisation	60	68	
Lagerung	∞	10	

Tabelle 14: Temperaturprofil der Touch-Down-PCR mit FastStart-Polymerase

PCR-Schritt	Zeit [s]	Temperatur [°C]	Wiederholungen
Verlängerte Denaturierung	240	94	
Denaturierung	15	94	} 10
Primer Anlagerung	30	65 (-1°C/Zyklus)	
Polymerisation	60	68	
Denaturierung	15	94	} 25
Primer Anlagerung	30	55	
Polymerisation	60	68	
Lagerung	∞	10	

4.5 Aufreinigung und Konzentrierung von DNA

4.5.1 Aufreinigung von PCR Produkten durch Ethanol-Fällung

Im Anschluss an die PCR wurden die Produkte, die im nächsten Schritt sequenziert werden sollten, mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits nach den Angaben im Herstellerprotokoll aufgereinigt. Primer, Nukleotide, die Polymrase sowie überschüssige Salze wurden dabei von der gefällten dsDNA getrennt und aus dem Reaktionsgefäß entfernt. Das Auswaschen der DNA erfolgte abweichend vom Protokoll mit 30µl Elution Buffer, welche zentral auf die Membran der Säule gegeben wurden. Auf diese Weise konnte eine höhere Endkonzentration der DNA erreicht werden.

4.5.2 Aufreinigung von PCR Produkten mit Magnetic Beats

Andere PCR Produkte wurden mit Hilfe des Agencourt AMPure PCR Purifikation Kits nach den Angaben im Herstellerprotokoll aufgereinigt. Um eine höhere Konzentration der DNA zu erreichen, erfolgte das Auswaschen der DNA auch in dieser Methode, entgegen der Anleitung im Herstellerprotokoll, mit 30 µl statt 40 µl 10mM Tris-Cl Puffer.

4.6 Agarose-Gelelektrophorese

Agarosegele sind aufgrund ihrer Eigenschaft als verhältnismäßig großporige Gele gut zur Auftrennung von DNA geeignet. Daher wurde diese Methode zur Verifizierung von PCR Ergebnissen sowie zur Genotypisierung nach Restriktionsverdau genutzt. Die Größe der Gele sowie die Menge der Agarose wurden je nach Anzahl der zu untersuchenden Proben, Probenvolumen und Länge der zu detektierenden Fragmente unterschiedlich gewählt. Die Agarose wurde abgewogen, in 1-fach TBE suspendiert und anschließend aufgeköcht, bis sie vollständig gelöst war. Der Volumenverlust wurde durch steriles H₂O ausgeglichen und je nach Gelgröße wurden 2-4µl Ethidiumbromid zugegeben. Anschließend wurde die Gellösung in einen Gelträger gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde dieses in eine mit 1-fach TBE Puffer befüllte Elektrophoresekammer gelegt und dort mit den Proben und dem DNA-Größenstandard beladen. Um ein Aufsteigen der Proben aus den Geltaschen zu vermeiden, wurden diese zuvor mit Agaroseblau-Ladepuffer versetzt. Die Fragmente wurden bei 90 – 120V aufgetrennt. Die erfolgte Auftrennung wurde mit Hilfe des Geldokumentationssystems Biostep ArgusX1, Jahnsdorf unter UV-Licht festgehalten und anschließend ausgewertet.

4.7 Sequenzierung

Die Basenabfolge der untersuchten Genabschnitte wurde durch die Sanger-Kettenabbruchmethode bestimmt. Ein Strang des betreffenden DNA-Abschnitts wird dabei mit Hilfe des entsprechenden Primers (Vorwärts oder Rückwärts), einer DNA-Polymerase, dNTPs und einer geringen Menge Didesoxyribonukleotiden (ddNTPs) amplifiziert. Durch das Fehlen der 3'-Hydroxygruppe an der Ribose der ddNTPs kann die DNA-Polymerase keine Phosphodiesterbindung zur Anknüpfung eines weiteren Nukleotids ausbilden. Es kommt zum Kettenabbruch. Der zufällige, aber sequenzspezifische Einbau der ddNTPs führt zu DNA Fragmenten unterschiedlicher Länge, die an ihrem 3'-Ende ein fluoreszenzmarkiertes ddNTP tragen. Das Sequenziergerät trennt diese Fragmente in einer mit Gel befüllten Kapillare der Größe nach auf. Sie passieren anschließend einen Laser, durch den die Farbstoffe mit Licht unterschiedlicher Wellenlänge angeregt werden. Die Fluoreszenzsignale werden detektiert und je einem der vier ddNTPs zugeordnet. Da die PCR Fragmente den Laser

Methoden

der Größe nach passieren, entspricht die Abfolge der detektierten Signale der Sequenz des eingesetzten DNA-Strangs.

Die Sequenzierung wurde mit Hilfe des GenomeLab Quick Start Kits von Beckman Coulter durchgeführt. Vor der Sequenzierung erfolgte eine Aufreinigung des PCR Produkts mittels QIAquick PCR Purification Kit (s. Kapitel 4.5.1). Für die Sequenzierung wurden entsprechend dem Protokoll von Beckmann Coulter 50 – 100 fmol dsDNA eingesetzt.

Die nachfolgende Tabelle 15 zeigt den Reaktionsansatz für die Sequenzierreaktion. Das verwendete Temperaturschema wird in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 15: Zusammensetzung der Sequenzierungsreaktion

Bestandteil	Volumen [μ l]
H ₂ O (Ampuwa)	Ad 10
DNA-Template (50-100fmol)	0,5 – 1,5
Sequenzierungsprimer	1
DTCS Quick Start Master Mix	4
Totales Volumen	10

Tabelle 16: Temperaturprofil der Sequenzierungs-PCR

PCR-Schritt	Zeit [s]	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Wiederholungen
Denaturierung	20	96	} 30
Primer Anlagerung	20	50	
Polymerisation	240	60	
Lagerung	∞	10	

Im Anschluss wurden die Reaktionsgefäße bis zur Aufreinigung der enthaltenen PCR Produkte lichtgeschützt bei 4 $^{\circ}$ C gelagert. Zur Beendigung der Sequenzierreaktion wurden 2,5 μ l Stopplösung in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und das gesamte PCR Produkt in dieses überführt.

Nachfolgende Tabelle 17 zeigt die Zusammensetzung der vor jeder Reaktion frisch hergestellten Stopplösung.

Tabelle 17: Zusammensetzung der Stopplösung zur Beendigung der Sequenzierreaktion

Bestandteil	Volumen [μl]
Glycogen	0,5
3M Natriumacetat (pH = 5,2)	1
100mM NaEDTA (pH = 8,0)	1

Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 30 μ l 95% Ethanol (-20°C), kurzem Mischen und sofortiger Zentrifugation (30min, 13,200 rpm bei 4°C). Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen. Das DNA-Pellet wurde im Anschluss mit 200 μ l 70% Ethanol (-20°C) gewaschen und zentrifugiert (15min, 13,200 rpm bei 4°C). Der Überstand wurde erneut verworfen und der Waschschrift wiederholt. Daraufhin wurde das gesamte Ethanol abpipettiert und das Reaktionsgefäß mit enthaltenem DNA-Pellet für 10 Minuten bei 30°C zum Trocknen in eine Vakuumzentrifuge gestellt. Dann wurden 40 μ l SLS zugegeben, die Probe gut gemischt und bei -4°C für mindestens 60 Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend konnte die Probe auf eine 96 Well Sequenzierplatte überführt und mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet werden. Die Analyse erfolgte in dem CEQ 8000 Genetic Analysis System von Beckman Coulter.

4.8 Restriktion von DNA

In einem Fall erfolgte die Genotypisierung im Anschluss an die PCR mittels Restriktionsverdau. Hierzu wurde die Restriktionsendonuklease *Bco*DI verwendet. Ein Restriktionsansatz setzte sich aus der jeweiligen DNA, dem Puffer CutSmart (NEB), *Bco*DI und sterilem H₂O zusammen. Anhand der zu verdauenden DNA Menge und der von New England BioLabs festgelegten Unit (U) wurde die einzusetzende Menge an Enzym berechnet. Die Restriktion erfolgte für zwei Stunden bei 37°C. Zur anschließenden Analyse wurden die Proben auf ein 2% Agarosegel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt.

Nachfolgende Tabelle 18 zeigt den Ansatz des Restriktionsverdaus, der für *Bco*DI verwendet wurde.

Tabelle 18: Restriktionsverdau mittels *Bco*DI

Bestandteil	Volumen [μl]
PCR Produkt	20
<i>Bco</i> DI	0,2
NEB CutSmart Puffer	2

4.9 High Resolution Melting

Das High Resolution Melting wurde in dem LightCycler 480 II von Roche Diagnostics GmbH durchgeführt. Es handelt sich dabei um eine Methode zur Detektion von Sequenzunterschieden anhand des Schmelzverhaltens doppelsträngiger DNA (s. Kapitel 1.2.2). Im Rahmen dieser Arbeit wurde sie daher zur Genotypisierung ausgewählter Einzelbasenpolymorphismen (Single nukleotide polymorphisms = SNPs) in Nukleozytoplasmatischen Transportproteinen und in Proteinen, von denen aus Vorstudien ein Einfluss auf die Pathogenese der SCA3 bekannt ist, verwendet. Jeder Mensch ist heterozygot für ungefähr drei Millionen Basen (Bruzzone and Steer 2015). Mit einer Frequenz von 1 in 1000 bp werden SNPs häufig zur Untersuchung komplexer vererbter Erkrankungen verwendet.

Das Schmelzverhalten von dsDNA wird durch mehrere Faktoren beeinflusst. Dazu gehören die Länge, der GC Gehalt und die Sequenz des dsDNA Fragments (Kapitel 1.2.2). Eine Veränderung der DNA Sequenz bewirkt daher eine direkte Veränderung der Schmelztemperatur T_m . Liegt eine Homozygote Sequenzvariante, im Sinne eines Basenaustauschs von G/C zu A/T oder umgekehrt vor, ist die resultierende Schmelztemperaturveränderung mittels HRM detektierbar. Liegt jedoch eine Punktmutation, im Sinne eines komplementären Basenaustauschs vor, ist die Veränderung der Schmelztemperatur zu gering, um sie mittels klassischem HRM erfassen zu können. In diesen Fällen werden zusätzliche unmarkierte Hybridisierungs sonden verwendet (Kapitel 1.2.3).

Auch ein Basenaustausch in einem einzelnen Allel bewirkt eine Veränderung der Schmelzkurve. Diese wird durch die Bildung von Duplexen aus den Einzelsträngen der

Methoden

DNA Fragmente hervorgerufen (Kapitel 1.2.2). Das Abschmelzen der dsDNA wird durch die Verwendung eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes sichtbar gemacht. Dieser Farbstoff, welcher nur an dsDNA bindet, verliert seine fluoreszierende Eigenschaft mit der Freisetzung aus den Duplexes während dem Abschmelzen der DNA. Die DNA wird zunächst mit Hilfe einer PCR vervielfältigt. Anschließend wird das PCR Produkt erhitzt und die Fluoreszenzintensität während dieses Vorgangs kontinuierlich gemessen. Die gemessenen Fluoreszenzsignale können durch den LightCycler 480 in Schmelzkurven überschrieben werden, aus welchen sich die beschriebenen Sequenzunterschiede ablesen lassen.

4.9.1 HRM Bedingungen

Voraussetzung für das HRM ist eine hohe Konzentration der zu untersuchenden DNA. Daher wurde vor der Analyse im LightCycler eine PCR durchgeführt. Zu dem PCR Ansatz wurde bereits der LightCycler HRM Master Mix gegeben. Dadurch wird erreicht, dass das Reaktionsgefäß vor Überführung in den LightCycler nicht mehr geöffnet werden muss. Im Gegensatz zu anderen gängigen Genotypisierungsmethoden besteht beim HRM daher kein Kontaminationsrisiko (s.Kapitel 1.2.1).

Die Zusammensetzung des Mastermix für die HRM PCR ist in Tabelle 19 aufgeführt. Der im verwendeten LightCycler 480 HRM Master-Kit von Roche enthaltene Master Mix setzt sich aus dem HRM Fluoreszenzfarbstoff, einer FastStart Taq-Polymerase und dNTPs in einem Reaktionspuffer zusammen. Eine 25mM MgCl₂ Lösung wird separat geliefert, wodurch die jeweilige Menge an MgCl₂ variiert werden kann (Kapitel 5.2.3).

Der enthaltene Fluoreszenzfarbstoff ist gegenüber äußeren Einflüssen wenig stabil, weswegen er stets vor Licht geschützt und häufiges Auftauen und Einfrieren vermieden wurde. Angebrochene Mastermixe wurden innerhalb von zwei Wochen aufgebraucht. Um die dsDNA mit Farbstoff zu sättigen, wurden hohe Konzentrationen eingesetzt, die den Ablauf der PCR aber nicht beeinträchtigen.

Zur Unterscheidung der Schmelzprofile der selteneren und häufigeren homozygoten Varianten wurden sogenannte unmarkierte Hybridisierungssonden designt (s. Kapitel 5.2.2). Neben dem Mastermix wurde dem PCR Ansatz je nach untersuchtem SNP die zuvor designte Sonde zugegeben. Um ein starkes Sondensignal zu generieren, sollte der

Methoden

zur Sonde komplementäre Strang im Überschuss synthetisiert werden. Daher wurde für den Mastermix mit Hybridisierungssonde ein asymmetrischer Ansatz gewählt, bei dem der entsprechende Primer in höherer Konzentration zugegeben wurde.

Je länger der untersuchte DNA Abschnitt ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit für zusätzliche Schmelzdomänen (s. Kapitel 1.2.2). Die Primer wurden daher so gewählt, dass die Länge des generierten DNA Fragments zwischen 100 – 250 bp lag.

Tabelle 19: Zusammensetzung des Mastermix für das HRM ohne Hybridisierungssonde

Bestandteil	Volumen [μ l]
DNA-Template	1
HRM MasterMix (2x con.)	10
Primer F (10 μ M)	2
Primer R (10 μ M)	2
MgCl ₂ (25mM)	2,4
H ₂ O (Ampuwa)	4,6

Tabelle 20: Zusammensetzung des Mastermix für das HRM mit Hybridisierungssonde

Bestandteil	Volumen [μ l]
DNA-Template	1
HRM MasterMix (2x con.)	10
Sonde (10pmol/ μ l)	1
Primer Mix mit Primer F (4 μ M) und Primer R (10 μ M)	2,5
MgCl ₂ (25mM)	2,4
H ₂ O (Ampuwa)	4,1

Die Spezifität der PCR wurde durch die Anwendung einer Touch-Down PCR erhöht. Nachfolgende Tabelle 21 zeigt das standardmäßig verwendete Touch-Down Temperaturprofil.

Tabelle 21: Temperaturprofil der Touch-Down PCR für das HRM

PCR-Schritt	Zeit [s]	Temperatur [°C]	Wiederholungen
-------------	----------	-----------------	----------------

Methoden

Verlängerte Denaturierung	600	95	
Vervielfältigung			
Denaturierung	10	95	} 10
Primer Anlagerung	15	68 (-1°C/Zyklus)	
Polymerisation	10	72	
Denaturierung	10	95	} 45
Primer Anlagerung	15	58	
Polymerisation	10	72	
HRM			
	60	95	
	60	40	
	1	50	
	kontinuierlich (0,02°C/s)	95	
Kühlung	10	40	

Um die Ausbildung von Homo- und Heteroduplexen zwischen den Einzelsträngen zu erreichen, wurde das PCR Produkt wie in Abbildung 10 zu erkennen, am Ende der 55 Amplifikationszyklen auf 40°C abgekühlt. Anschließend wurde durch langsames Erhöhen der Temperatur um 0,02°C pro Sekunde das Abschmelzen eingeleitet. Ab einer Temperatur von 50°C wurden 30 Einzelmessungen des Fluoreszenzsignals pro 1°C Temperaturanstieg durchgeführt.

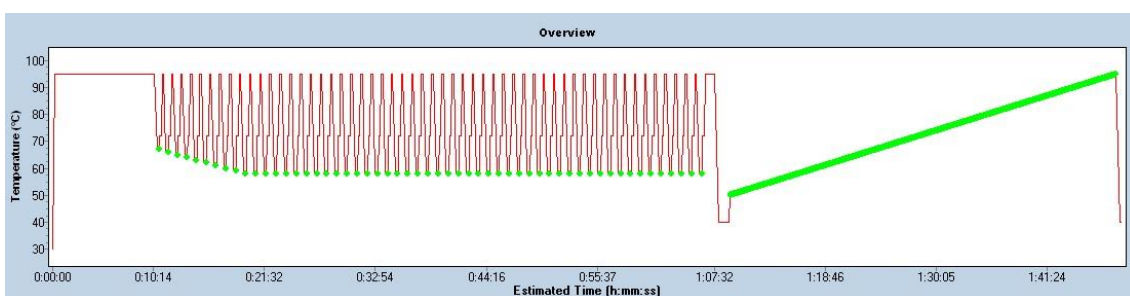


Abbildung 10: Laufzeitprotokoll des HRM Programms

Dargestellt ist der Temperaturverlauf in Grad Celsius über die Zeit in Minuten. Die grünen Punkte markieren die Zeitpunkte, an denen die Fluoreszenzintensität gemessen wurde. In der Endphase des Protokolls wird die Fluoreszenzintensität unter langsamer Temperaturzunahme kontinuierlich gemessen.

Methoden

Aus den erhobenen Messdaten zu diesen Zeitpunkten erstellt der LightCycler eine Schmelzkurve, welche die Basis aller folgenden Schmelzkurvenanalysen darstellt.

Die Analyse der Patientenproben erfolgte pro 384-Well Platte mit je einer Negativkontrolle bestehend aus Wasser, um etwaige Verunreinigungen der verwendeten DNA Proben und des LightCycler 480 HRM Master-Kits zu detektieren. Eine Positivkontrolle, bestehend aus einer bereits sequenzierten Patientenprobe, wurde mitanalysiert, falls bereits vorhanden.

4.9.2 Schmelzkurvenanalyse mit der LightCycler 480 Gene Scanning Software

Mit Hilfe der Gene Scanning Software können die HRM Schmelzkurvendaten analysiert werden. So konnten Unterschiede in der Form der Schmelzkurven identifiziert werden, welche auf die entsprechende Sequenzvariante zurrückschließen ließen.

Die vom LightCycler generierten Schmelzkurven wurden mit Hilfe der LightCycler 480 Software, Idaho Technology Inc., Salt Lake City, UT, USA ausgewertet.

Die vom LightCycler 480 generierten Rohdaten der Schmelzkurven wurden in vier Schritten bearbeitet. Durch Unterschiede in den PCR Bedingungen hervorgerufene Veränderungen der Schmelzkurvenform konnten so ausgeglichen werden. Dies ermöglichte eine präzisere Zuordnung der Schmelzkurven zu den jeweiligen Genotypen.

Die folgenden vier Arbeitsschritte wurden unter Zuhilfenahme der Gene Scanning Software ausgeführt:

- **Erfassen von Negativproben:** Der automatische Negativfilter der Software wurde verwendet, um negative Proben zu erfassen und von der weiteren Analyse auszuschließen. Zu diesen zählten bspw. Proben mit einem zu geringen Fluoreszenzsignal. Durch den Einsatz je einer Negativkontrolle auf jeder HRM Platte konnten Proben, die durch den automatischen Negativfilter nicht erfasst wurden, manuell ausgeschlossen werden.

- **Normalisierung:** Die Rohdaten der Schmelzkurven wurden normalisiert indem, wie in Abbildung 11 zu sehen, durch manuell auf der x-Achse verschiebbare Rahmen einheitliche Zeitpunkte für Fluoreszenzbeginn und Ende festgelegt wurden. Der Schnittpunkt der jeweiligen Schmelzkurve mit dem linken Rahmen wurde dabei auf einen relativen Wert von 100% festgelegt. Der Schnittpunkt der Schmelzkurve mit dem rechten Rahmen wurde auf einen relativen Wert von 0% festgelegt. So wurde die Interpretation der Daten und insbesondere die Vergleichbarkeit zwischen den beiden homozygoten SNP Varianten vereinfacht.

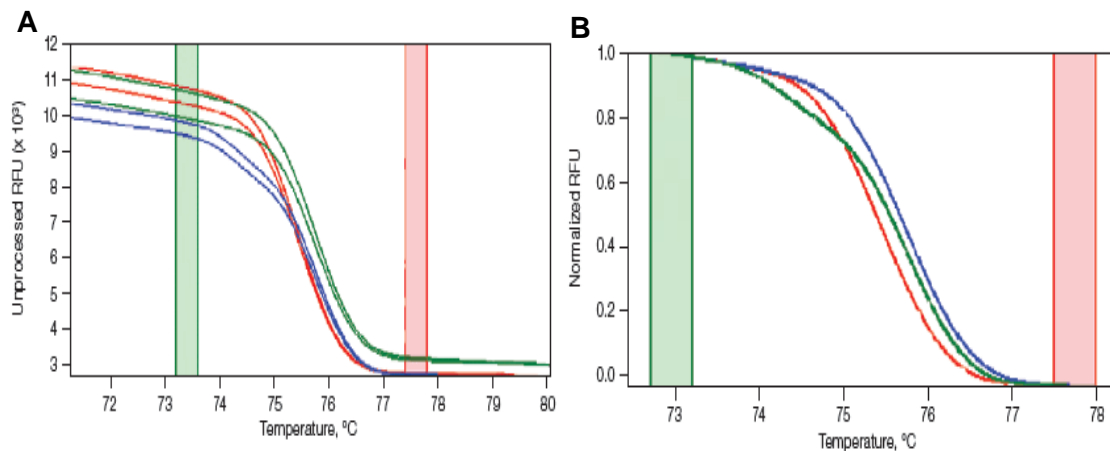


Abbildung 11: Normalisierung der Schmelzkurven

A: Festlegen der Zeitpunkte für Fluoreszenzbeginn (grüner Rahmen) und Fluoreszenzende (roter Rahmen) in den Rohdaten. **B:** Durch die Normalisierung auf diese festgelegten Zeitpunkte werden eindeutig voneinander abgrenzbare Schmelzkurven abgebildet. (Quelle:www.bio-rad.com)

- **Temperatur Verschiebung:** Im Anschluss an die Normalisierung sind die Schmelzkurven der Proben mit dem gleichen Genotyp häufig auf der x-Achse versetzt. Ungleichmäßige Temperaturerhöhung im Heizblock oder leichte Unterschiede in der $MgCl_2$ Konzentration können zu diesem Phänomen führen. Daher wurde ein Schwellenwert für die Fluoreszenzstärke festgelegt, auf den alle Schmelzkurven geeicht wurden (Abbildung 12). Dieser Schwellenwert betrug für alle Versuche 5% relative Fluoreszenzstärke.

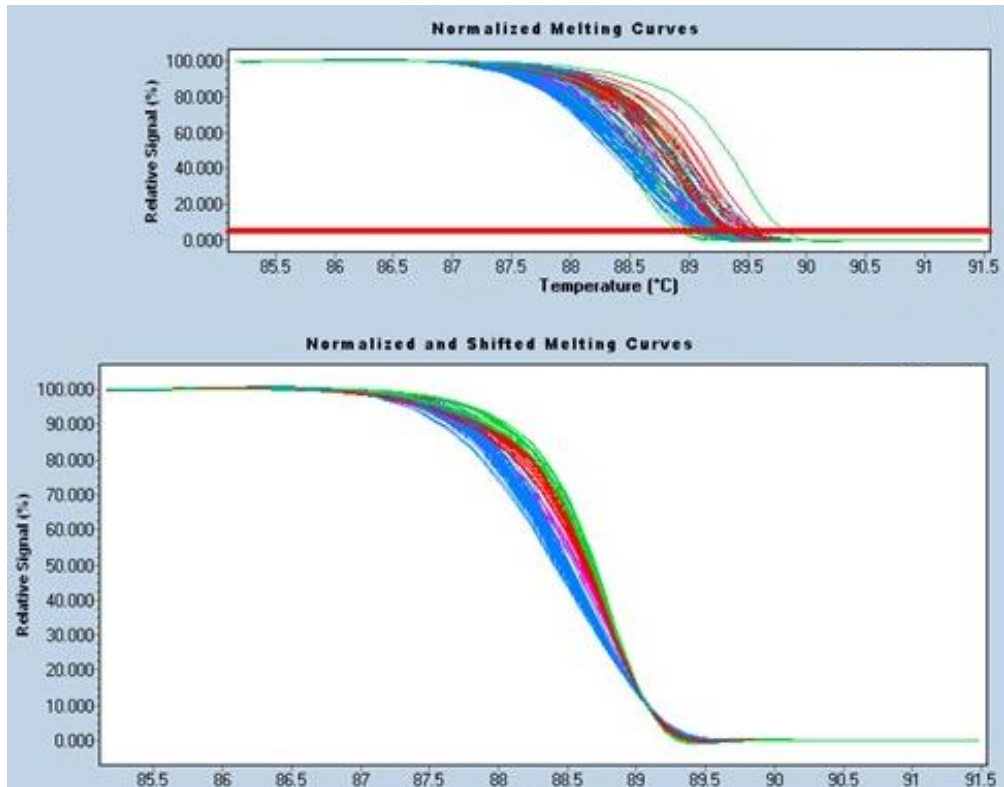


Abbildung 12: Temperatur Verschiebung im HRM

Alle Schmelzkurven werden auf einen Schwellenwert von 5% relativer Fluoreszenzintensität geeicht (s. rote Grenzlinie). Zu diesem Zeitpunkt liegt die gesamte dsDNA bereits vollständig denaturiert vor. Durch diesen Schritt werden Verschiebungen der Schmelzkurven auf der x-Achse ausgeglichen.

- **Grafische Darstellung der Schmelzkurvenunterschiede (Difference plot):** Hierbei handelt es sich um eine andere Darstellungsform der Daten. Die Schmelzkurven wurden in diesem Schritt an einer Referenzschmelzkurve, auch Basiskurve genannt, ausgerichtet. Auf diese Weise wurden die relativen Unterschiede zwischen den Schmelzkurven graphisch sichtbar und die Zuordnung der Proben zu einer Gruppe mit ähnlichem Schmelzverhalten wird, wie in Abbildung 13 zu sehen, eindeutiger. Die Basiskurve, an welcher alle anderen Schmelzkurven ausgerichtet wurden, wurde dabei manuell ausgewählt.

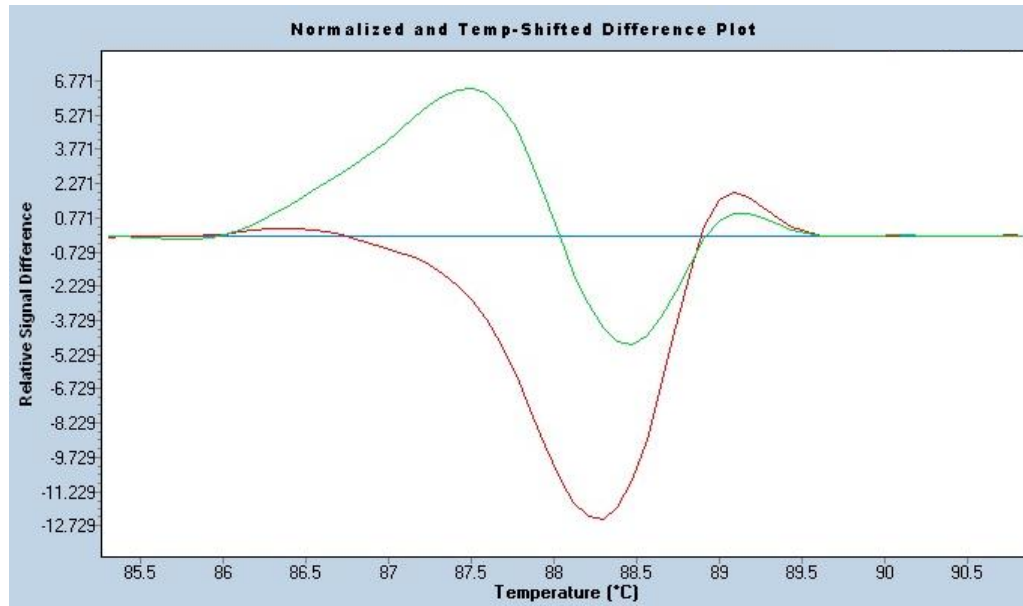


Abbildung 13: Grafische Darstellung der Schmelzkurvenunterschiede (Difference plot)

Dargestellt ist die relative Signaldifferenz über den Temperaturverlauf in °C. Die grafische Darstellung der HRM Ergebnisse im difference plot ist sensitiver für die Schmelzkurvenunterschiede zwischen der häufigeren Allelsequenz und seiner Varianten.

4.9.3 T_m-Calling

Für die Schmelzkurvenanalyse der Proben, die mit unmarkierten Hybridisierungs sonden typisiert wurden, wurde eine andere Form der Auswertung gewählt.

Da die Sonden so designt wurden, dass ihre Länge ≤ 30 bp betrug, interkaliert entsprechend weniger Floureszenzfarbstoff zwischen der Sonde und dem DNA Strang. Das Abschmelzen der Hybridisierungs sonden von den Amplifikaten ruft daher nur einen geringen Abfall der Floureszenzintensität hervor. Diese geringen Unterschiede im Floureszenzsignal lassen sich mit dem Gene Scanning Programm nicht erfassen.

Im T_m-Calling wird die erste negative Ableitung der Schmelzkurven gebildet. Auf der y-Achse ist in diesem Modus die relative Signaldifferenz aufgetragen. Dadurch lassen sich die Signalspitzen, erzeugt durch das Abschmelzen der Sonde von dem DNA Strang, einfach ablesen.

Methoden

Bindet die Sonde an den DNA Strang mit nicht komplementärer Base an der Stelle des SNP, schmilzt diese früh ab und erzeugt die Signalspitze im Vergleich zu dem DNA Strang mit komplementärer Base bei einer niedrigeren Temperatur. Ist die untersuchte Probe heterozygot, entstehen zwei Signalspitzen. Die Erste beim Abschmelzen der Sonde von der häufigen Allelvariante und die Zweite beim Abschmelzen von der selteneren Allelvariante (s. Abbildung 14)

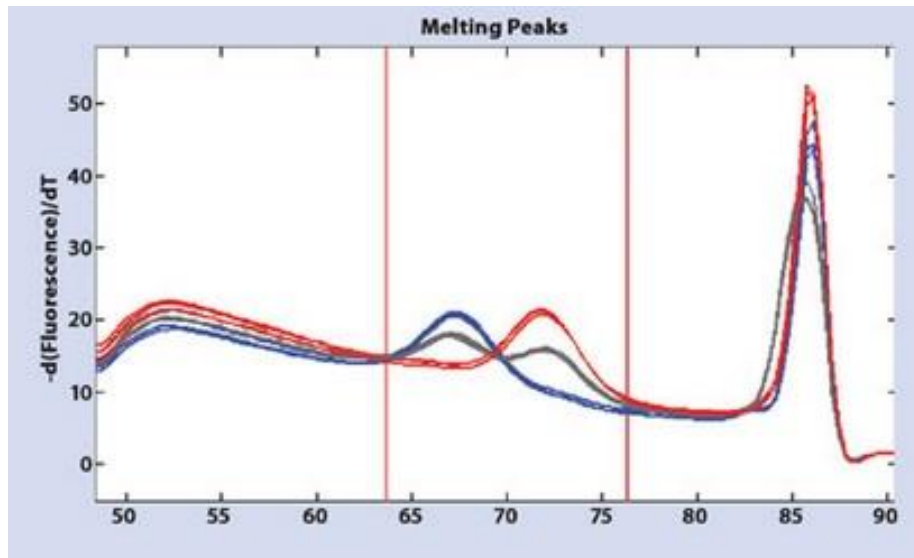


Abbildung 14: T_m-Calling

HRM Ansatz mit unmarkierter Hybridisierungssonde. In der ersten negativen Ableitung der Schmelzkurven werden die durch das Abschmelzen der Sonden hervorgerufenen Peaks deutlich sichtbar. Der erste Peak (blau) wird dabei durch das Abschmelzen der Sonde von dem DNA Strang mit nicht komplementärer Base an der Stelle des SNP markiert. Erst bei höherer Temperatur löst sich die Sonde von dem DNA Strang mit komplementärer Base (rot). Heterozygote Proben (grau) generieren entsprechend einen doppelten Peak. Quelle: (deSilva and Blackett 2007)

4.10 Statistische Auswertung

Die Berechnungen zum Einfluss der untersuchten Polymorphismen auf das Erkrankungsalter wurden mit dem Statistikprogramm JMP V. 12.0 durchgeführt. Hierzu wurde eine Kovarianzanalyse mit dem kontinuierlichen Einflussfaktor CAG-Repeat Länge und der Gruppeneinteilung des Polymorphismus als nominalen Einflussfaktor sowie einer Wechselwirkung aus Beiden durchgeführt. Die Analyse erfolgte unter Berücksichtigung der Familienzugehörigkeit als Gewichtungsfaktor.

5. Ergebnisse

Das Erkrankungsalter der SCA3 ist von vielfältigen Faktoren abhängig, welche immer stärker in den Fokus aktueller Studien rücken (s. Kapitel 1.1.6). Die Anzahl der CAG-Wiederholungen im *ATXN3* Gen hat dabei den größten bisher bekannten Einfluss. Der expandierte Polyglutaminbereich beeinflusst den Phänotyp im transgenen Mausmodell jedoch nur, wenn sich das Ataxin-3 Protein im Zellkern befindet. Im Gegensatz dazu bleibt zytoplasmatisches Ataxin-3 selbst bei stark expandiertem Polyglutaminbereich ohne Einfluss auf den Phänotyp. Wir wissen, dass die Lokalisation von Ataxin-3 dabei hauptsächlich von Transportproteinen kontrolliert wird. Veränderungen in der Funktion oder Konfiguration von Importinen und Exportinen könnten daher Einfluss auf die Pathogenese der Erkrankung haben.

Der nukleozytoplasmatische Transport von Ataxin-3 wird durch die proteolytische Spaltung durch Caspasen und Calpaine möglich. Erst anschließend können die für die Erkrankung charakteristischen Kerneinschlusskörperchen ausgebildet werden. Dementsprechend spielen neben den Transportproteinen diese proteolytischen Enzyme eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der SCA3 (s. Kapitel 1.1.4).

Aus diesem Grund wurden Polymorphismen in nukleozytoplasmatischen Transportproteinen und Enzymen, die an der proteolyse von Ataxin-3 beteiligt sind, sowie deren Einfluss auf das Erkrankungsalter an einem 492 Proben umfassenden SCA3 Kollektiv untersucht.

5.1 Identifizierung von Kandidatengenomen mit SNPs in Transportproteinen und proteolytischen Enzymen

5.1.1 Festlegung der Kriterien zur Identifizierung der SNPs in den Kandidatengenomen

Das Kollektiv der SCA3-Patienten sollte auf SNPs untersucht und typisiert werden, die in Genen liegen, welche für Proteine des nukleozytoplasmatischen Transports oder proteolytische Enzyme codieren. Die Auswahl der SNPs erfolgte anhand bestimmter

Ergebnisse

Kriterien, die so festgelegt wurden, dass eine relevante Auswirkung auf das Patientienkollektiv vermutet werden konnte. Alle SNPs in intronischen Sequenzen wurden von der Analyse ausgeschlossen. Es musste sich um einen SNP im kodierenden Bereich des Gens handeln, einen sogenannten coding SNP = cSNP. Um eine funktionelle Auswirkung auf die Proteinaktivität vermuten zu können, wurden nur SNPs ausgewählt, die zu einem Aminosäureaustausch führen. Entsprechend kamen ausschließlich Punktmutationen, die eine Missense-Mutation zur Folge haben, in Betracht. Dabei wurde nicht bewertet, ob es sich bei der Punktmutation um eine Transition oder Transversion handelt. Der Mindestwert für die Häufigkeit des selteneren Allels (engl.: minor allele frequency, MAF) des SNP wurde auf ≥ 0.10 festgelegt. Nur SNPs die eine $MAF \geq 0.10$ in Mitteleuropäern zeigten, wurden in die Arbeit aufgenommen. Bei einer Probenzahl von 492 konnte so mit einer signifikanten Anzahl von Patienten gerechnet werden, die homozygot für den SNP sind.

Darüber hinaus wurden nur solche SNPs ausgewählt, zu denen valide Daten zu der angegebenen MAF im Rahmen vorhergehender Studien, wie beispielsweise im HapMap Projekt, erhoben wurden.

5.1.2 Selektion von Kandidatengen und deren SNPs anhand der festgelegten Kriterien

Die in Kapitel 5.1.1 genannten Kriterien wurden zunächst zur Untersuchung von Genen, die für nukleozytoplasmatische Transportproteine codieren, angewandt. Hierzu erfolgte die Analyse mit Hilfe der Datenbanken NCBI, 1000 Genomes und NHLBI Exome Sequencing project. Eine Übersicht aller untersuchten Gene zeigt Tabelle 22.

Tabelle 22: Alle untersuchten Gene mit zugehörigen Proteinen und deren Synonyme

Namen aller untersuchten Gene und Proteine nach Uniprot Standard (fett gedruckt) und deren Synonyme (normal gedruckt). (Quelle: www.uniprot.org)

Protein Namen	Gen Namen
Caspase-1	<i>CASP1 IL1BC, IL1BCE</i>
Caspase-2	<i>CASP2 ICH1, NEDD2</i>
Caspase-3	<i>CASP3 CPP32</i>
Calpain-1 catalytic subunit	<i>CAPN1 CANPL1, PIG30</i>

Protein Namen	Gen Namen
Calpain-2 catalytic subunit	<i>CAPN2 CANPL2</i>
Calpastatin	<i>CAST</i>
Exportin-1	<i>XPO1 CRM1</i>
Exportin-2	<i>CSE1L CAS, XPO2</i>
Exportin-4	<i>XPO4 KIAA1721</i>
Exportin-5	<i>XPO5 KIAA1291, RANBP21</i>
Exportin-6	<i>XPO6 KIAA0370, RANBP20</i>
Exportin-7	<i>XPO7 KIAA0745, RANBP16</i>
Importin-4	<i>IPO4 IMP4B, RANBP4</i>
Importin-5	<i>IPO5 KPNB3, RANBP5</i>
Importin-7	<i>IPO7 RANBP7</i>
Importin-8	<i>IPO8 RANBP8</i>
Importin-9	<i>IPO9 IMP9, KIAA1192, RANBP9</i>
Importin-11	<i>IPO11 RANBP11</i>
Importin-13	<i>IPO13 KIAA0724, RANBP13</i>
Importin subunit alpha-5, Karyopherin alpha-1	<i>KPNA1 RCH2</i>
Importin subunit alpha-1, Karyopherin alpha-2	<i>KPNA2 RCH1, SRP1</i>
Importin subunit alpha-4, Karyopherin alpha-3	<i>KPNA3 QIP2</i>
Importin subunit alpha-3, Karyopherin alpha-4	<i>KPNA4 QIP1</i>
Importin subunit alpha-6, Karyopherin alpha-5	<i>KPNA5</i>
Importin subunit alpha-7, Karyopherin alpha-6	<i>KPNA6 IPOA7</i>
Importin subunit alpha-8, Karyopherin alpha-7	<i>KPNA7</i>
Transportin-1	<i>TNPO1 KPNB2, MIP1, TRN</i>
Transportin-2	<i>TNPO2</i>
Transportin-3	<i>TNPO3 IPO12</i>

Zusätzlich wurden Gene untersucht, die für Proteine codieren, von denen in Vorstudien ein Einfluss auf die Pathogenese der SCA3 gezeigt werden konnte (s.Kapitel 1.1.3). Dazu zählten Proteine, die an der Spaltung von Ataxin-3 beteiligt sind, wie die Caspasen 1 und 3 (Berke et al. 2004) sowie die Calciumabhängigen Proteasen Calpain 1 und das ZNS spezifische Calpain 2. Es konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung von Calpastatin zu einer erhöhten Calpain 2 Aktivität und damit zu einer größeren Anzahl

Ergebnisse

an Ataxin-3 Aggregaten führt (Hubener et al. 2013). Daher wurde auch das *CAST* Gen mit in die Untersuchung eingeschlossen. Neben den kodierenden Bereichen der genannten Gene wurden deren Promotor-Regionen untersucht, da SNPs in diesem Bereich funktionelle Auswirkungen vermuten lassen.

Dabei konnten in den in Tabelle 23 aufgeführten Genen vielversprechende Polymorphismen identifiziert werden.

Tabelle 23: Identifizierte Kandidatengene mit ihren Polymorphismen

Gene, die für Transportproteine und proteolytische Enzyme kodieren, in denen nach Anwendung der Kriterien zur Selektion SNPs identifiziert wurden.

Gen	Anzahl an exonischen SNPs	davon SNPs	Missense	davon SNPs mit MAF \geq 10%
<i>CAPN 2</i>	112	67		1
<i>CAST</i>	110	79		1
<i>IPO 4</i>	173	109		2
<i>KPNA 2</i>	79	50		1
<i>XPO 6</i>	134	76		1

5.1.3 Kurze Charakterisierung der selektierten Kandidatengene und deren SNPs

Durch die Anwendung der Kriterien zur Selektion der Polymorphismen in den ausgewählten Genen, wurden sechs Polymorphismen gefunden, die zur Typisierung ausgewählt wurden (Tabelle 23). Zwei der SNPs befinden sich in dem Gen *IPO4* auf Chromosom 14, welches für das am Kerntransport beteiligte Protein Importin 4 codiert. Der Polymorphismus rs7146310 in Exon 16 tritt dabei mit einer mittleren Allelfrequenz von 0.297 auf und führt zu einem Aminosäureaustausch (AA) von Alanin zu Valin. Der Polymorphismus rs11550452 in Exon 17 tritt mit einer mittleren Allelfrequenz von 0.302 etwas häufiger auf und hat einen Aminosäureaustausch von Prolin zu Alanin zur Folge. In dem Gen, das für das nukleozytoplasmatische Transportprotein Exportin 6 codiert, welches insbesondere am Kernexport von Profilin-Aktin Komplexen beteiligt ist (Stuven, Hartmann, and Gorlich 2003), liegt der SNP rs205384. Dieser ist mit einer MAF von 0.184 der seltenste der selektierten Polymorphismen. Er bewirkt einem Aminosäureaustausch von dem basischen Histidin zu Glutamin.

Tabelle 24: Übersicht der identifizierten Proteine mit zugehörigen SNPs

Die Tabelle zeigt die identifizierten SNPs, die zur Typisierung ausgewählt wurden. Es sind die SNP ID, die MAF sowie der Nukleotid- (NA) und Aminosäureaustausch (AA) dargestellt.

Protein	SNP ID	MAF	NA	AA
Calpain 2	rs17599	C=0.213	A → C	Lys → Gln
Calpastatin	rs754615	C=0.299	G → C	Cys → Ser
Exportin 6	rs205384	A=0.184	G → A	His → Gln
Importin 4	rs7146310	A=0.297	G → A	Ala → Val
Importin 4	rs11550452	C=0.302	G → C	Pro → Ala
Karyopherin alpha 2	rs1059558	A=0.465	G → A	Gly → Ser

Das *CAST* Gen, welches für die Protease Calpastatin - ein Inhibitor von endogenem Calpain - codiert, trägt den SNP rs754615. Mit einer MAF von 0.299 führt diese Missense-Mutation zu einem Austausch von Cytsein zu Serin. Es konnte gezeigt werden, dass ein knock out von Calpastatin im transgenen Mausmodell zu einer zunehmenden Neurodegeneration im Kleinhirn und zu einem stärker ausgeprägten Phänotyp der SCA3 führen (Hubener et al. 2013). Hierbei handelt es sich demnach um eine Veränderung in einem nachweislich an der Pathogenese der SCA3 beteiligten Protein. Ebenso verhält es sich mit dem SNP rs17599 im *CAPN2* Gen, welcher zu einem Aminosäureaustausch von dem basischen Lysin zu Glutamin führt. Das ZNS spezifische Calpain 2 ist an der Proteolyse von Ataxin-3 beteiligt. Polyglutaminreiches Ataxin-3 ist für die Proteolyse durch Calpain 2 sensibler als Ataxin-3 ohne expandierten Polyglutaminbereich (Hubener et al. 2013). Der SNP rs1059558 im *KPNA2* Gen, tritt mit einer MAF von 0.465 am häufigsten auf und hat einen Austausch von Glycin zu Serin zur Folge. Die Importin subunit alpha-1 kann sowohl als Exportin als auch als Importin fungieren. Das an der Karzinogenese verschiedener Tumoren beteiligte Importin subunit alpha-1, konnte kürzlich als möglicher Biomarker für Kolonkarzinome identifiziert werden (Zhang et al. 2015). Seine Funktion als Transportprotein lässt auch eine Beteiligung an der intrazellulären Lokalisation von Ataxin-3 vermuten.

5.2 Etablierung der HRM Bedingungen für die Genotypisierung der DNA Proben

Sechs SNPs in den Kandidatengen *IPO4*, *XPO6*, *KPNA2*, *CAPN2* und *CAST* konnten identifiziert werden. Um zu untersuchen, ob die Polymorphismen Einfluss auf das Erkrankungsalter der SCA3 nehmen, war zunächst eine Genotypisierung der Patientenproben erforderlich. Zur Detektion der Sequenzunterschiede wurde in dieser Arbeit das High Resolution Melting (HRM) verwendet. Die Genotypen sollten dabei anhand ihres Schmelzverhaltens unterschieden werden. Die Bedingungen für das HRM wurden im Folgenden etabliert.

5.2.1 Etablierung der designten Primer

Für jeden der sechs selektierten SNPs wurde mithilfe des Serviceprogramms Primer3 Version 0.4.0 mindestens ein Primerpaar designt. Alle designten Primer sind mit ihrer Sequenz in Material und Methodenteil aufgeführt. Zur Etablierung der Primerpaare wurde das im Methodenteil beschriebene Touchdown Temperaturprofil angewendet. Die Zusammensetzung des verwendeten Mastermixes ist dort ebenso aufgeführt. Um den Bestand an Patienten DNA zu schonen, wurden für die Etablierung DNA Proben aus der CEPH Studie verwendet. Im Folgenden sollte ermittelt werden, welches der designten Primerpaare am effizientesten funktioniert. Hierzu wurde jede mögliche Kombination der designten Primer für den entsprechenden Genabschnitt in der Touchdown PCR getestet.

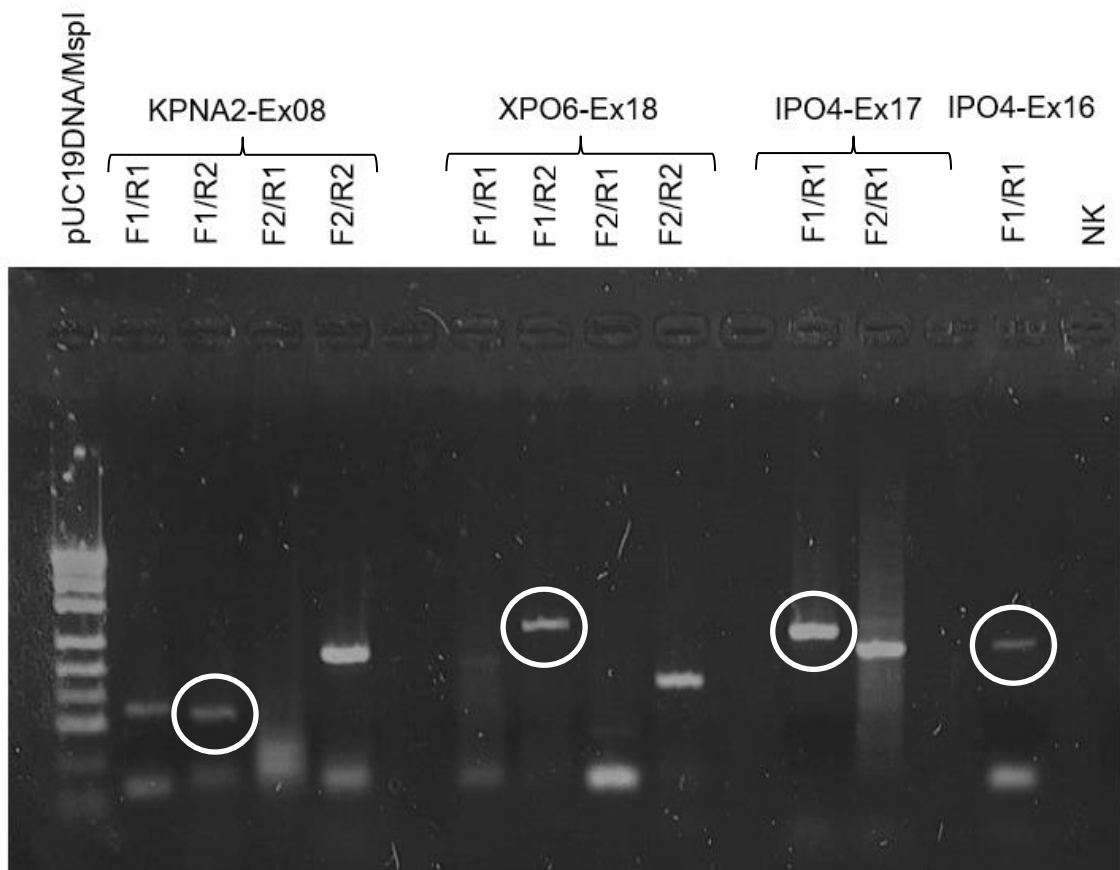


Abbildung 15: Ergebnis der PCR zur Etablierung der designten Primerpaare

Ergebnis der Agarose-Gelelektrophorese mit den PCR Produkten der Touchdown PCR zur Etablierung der Primerpaare für die Gene *KPNA2*, *XPO6*, *IPO4* Exon17 und Exon16. So konnte gezeigt werden, welches Primerpaar für das jeweilige Gen am geeignetsten ist. Dabei wurde auf eine hohe Bandenintensität auf erwarteter Höhe geachtet. Das Primerpaar mit dem besten Ergebnis in der PCR (umkringelt) wurde für die anschließende Typisierung ausgewählt (s.Tabelle 25). Marker: pUC19/MspI, Fermentas GmH, St. Leon-Rot.

Die Auswahl des Primerpaars für die anschließende Typisierung erfolgte, wie beispielhaft in Abbildung 15 dargestellt, anhand der Ergebnisse in der Agarose-Gelelektrophorese. Wichtig für die Auswahl waren eine deutliche Bande erwarteter Länge sowie der Ausschluss von Primer-Dimeren. Die etablierten, zur Typisierung verwendeten Primerpaare sind in Tabelle 25 aufgeführt.

Tabelle 25: Sequenzen aller zur Typisierung eingesetzten Primer

F= Vorwärts-, R=Rückwärts Primer. Die Primersequenzen sind in 5'→ 3' Richtung aufgeführt.

Bezeichnung	Sequenz [5' - 3']
CAPN2-Ex17-F2	TCTGTATGTGAAGGGCACAGA
CAPN2-Ex17-R3	CCCTGGAGCACATTAAAGGA
CAST-Ex23-F1	GCGGAGTGTCTTGTGGTCT
CAST-Ex23-R2	TCAGGGGGTGCTGACTGTAT
IPO4-Ex16-F1	ATCTGCACAGGCTGAAGGTC
IPO4-Ex16-R1	GAGCCATTGGTGAGGAGAGA
IPO4-Ex17-F1	ACCACCTTTGGTCCCGTAG
IPO4-Ex17-R1	GTCCAGTGGGAAGACAGGAG
KPNA2-Ex08-F1	GCTACCAACCCCAAACTA
KPNA2-Ex08-R2	AAGGAATGGGACTAATCCATGA
XPO6-Ex18-F1	TCTGCCACAAAGAACAATGC
XPO6-Ex18-R2	TCTCTTGTAGGCCAGGTGT

5.2.2 Festlegung der Kriterien zum Design der Sonden für das HRM

Aus den HRM Ergebnissen resultieren entsprechend der drei genetischen Varianten drei Gruppen mit unterschiedlichem Schmelzprofil. Zur Unterscheidung der Schmelzprofile der häufigen und seltenen homozygoten Varianten sollten sogenannte unmarkierte Hybridisierungssonden genutzt werden (Kapitel 1.2.3).

Für das Design dieser Sonden wurden genaue Kriterien festgelegt. Der T_m -Wert der Sonden sollte über dem des zugehörigen Primerpaars, durfte jedoch nicht über 85°C liegen. So konnte gewährleistet werden, dass das Abschmelzen der Sonden vom DNA Strang im T_m -Calling zeitlich deutlich vor dem Abschmelzen der Duplexes liegt. Die Länge der Sonden sollte zwischen 20 – 30 bp liegen. Sonden, deren Länge unter 20bp liegt, binden nicht spezifisch genug an die den SNP enthaltende DNA Sequenz. Um im HRM den Hintergrund so gering wie möglich zu halten, wurden nur Sonden ohne zu sich selbst komplementären Sequenzen ausgewählt. Das 3'-Ende der Sonden wurde phosphoryliert, um eine Verknüpfung weiterer Nukleinsäuremoleküle durch die im HRM Ansatz enthaltene Polymerase zu verhindern.

Um die festgelegten Parameter zu verifizieren, wurden die in Tabelle 10 aufgeführten Serviceprogramme Olgionukleotiddesign und Oligonukleotid Calculation verwendet. Die nach diesen Kriterien designten Sonden sind in Tabelle 2 aufgeführt.

5.2.3 Etablierung der Zusammensetzung des HRM Mastermix

Die Etablierung der Primerpaare für die Typisierung mittels HRM ist erfolgt. Für eine erfolgreiche Durchführung des HRM ist darüber hinaus die Zusammensetzung des HRM Mastermix entscheidend.

Der im LightCycler 480 High Resolution Melting Master-Kit von Roche enthaltene Master Mix enthält bereits den HRM Fluoreszenzfarbstoff, eine FastStart Taq-Polymerase und die dNTPs in einem Reaktionspuffer. Der Mastermix wurde, wie in Tabelle 19 und Tabelle 20 aufgeführt, in den 20µl Reaktionen in zweifacher Konzentration eingesetzt.

Eine separate 25mM MgCl₂ Lösung erlaubte, die eingesetzte Menge an MgCl₂ anzupassen. Die MgCl₂ Menge beeinflusst sowohl die Form der Schmelzkurve als auch den T_m-Wert. Um die optimalen Bedingungen für den HRM Ansatz zu etablieren, wurde die Menge an MgCl₂ zwischen 1.0mM und 3.5mM in 0.5mM Schritten titriert.

Ergebnisse

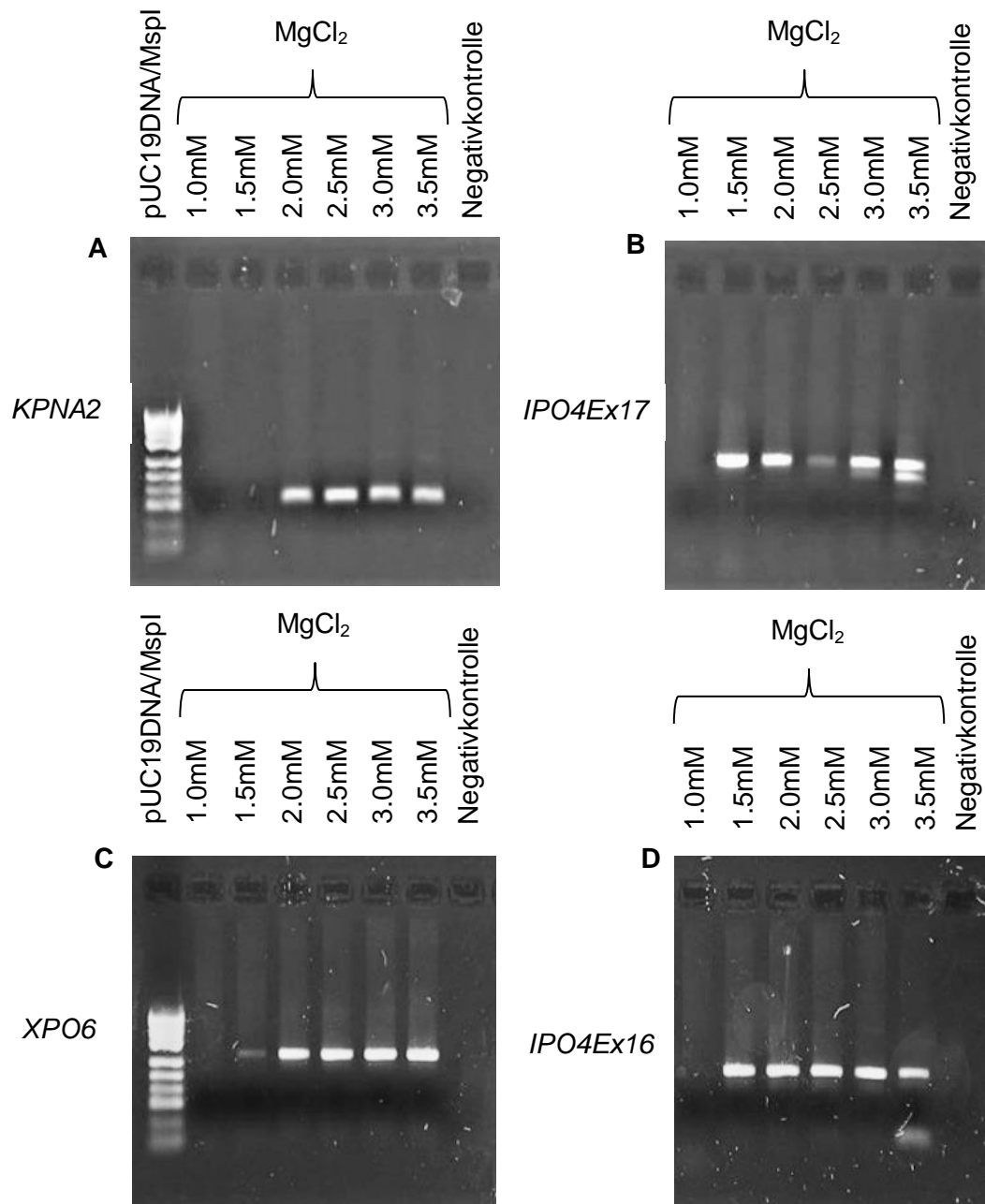


Abbildung 16: Etablierung der MgCl₂ Konzentration im HRM Mastermix

Die Agarosegele stellen die PCR Ergebnisse nach elektrophoretischer Trennung zur Etablierung der MgCl₂ Menge in der HRM PCR dar. **A:** zeigt die Ansätze mit 1.0mM – 3.5mM MgCl₂ für *KPNA2* und **B** für *IPO4 Ex17*. **C:** zeigt die Ansätze mit 1.0mM – 3.5mM MgCl₂ für *XPO6* und **D** für *IPO4 Ex16*. Für alle vier Gene konnte durch den Einsatz von 1.0mM MgCl₂ in der PCR kein Produkt amplifiziert werden. Der Ansatz mit 2.0mM MgCl₂ ergab in allen vier Ansätzen ein Produkt mit intensiver Bande erwarteter Höhe. Die Negativkontrolle zeigt keine Bande. Marker: pUC19/MspI, Fermentas GmH, St. Leon-Rot.

Ergebnisse

Die Auswahl der MgCl₂ Menge erfolgte, wie in Abbildung 16 dargestellt, anhand der Ergebnisse in der PCR, die in der anschließenden Agarose-Gelelektrophorese ausgewertet wurden. Es konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von 2.0mM MgCl₂ für alle getesteten Gene die besten Resultate erzielt. Aus diesem Grund wurde für alle folgenden HRM Versuche 2.0mM MgCl₂ eingesetzt.

Im LightCycler HRM Master Manual wird der Einsatz von 5-30ng DNA pro 20 µl Mastermix empfohlen. Um die besten Bedingungen für das HRM zu etablieren, wurde die DNA Menge in verschiedenen PCR Ansätzen von 10-30ng in 10ng Schritten titriert.

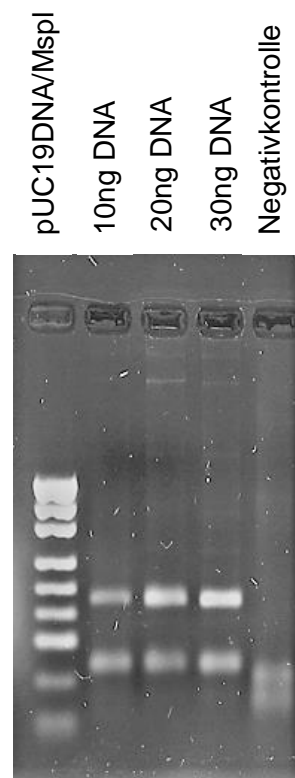


Abbildung 17: Etablierung der DNA Menge für den HRM Ansatz

Die Abbildung zeigt das Ergebnis der PCR zur Etablierung der DNA Menge im HRM Ansatz. Es wurden drei Ansätze mit 10ng, 20ng und 30ng CEPH-DNA getestet. In diesem Beispiel, in dem der Bereich um den SNP im *IPO4* Gen Ex16 amplifiziert wurde, ergab sich das beste Ergebnis für den Einsatz von 30ng DNA. Für alle folgenden HRM Ansätze mit dem Gen *IPO4* Ex16 wurden daher 30ng DNA eingesetzt. Die Negativkontrolle zeigte keine Bande. Marker: pUC19/MspI, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot.

Das PCR Ergebnis zeigte für alle getesteten DNA Mengen eine Bande erwarteter Höhe. Die intensivste Bande war für alle Gene, wie in Abbildung 17 beispielhaft für *IPO4* Ex16

dargestellt, in dem Ansatz mit 30ng DNA zu sehen. Somit wurde für alle folgenden HRM Versuche eine finale DNA Menge von 30ng pro Ansatz gewählt.

5.2.4 Optimierung des HRM Laufzeitprotokolls

Um ideale Bedingungen für die Genotypisierung zu schaffen, wurde das Laufzeitprotokoll für das High Resolution Melting optimiert. Als Grundlage dafür diente das auf dem LightCycler 480 hinterlegte Standard HRM Protokoll. In einem ersten Schritt wurde die Starttemperatur für die kontinuierliche Fluoreszenzmessung angepasst. In den ersten HRM Versuchen zeigte sich, dass die Starttemperatur gesenkt werden muss, um das Abschmelzen der Sonden vollständig zu erfassen. Daher wurde der Messbereich, wie in Abbildung 10 dargestellt, auf 50-90°C festgelegt. In einem zweiten Schritt wurde die Anzahl der Einzelmessungen des Fluoreszenzsignals pro Grad Celsius optimiert. In dem als Grundlage verwendeten Protokoll waren 25 Erfassungen der Fluoreszenzintensität pro 1°C Temperaturanstieg vorgesehen. Getestet wurden Ansätze mit 25-40 Messungen/1°C in Fünferschritten. In den Etablierungsversuchen zeigte sich, dass eine höhere Anzahl der Messungen/°C die Auflösung verbessert und damit die Differenzierung der Genotypen erleichtert. Eine höhere Anzahl der Messungen/°C führt aber auch zu einer Zunahme des Störhintergrunds. Dieser Zusammenhang wird in Abbildung 22 deutlich. Aus diesem Grund wurden 30 Messungen pro 1°C Temperaturanstieg als Standard für alle folgenden Versuche festgelegt.

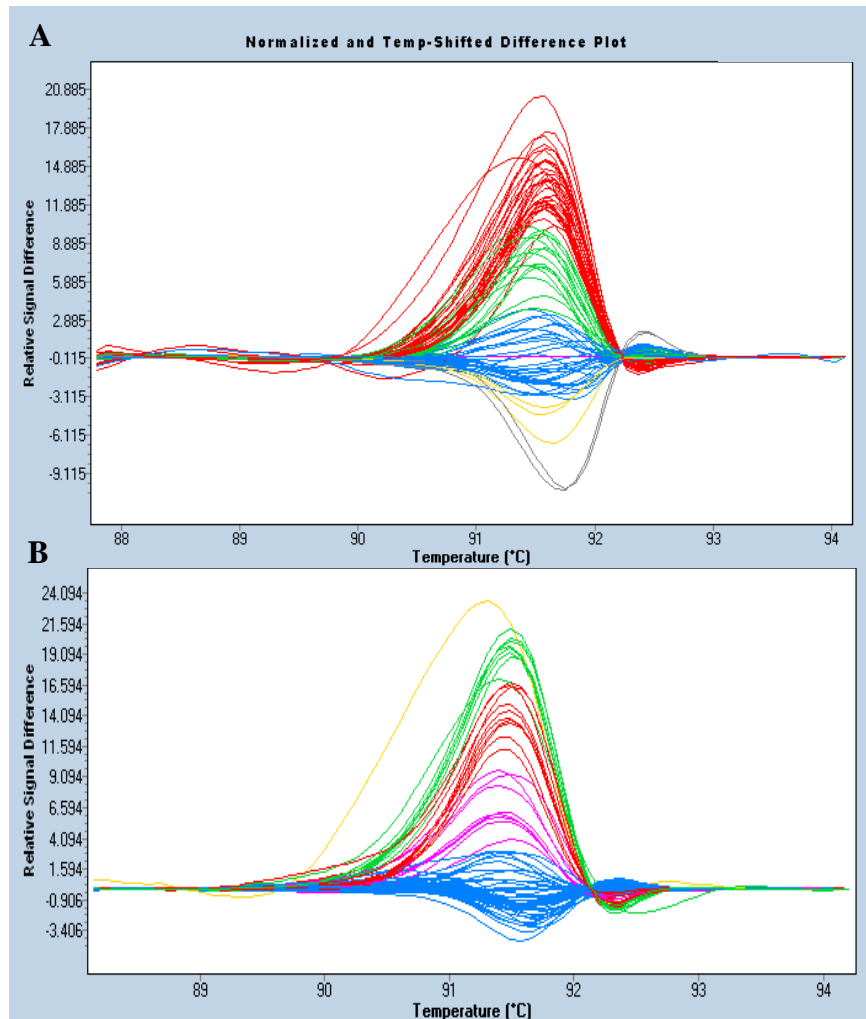


Abbildung 18: Optimierung der Anzahl der Einzelmessungen des Fluoreszenzsignals pro Grad Celsius

Zur Etablierung des HRM Laufzeitprotokolls wurden verschiedene Erfassungszeiten des Fluoreszenzsignals pro Grad Celsius getestet. Abgebildet ist das HRM für den SNP rs11550452 im *IPO4* Gen Ex17 und dem in Abbildung 10 aufgeführten Laufzeitprotokoll. Das Ergebnis des HRM mit 25 Erfassungen/1°C zeigt, dass die 80 Proben nur schwer den unterschiedlichen Genotypen zugeordnet werden können, da es teilweise zu Überschneidungen der Schmelzkurven kommt (A). Ein deutlicher Unterschied in der relativen Signaldifferenz zeigt sich verglichen mit dem HRM mit 35 Erfassungen/1°C (B). Mit diesem Ansatz ist eine Zuordnung zum Genotyp eindeutiger

Der dritte Schritt umfasste die Optimierung der Effizienz der PCR, indem die Zyklenzahl von 50 auf 55 erhöht wurde. So konnte sichergestellt werden, dass alle Amplifikationen die Plateauphase erreichen.

5.2.5 Etablierung der designten Sonden

Nachdem die Bedingungen für das HRM etabliert waren, erfolgte die Etablierung der designten Sonden. Hierfür wurde das in Tabelle 21 beschriebene Touchdown Temperaturprofil angewendet. Die Zusammensetzung des verwendeten Mastermixes ist in Tabelle 20 aufgeführt. Um den zur Sonde komplementären Strang im Überschuss zu synthetisieren, wurde ein asymmetrischer Ansatz gewählt. So konnte ein stärkeres Sondensignal als mit einem symmetrischen Ansatz generiert werden. Um den Bestand an Patienten DNA zu schonen, wurden für die Etablierung DNA Proben aus der CEPH Studie verwendet. Im Folgenden sollte ermittelt werden, welche der für jeden SNP jeweils zwei designten Sonden effizienter funktioniert. Hierzu wurden beide Sonden für den entsprechenden Genabschnitt in einem HRM Ansatz getestet.

Die Auswahl der Sonde für die anschließende Typisierung erfolgte, wie beispielhaft in Abbildung 20 dargestellt, anhand der Ergebnisse im HRM. Der SNP rs11550452 in Exon 17 war der einzige SNP, für den ein funktionierender HRM Ansatz mit Sonde etabliert werden konnte. Abbildung 19 zeigt beispielhaft anhand des SNP rs205384 im *XPO6* Gen das Ergebnis der Sonden Etablierung für die übrigen fünf Polymorphismen. Mit keiner der designten Sonden konnten eindeutige Unterschiede des Floreszenzsignals im HRM generiert werden. Eine detektion der Sequenzunterschiede war mit diesen Sonden nicht möglich. Die betroffenen Polymorphismen wurden daher mit einem klassischen HRM Ansatz typisiert.

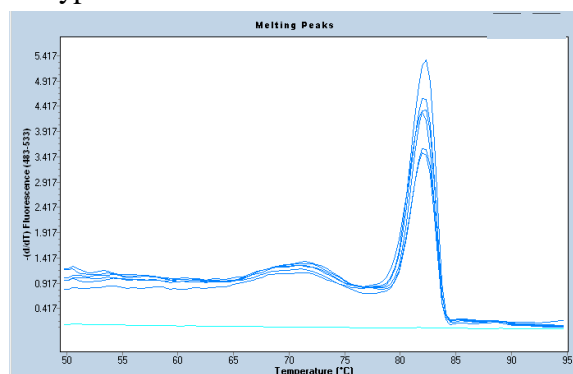


Abbildung 19: Ergebnis des HRM zur Etablierung der designten Sonden in *XPO6*
Die Abbildung zeigt das Ergebnis des High Resolution Melting mit asymmetrischem Ansatz der Touchdown PCR zur Etablierung der unmarkierten Hybridisierungssonde im *XPO6* Gen. Gezeigt ist die erste negative Ableitung der Schmelzkurven mit der Sonde IPO4-Ex16-R-S-P. Das Abschmelzen der Sonden generiert keinen eindeutigen Unterschied des Floreszenzsignals. Daher können die Sequenzunterschiede mit dieser Sonde nicht detektiert werden.

Ergebnisse

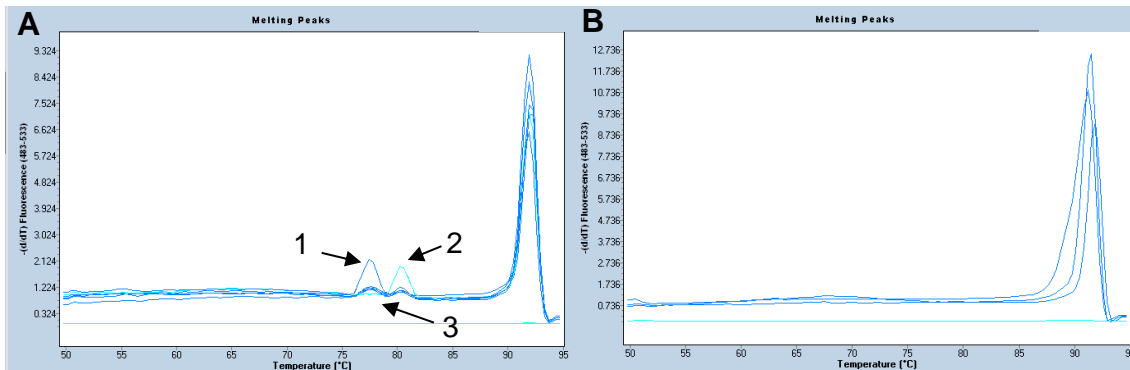


Abbildung 20: Ergebnis des HRM zur Etablierung der designten Sonden im *IPO 4* Gen

Die Abbildung zeigt das Ergebnis des High Resolution Melting mit asymmetrischem Ansatz der Touchdown PCR zur Etablierung der unmarkierten Hybridisierungssonden im *IPO4* Gen Exon 17. **A:** Erste negative Ableitung der Schmelzkurven mit der Sonde *IPO4-Ex17-S-P*. Die durch das Abschmelzen der Sonden hervorgerufenen Peaks werden deutlich sichtbar. Der erste Peak (1) entsteht durch das Abschmelzen der Sonde von dem DNA Strang mit nicht komplementärer Base an der Stelle des SNP. Erst bei Erhöhen der Temperatur löst sich die Sonde von dem DNA Strang mit komplementärer Base (2). Heterozygote Proben generieren Schmelzkurven mit doppeltem Peak (3). **B:** Erste negative Ableitung der Schmelzkurven mit der Sonde *IPO4-Ex17-R-S-P*. Das Abschmelzen der Sonden wird nicht sichtbar. Mit dieser Sonde können die Sequenzunterschiede nicht detektiert werden. Daher wurde die Sonde *IPO4-Ex17-S-P* für die folgende Typisierung ausgewählt.

5.2.6 Zusammenfassung der Etablierungsergebnisse

Die Bedingungen für die nachfolgende Genotypisierung mittels HRM konnten erfolgreich etabliert werden. Die getesteten Primerpaare mit der intensivsten Bande erwarteter Höhe wurden ausgewählt. Um eine sichere Unterscheidung der Genotypen im HRM zu gewährleisten, wurden die einzusetzende $MgCl_2$ und DNA Menge optimiert und das HRM Laufzeitprotokoll angepasst. Dabei ergaben sich die besten Ergebnisse für den Einsatz von 2.0 mM $MgCl_2$ und 30ng DNA. Die Differenzierung der Schmelzkurven konnte durch 55 PCR Zyklen und 30 Fluoreszenzmessungen/1°C deutlich verbessert werden. Um den SNP in *IPO4Ex17* zu typisieren, war es notwendig, Sonden zu designen. Durch die Verwendung eines asymmetrischen PCR Ansatzes konnte die effektivste Sonde ausgewählt werden.

5.3 Nachweis der identifizierten SNPs in der Normalbevölkerung und Genotypisierung der Patientenproben

Es wurden sechs SNPs in Kandidatengenomen identifiziert, die Einfluss auf die Pathogenese und damit das Erkrankungsalter der SCA3 vermuten lassen (Tabelle 24). Für jeden dieser sechs SNPs wurden Primer designt und etabliert. Um die Schmelzprofile der beiden homozygoten Proben besser unterscheiden zu können, wurde für jeden SNP eine Sonde designt. Von diesen konnte nur für den SNP im *IPO4* Exon 17 ein HRM Ansatz mit unmarkierter Hybridisierungssonde etabliert werden. Für die Genotypisierung der anderen fünf SNPs wurde ein klassischer HRM Ansatz gewählt. Hierzu erfolgte die Etablierung der Zusammensetzung des Mastermix sowie eine Optimierung des HRM Laufzeitprotokolls. Unter diesen Voraussetzungen wurde im Folgenden der Nachweis der SNPs in der Normalbevölkerung sowie in den 492 Patientenproben durchgeführt.

5.3.1 Nachweis der SNPs und deren Allelfrequenz in der Normalbevölkerung

Bevor die Versuche mit Patientenproben begonnen wurden, wurde zur Validierung aller zuvor etablierten Versuchsbedingungen sowie zur Bestätigung der Allelfrequenzen (AF) der SNPs der Nachweis der SNPs in der Normalbevölkerung erbracht. Hierzu wurden für jeden SNP zwischen 15 und 25 CEPH-DNA Proben mittels HRM analysiert. Ein Kriterium zur Selektion der Kandidatengene war das Vorliegen von validen Daten zur MAF aus vorhergehenden Studien. Aus den Ergebnissen des Nachweises der SNPs in den CEPH Proben wurde für jeden SNP die AF berechnet. So sollten die Angaben zur MAF aus vorhergehenden Studien bestätigt werden. In Abbildung 21 ist beispielhaft der Nachweis der drei Genotypen GG, GA und AA des SNP rs7146310 im *IPO 4* Ex 16 mittels HRM dargestellt. Die Ergebnisse wurden im Anschluss an das HRM durch eine Sequenzierung verifiziert (s. Kapitel 5.3.4).

Ergebnisse

Ergebnisse

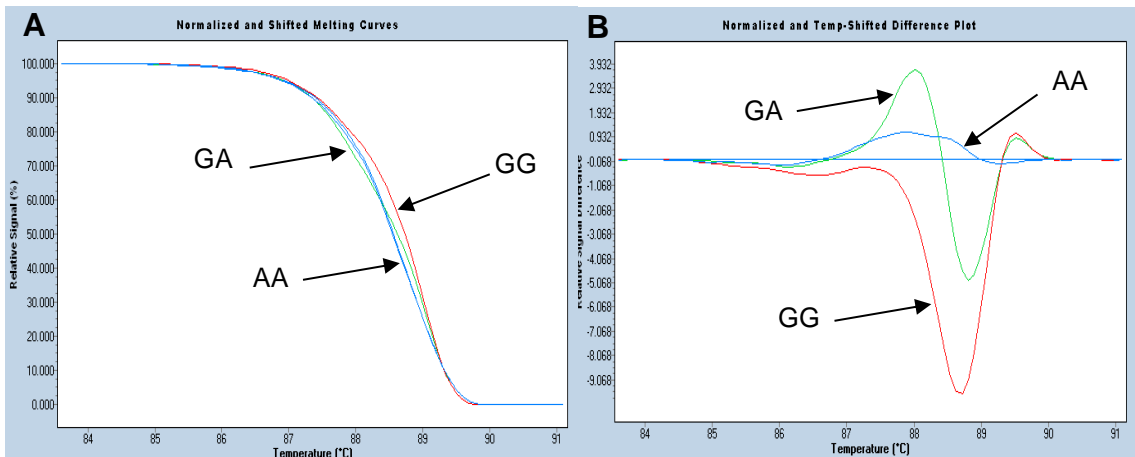


Abbildung 21: Nachweis des SNPs rs7146310 im *IPO4* Ex16 in CEPH-DNA Proben mittels HRM

Um die SNPs in der Normalbevölkerung nachzuweisen, wurde eine Genotypisierung von CEPH-DNA Proben mittels HRM durchgeführt. **A:** Ergebnis des HRM für den SNP rs7146310 im *IPO4* Ex16 in der normalisierten und Temperatur verschobenen Darstellung. Es lassen sich drei Schmelzkurven mit sich deutlich voneinander unterscheidenden Schmelzprofilen erkennen. Im Anschluss wurden diese Ergebnisse mittels Sequenzierung verifiziert. Jede der drei Schmelzkurven konnte so einem Genotyp zugeordnet werden. **B:** Ergebnis des HRM für den SNP rs7146310 im *IPO4* Ex16 in der difference plot Darstellung. In dieser Darstellung werden die Unterschiede im Schmelzverhalten deutlicher. Die drei Genotypen lassen sich eindeutiger unterscheiden.

In gleicher Weise wurde für jeden der untersuchten Polymorphismen vorgegangen. So konnte der Nachweis aller sechs SNPs in den CEPH Proben erbracht werden. Für den SNP im *KPNA2* Gen wurde in den Versuchen mit den CEPH-DNA Proben, trotz einer angenommenen MAF von 0.465, keine Probe homozygot typisiert. Tabelle 26 zeigt die genauen Ergebnisse der Typisierung sowie die berechnete AF für den jeweiligen SNP. Die Ergebnisse zeigen, dass die berechneten Allelfrequenzen der SNPs in etwa denen aus vorherigen Studien entsprechen (vgl. Tabelle 24). Aus diesem Grund wurde im Folgenden die Typisierung der Patientenproben angeschlossen.

Tabelle 26: Übersicht der nachgewiesenen Genotypen in den CEPH-DNA Proben mit den daraus ermittelten MAFs

Ergebnisse des Nachweises der SNPs in den CEPH-DNA Proben und die daraus errechnete MAF für den jeweiligen SNP. Alle SNPs bis auf den SNP im *CAST* Gen wurden dabei mittels HRM nachgewiesen. Für den SNP im *CAST* Gen erfolgte die Genotypisierung der CEPH-DNA Proben mittels Restriktionsverdau (s. Kapitel 4.8).

Gen	Homozygot Häufigeres Allel	Heterozygot	Homozygot Selteneres Allel	MAF
<i>CAPN 2</i>	12	4	1	0.432
<i>CAST</i>	14	2	2	0.167
<i>IPO 4 Ex 16</i>	13	9	1	0.239
<i>IPO 4 Ex17</i>	12	7	1	0.225
<i>KPNA 2</i>	0	18	0	0.5
<i>XPO 6</i>	9	11	0	0.275

5.3.2 Genotypisierung der Patientenproben mittels HRM

Nachdem die SNPs in der Normalbevölkerung nachgewiesen wurden, erfolgte im nächsten Schritt der Nachweis der Polymorphismen in den Patientenproben. Hierzu wurden die 492 Proben mittels High Resolution Melting typisiert. So wurde für die SNPs in den Genen *IPO4*, *XPO6* und *CAPN2* vorgegangen. Zur Typisierung des SNP im *CAST* Gen wurde der Restriktionsverdau als Methode gewählt (s.Kapitel 5.3.5). Im HRM bildeten sich für die einzelnen SNPs drei klar voneinander abgrenzbare Gruppen mit unterschiedlichen Schmelzprofilen aus. Dies ist in Abbildung 22 beispielhaft für den SNP rs205384 in *XPO6* dargestellt.

Ergebnisse

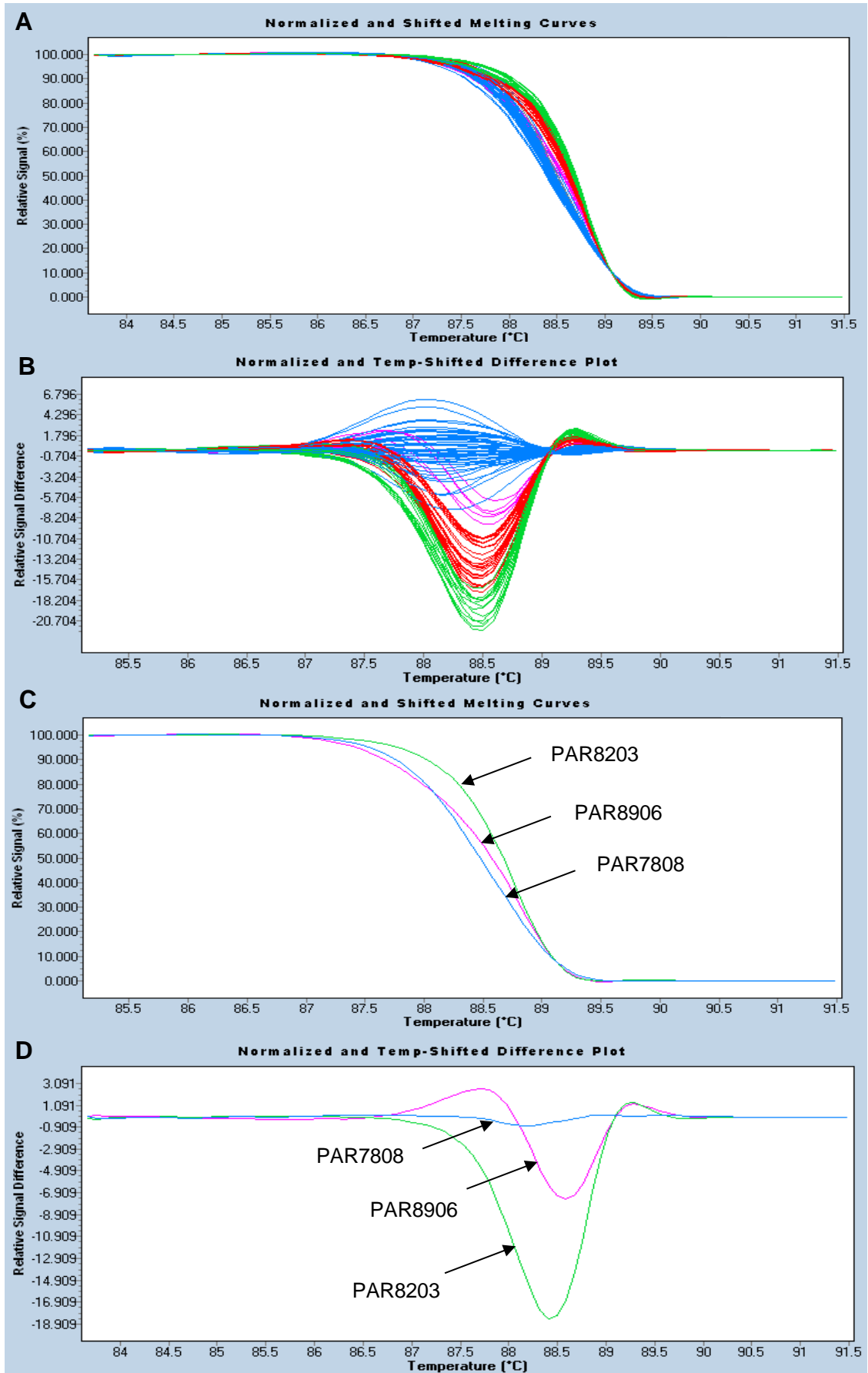


Abbildung 22: Ergebnis des HRM für den SNP rs205384 in *XPO6* Gen

A: Ergebnis des HRM für den SNP rs205384 im Exportin 6 Gen in der normalisierten und Temperatur verschobenen Darstellung. Getestet wurden 92 Patientenproben, von denen keine Probe ausgefallen ist. Die Schmelzkurven sind in dieser Ansicht nur schwer voneinander abgrenzbar. **B:** Ergebnis des HRM für den SNP rs205384 in der difference plot Darstellung. In dieser Darstellung sind die Unterschiede zwischen den Schmelzprofilen besser erkennbar. Die Schmelzkurven wurden durch die LightCycler 480 Software in vier Gruppen eingeteilt, denen jeweils eine Farbe zugeordnet wurde. Die grün markierten Proben zeigen jedoch das gleiche Schmelzverhalten wie die rot markierte Gruppe. Sie wurden daher für die folgende Verifizierung der HRM Ergebnisse zusammengefasst. **C:** Zufällige Auswahl je einer Probe aus jeder der drei Gruppen in der normalisierten und Temperatur verschobenen Darstellung. Der Schmelzkurvenverlauf der grünen Kurve (PAR8203) ist im Vergleich zur pinken Kurve (PAR8906) auf der x-Achse verschoben. Daher handelt es sich dabei vermutlich um homozygote Proben. Der Kurvenverlauf der blauen Kurve (PAR7808) passt zu einem heterozygoten Genotyp. **D:** Zu sehen sind die drei ausgewählten Indexproben, die zur Verifizierung der Ergebnisse sequenziert wurden. In der difference plot Darstellung sind die Unterschiede im Schmelzverhalten besonders deutlich erkennbar. Aus diesem Grund erfolgte die Zuordnung der Genotypen mit Hilfe dieser Ansicht.

Anhand des Schmelzverhaltens ließen sich drei Gruppen unterscheiden. Eine Unterscheidung zwischen heterozygotem und homozygotem Genotyp war daher möglich. Der Schmelzkurvenverlauf der grünen Kurven ist im Vergleich zur pinken Gruppe auf der x-Achse verschoben. Daraus ergibt sich die Vermutung, dass es sich dabei um homozygote Proben handelt. Der Kurvenverlauf der blauen Kurven, der von den anderen beiden Gruppen deutlich abweicht, entspricht dem von heterozygoten Proben.

Die Typisierung der 492 Patientenproben wurde für die SNPs in *IPO4*, *XPO6* und *CAPN2* in gleicher Weise durchgeführt. So konnten für jeden SNP zwischen 419 und 440 Proben erfolgreich typisiert werden. Proben, deren Schmelzkurve sich im HRM nicht klar einer der drei Gruppen mit unterschiedlichem Schmelzprofil zuordnen ließ, wurden gesammelt und das HRM gemeinsam mit einer Positivkontrolle zu einem späteren Zeitpunkt wiederholt. In gleicher Weise wurde mit ausgefallenen Proben vorgegangen. Einige dieser Proben ließen sich trotz wiederholtem HRM nicht typisieren. Aus diesem Grund ergab sich für jeden SNP eine andere Gesamtzahl an

Ergebnisse

typisierten Patienten. Tabelle 27 zeigt die genaue Anzahl typisierter Proben für alle fünf mittels HRM typisierten Gene.

Um die Zuordnung der Genotypen aus dem HRM zu verifizieren, wurde aus jeder Gruppe mit ähnlichem Schmelzprofil pro HRM Durchlauf mindestens eine Probe zur Sequenzierung ausgewählt (Kapitel 5.3.4). Die Auswahl dieser Indexprobe erfolgte zufällig.

Tabelle 27: Übersicht der absoluten Häufigkeit der Genotypen für alle mittels HRM typisierten SNPs

Anzahl der Patientenproben mit dem jeweiligen Genotyp für die SNPs rs7146310, rs11550452, rs205384, rs17599 und rs1059558.

Gen	SNP ID	Homozygot häufiges Allel	Heterozygot	Homozygot Seltenes Allel
<i>CAPN 2</i>	rs17599	294	107	25
<i>CAST</i>	Mittels	Restriktionsverdau	typisiert	
<i>IPO 4 Ex 16</i>	rs7146310	158	202	59
<i>IPO 4 Ex17</i>	rs11550452	166	199	75
<i>KPNA 2</i>	rs1059558	0	92	0
<i>XPO 6</i>	rs205384	187	194	54

Die Genotypisierung der CEPH-DNA Proben ergab für den SNP rs1059558 im *KPNA2* Gen ausschließlich Heterozygote Proben. Daraufhin wurden zunächst 92 Patientenproben mittels HRM typisiert. Wie in Abbildung 23 dargestellt, zeigten alle Patientenproben im HRM ein ähnliches Schmelzverhalten. Die Proben konnten daher nicht ausgehend von ihrem Schmelzprofil in Gruppen eingeteilt werden. Eine Typisierung mittels HRM war somit nicht möglich. Zur Verifizierung der HRM Ergebnisse wurde auch in diesem Fall die Typisierung einzelner zufällig ausgewählter Proben mittels Sequenzierung durchgeführt (s. Kapitel 5.3.4).

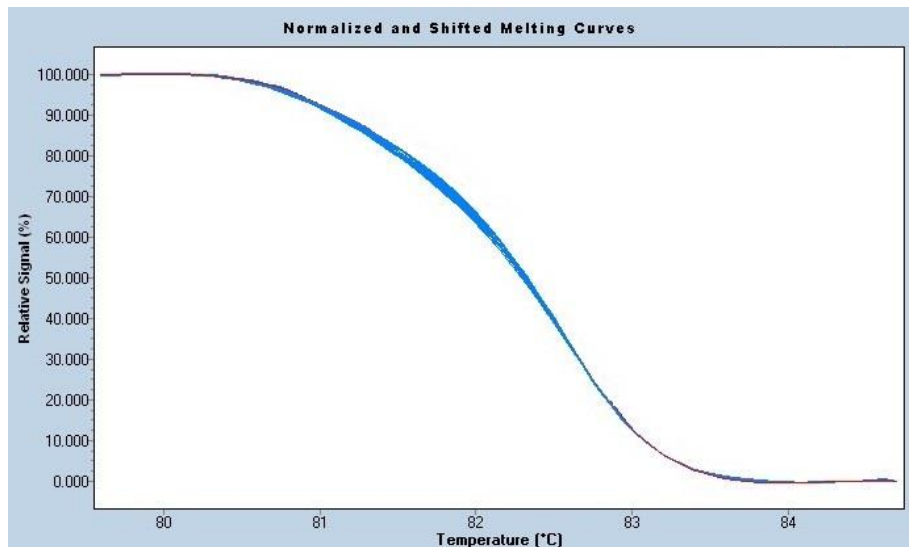


Abbildung 23 Ergebnis des HRM für den SNP rs1059558 im *KPNA2* Gen
HRM für den SNP rs1059558 im *KPNA2* Gen in der normalisierten und Temperatur verschobenen Darstellung. Getestet wurden 92 Patientenproben. Diese zeigten alle das gleiche Schmelzverhalten. Eine Genotypisierung der Proben war daher nicht möglich.

5.3.4 Verifizierung der Genotypisierungsergebnisse mittels Sequenzierung

Die Ergebnisse aus der Genotypisierung mittels HRM sollten durch die Sequenzierung einzelner Proben verifiziert werden. Hierfür wurde aus jeder Gruppe von Patientenproben, die im HRM ein ähnliches Schmelzprofil zeigten, zufällig eine Probe für die Sequenzierung ausgewählt. Die ausgewählten DNA Proben wurden in einem ersten Schritt durch eine PCR amplifiziert. Eine ausreichend hohe DNA Konzentration ist Voraussetzung für eindeutige Sequenzierergebnisse. In einem zweiten Schritt wurden die PCR Produkte mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits (Kapitel 4.5.1) aufgereinigt. Mit 10% der Menge der aufgereinigten Proben wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dadurch konnte die Menge der einzusetzenden DNA für die Sequenzierreaktion anhand der Bandenintensität im Vergleich zur Bandenintensität des pUC-Markers bestimmt werden. Der dritte Schritt umfasste das Ansetzen der Sequenzierreaktion (Kapitel 4.7). Für die Analyse der Sanger Sequenzierung wurde das CEQ8000 Genetic Analysis System von Beckman Coulter, Beveley, MA, USA verwendet. Die Auswertung dieser Ergebnisse erfolgte mit der

Ergebnisse

Chromas Lite Software Version 2.3. In nachfolgender Abbildung 24 ist beispielhaft das Ergebnis der Sequenzierreaktion für die ausgewählten Proben aus dem HRM zur Typisierung des SNP rs205384 im *XPO6* Gen dargestellt.

Jeder Base ist dabei eine Farbe zugeordnet. Guanin ist die Farbe schwarz zugeteilt, ihrer komplementären Base Cytosin die Farbe blau. Ein roter Peak steht für die Pyrimidinbase Thymin, ein grüner Peak für die komplementäre Base Adenin. Die Ergebnisse zeigen, dass jede der drei getesteten Proben einen anderen Genotyp trägt. Die von den Schmelzprofilen im HRM abgeleiteten Annahmen bezüglich der Genotypen dieser Proben konnten so bestätigt werden (Abbildung 25). Somit konnte auf den Genotyp aller Proben mit ähnlichem Schmelzprofil im HRM rückgeschlossen werden. Proben, deren Genotyp in der Analyse der Sequenzierergebnisse nicht eindeutig festgestellt werden konnte, wurden erneut sequenziert. In diesem zweiten Sequenzierdurchlauf wurde jeweils der zuvor nicht verwendete Sequenzierprimer eingesetzt.

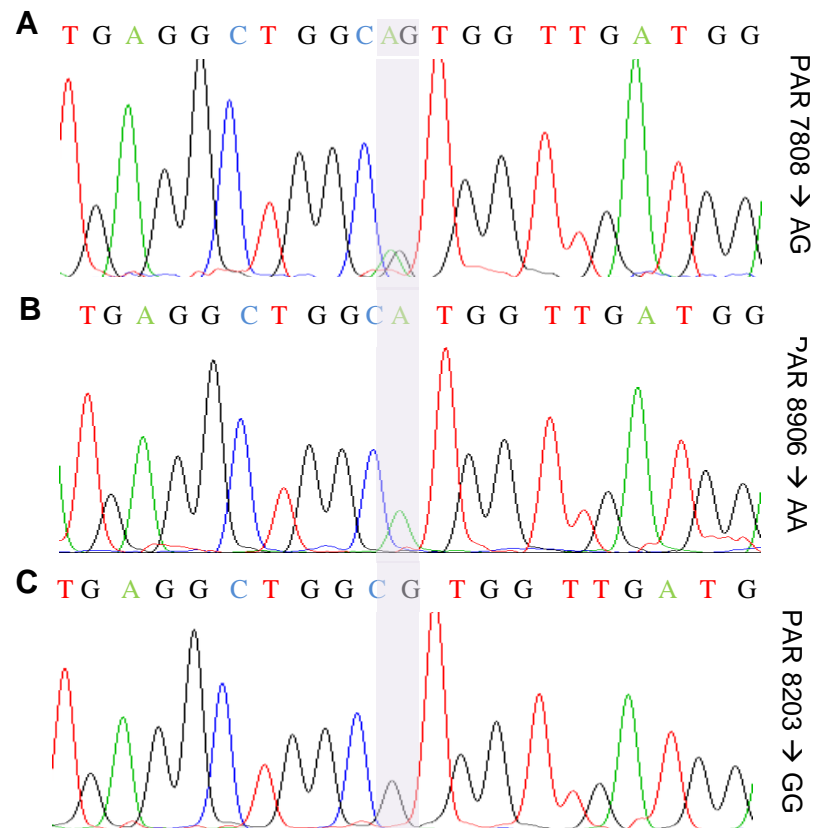


Abbildung 24: Ergebnis der Sequenzierung der ausgewählten Proben aus dem HRM zur Typisierung des SNP rs205384 im XPO6 Gen

Aus jeder der drei Probengruppen, die im HRM ein ähnliches Schmelzprofil generierten, wurde eine Probe zur Sequenzierung ausgewählt. **A:** Sequenzierergebnis der Probe PAR 7808 für den SNP rs205384. An der Stelle des SNP (grau hinterlegt) sind deutlich zwei Peaks zu erkennen. Der grüne Peak steht für die Base Adenin, der schwarze für Guanin. Der Patient trägt demnach den Genotyp AG. **B:** Sequenzierergebnis der Probe PAR 8203 für den SNP rs205384. Die Probe zeigt an der Stelle des SNP einen grünen Peak. Dieser steht für die Base Adenin. Der Genotyp des Patienten ist folglich homozygot im Bezug auf die häufigere Allelvariante(AA). **C:** Durch den schwarzen Peak an der Stelle des SNP ergibt sich aus dem Sequenzierergebnis für die Probe PAR 8906 der Genotyp GG. Die Ergebnisse der Sequenzierung stimmen somit mit den aus dem Schmelzprofil im HRM abgeleiteten Genotypen überein.

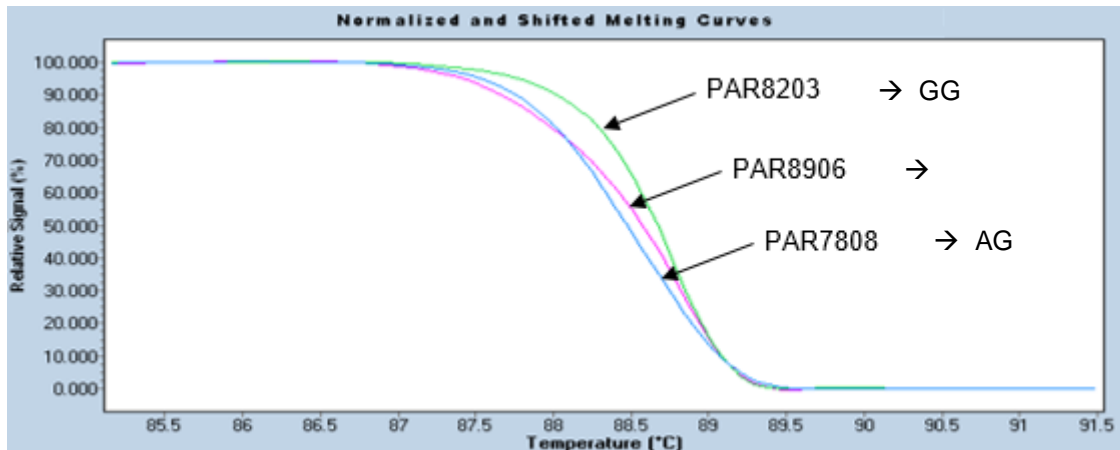


Abbildung 25: Ergebnisse der Sequenzierung in Zusammenschau mit den HRM Schmelzprofilen für den SNP rs205384 im *XPO6* Gen

Die zur Typisierung mittels Sequenzierung ausgewählten Indexproben sind in der normalisierten und Temperaturverschobenen Darstellung abgebildet. Die Typisierung der Probe PAR7808 (blau) mittels Sanger Sequenzierung ergab den Genotyp AG. Für die Probe PAR8203 (pink) ergab die Sanger Sequenzierung den Genotyp AA und für die Probe PAR8906 (grün) den Genotyp GG. Jede der drei Schmelzkurven bildet somit einen anderen Genotyp ab, sodass alle übrigen Proben mit ähnlichem Schmelzverhalten wie die Indexprobe der gleiche Genotyp zugeordnet werden konnte.

Im HRM für den SNP rs1059558 im *KPNA2* Gen zeigten alle Patientenproben ein ähnliches Schmelzverhalten (Abbildung 23). Aus diesem Grund war die Genotypisierung mittels HRM nicht möglich. Zur Ermittlung des Genotyps wurden daher einige Proben sequenziert. Nachfolgende Abbildung 26 zeigt die Ergebnisse der Sanger Sequenzierung von drei Patientenproben. Die Ergebnisse der Sequenzierung für die drei getesteten Proben (MIL3301, PAR 13301, PAR13701) ergaben den Genotyp GA. Auch alle weiteren sequenzierten Proben waren für den SNP rs1059558 laut Sanger Sequenzierung heterozygot. Da alle Proben im HRM ein ähnliches Schmelzprofil zeigten, konnte bestätigt werden, dass diese auch den gleichen Genotyp tragen.

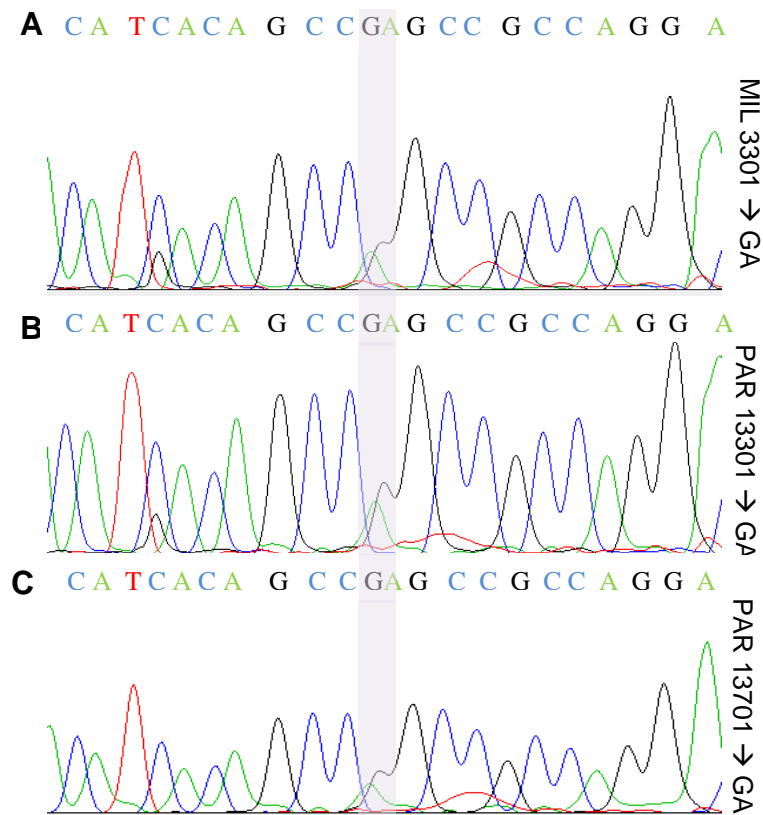


Abbildung 26: Ergebnis der Sequenzierung der ausgewählten Proben aus dem HRM zur Typisierung des SNP rs1059558 im *KPNA2* Gen

A-C: Die Analyse der Sanger Sequenzierung ergab für alle drei Patientenproben (MIL3301, PAR 13301, PAR13701) einen doppelten Peak an der Stelle des SNP . Demnach tragen die drei Patienten den Genotyp GA. Damit konnte gezeigt werden, dass für das *KPNA2* Gen die Proben mit ähnlichem Schmelzprofil im HRM den gleichen Genotyp tragen.

In Abbildung 27 sind die durch die Sequenzierung verifizierten Genotypisierungsergebnisse aller untersuchten Patientenproben zur besseren Übersicht graphisch dargestellt. Aus diesen endgültigen Typisierungsergebnissen wurde die MAF für jeden SNP berechnet. Diese Berechnungen erfolgten, wie für die MAF der typisierten CEPH DNA Proben, unter Zuhilfenahme des Serviceprogramms <http://emerald.tufts.edu/courtlab> mit der Formel:

$$(p+q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Dabei ist:

p: Allelfrequenz von Allel A

q: Allelfrequenz von Allel B

Ergebnisse

Für den SNP rs7146310 im *IPO4* Gen zeigten fast die Hälfte (48,46%) der typisierten Patienten einen heterozygoten Genotyp. Bei einer Häufigkeit von 37,53% homozygoter Proben mit häufigerem Allel und 14,01% homozygoter Proben mit seltenerem Allel, ergibt sich eine MAF von 0.382. Im Vergleich zur MAF die für diesen SNP in vorhergehenden Studien beobachtet wurde, weicht diese um 0.0085 ab. Auch für den zweiten untersuchten SNP im *IPO4* Gen stellen die heterozygoten Patienten mit 45,23% den größten Anteil. Die MAF des SNP in diesem Gen weicht mit 0.095 ebenfalls nur geringfügig von der MAF ab, die bspw. im HapMap Projekt beobachtet wurde. Der Polymorphismus rs205384 im *XPO6* Gen kommt mit einer MAF von 0.347 in den Patientenproben im Vergleich zu der MAF von 0.184 in Vorstudien etwas häufiger vor. Die Patienten mit heterozygotem Genotyp stellen dabei mit einem Anteil von 44,06% die größte Gruppe. Im Gegensatz dazu tragen mit 69,01% für den SNP im *CAPN2* Gen die meisten Patienten den Genotyp mit häufigerer Allelvariante. Im Vergleich zu der beobachteten MAF aus vorhergehenden Studien, wurde der SNP mit einer MAF von 0.184 in den Patientenproben seltener gefunden.

Da die Typisierung für den SNP im *KPNA2* Gen mittels HRM nicht möglich war, konnte erst nach der Sequenzierung der ausgewählten Proben eine Aussage zur Allelfrequenz gemacht werden. Wie vorangehend gezeigt, wurden durch die Sequenzierung alle aus dem HRM zufällig ausgewählten Proben heterozygot typisiert. Da alle Proben im HRM ein ähnliches Schmelzverhalten zeigten, musste zunächst davon ausgegangen werden, dass alle Patientenproben (genau wie die bereits typisierten CEPH-DNA Proben) an der Stelle des Polymorphismus im *KPNA2* Gen die gleiche Sequenz aufweisen.

Ergebnisse

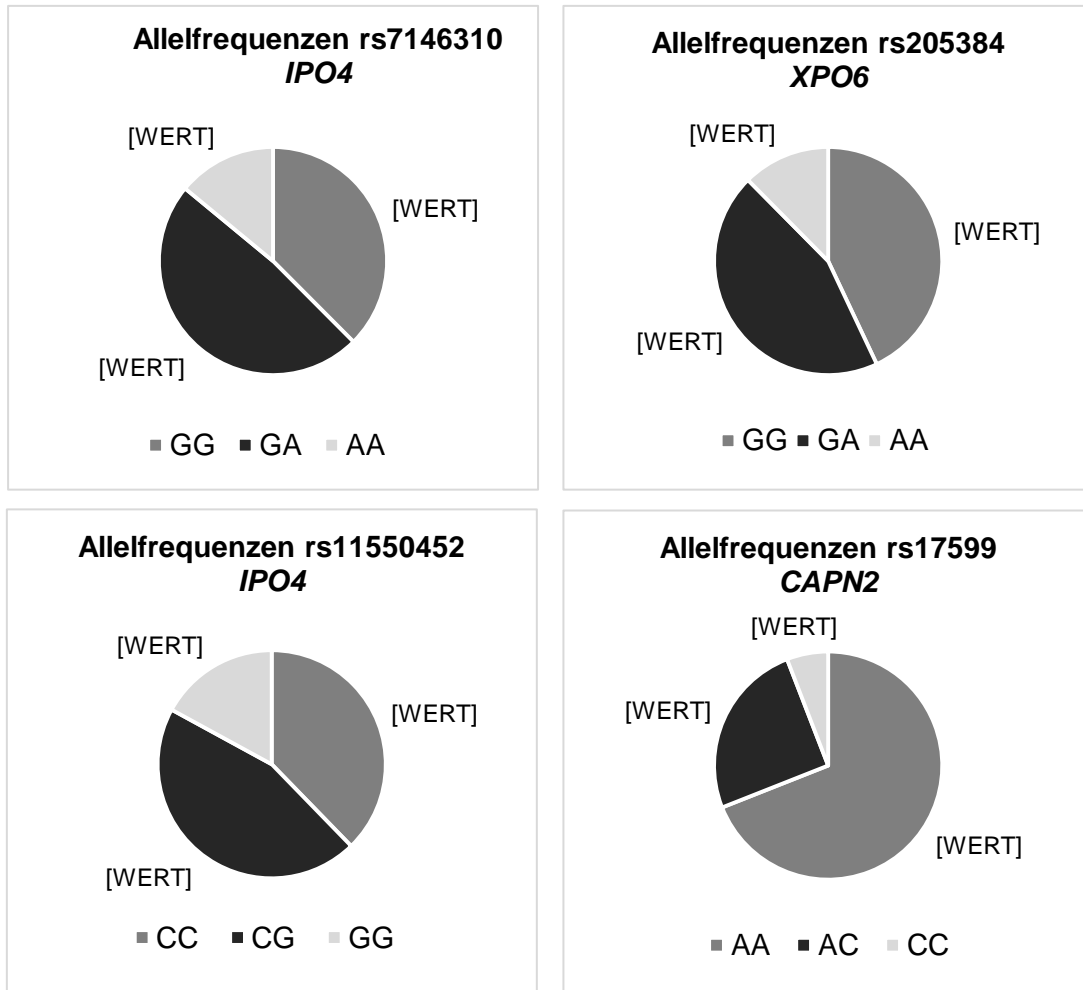


Abbildung 27: Übersicht der relativen Häufigkeit der Genotypen für die SNPs in *IPO4*, *XPO6* und *CAPN2* in allen untersuchten Patientenproben

Die Ergebnisse der Genotypisierung wurden aufgeschlüsselt nach SNP ID und zugehörigem Gen graphisch dargestellt. Die Häufigkeit der einzelnen Genotypen wurde in relativen Zahlen angegeben. Mit Ausnahme des SNP im *CAPN2* Gen, ist der Anteil der Patienten mit heterozygotem Genotyp am größten. Mit 69,01% ist der Anteil der Patienten mit homozygotem Genotyp für den SNP rs17599 am größten.

Aus diesen finalen Typisierungsergebnissen wurde berechnet, ob diese mit dem Hardy Weinberg Gleichgewicht zu vereinbaren sind. Um die Wahrscheinlichkeit der Nullhypothese, dass die beobachtete Anzahl der Patienten für jeden Genotyp mit dem Hardy Weinberg Gesetz vereinbar ist, zu ermitteln, wurde der Chi-Quadrat Test durchgeführt. Hierfür wurde unter Zuhilfenahme des Serviceprogramms <http://emerald.tufts.edu/courtlab> folgende Formel verwendet:

Ergebnisse

$$\chi^2 = \sum_{1 \leq i \leq d+1} \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

Dabei ist:

O_i : die beobachtete Anzahl in Gruppe i

E_i : die erwartete Anzahl in Gruppe i

In der Hardy Weinberg Chi-Quadrat Analyse ist die Anzahl der Freiheitsgrade gleich der Anzahl der Genotypen minus der Anzahl der Allele. In diesem Fall: $3 - 2 = 1$. Daher wird für die Berechnung ein Freiheitsgrad festgelegt. Die Nullhypothese wird verworfen, wenn die in der vorliegenden Stichprobe beobachtete Häufigkeit zu stark von der erwarteten Häufigkeit abweicht. Dies ist dann der Fall, wenn die Wahrscheinlichkeit unter dem festgelegten Schwellenwert von 0.05 liegt. Die Ergebnisse zeigen, dass die beobachtete Anzahl der Genotypen für die Beiden SNPs rs7146310 und rs11550452 im *IPO4* Gen sowie für den SNP rs205384 im *XPO6* Gen mit dem Hardy Weinberg Gleichgewicht vereinbar sind (Tabelle 28). Der p-Wert des SNP im *CAPN2* Gen lag mit 0.0007 deutlich unter dem Schwellenwert von 0.05. Die Nullhypothese wurde verworfen. Daher wurde dieser SNP von allen weiteren Analysen ausgeschlossen.

Tabelle 28: Übersicht der finalen Genotypisierungsergebnisse durch das HRM mit Allelfrequenzen und daraus berechneter Vereinbarkeit mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Die Tabelle zeigt die endgültigen Genotypisierungsergebnisse aller SNPs, die mittels HRM typisiert wurden. Zum Vergleich ist die nach dem Hardy Weinberg Gesetz zu erwartende Anzahl der Patienten für jeden Genotypen aufgeführt. Aus der tatsächlich beobachteten Anzahl der Patienten wurden für jeden SNP die Allelfrequenzen berechnet. Um zu prüfen, ob diese mit dem Hardy Weinberg Gleichgewicht vereinbar ist, wurde mit Hilfe des Hardy Weinberg Rechners (s.Tabelle 10) der Chi-Quadrat Wert errechnet. Wenn dabei $p < 0.05$, ist dies nicht mit dem Hardy Weinberg Gleichgewicht vereinbar. Der SNP im *CAST* Gen wurde mittels Restriktionsverdau typisiert. Die Genotypisierungsergebnisse werden im folgenden Kapitel dargestellt.

<i>CAPN2</i> rs17599				<i>CAST</i> rs754615		
Genotyp	AA	AC	CC			
Beobachtet	294	107	25			
Erwartet	283.47	128.07	14.47	Mittels Restriktionsverdau typisiert s. Kapitel 5.3.5		
Allelfrequenz	A = 0.816 C = 0.184					
p-Wert	0.0007*					
HWG	✗					
<i>IPO4Ex16</i> rs7146310				<i>IPO4Ex17</i> rs11550452		
Genotyp	GG	GA	AA	GG	GC	CC
Beobachtet	158	202	59	166	199	75
Erwartet	160.1	197.8	61.1	160.21	210.59	69.21
Allelfrequenz	G = 0.618 A = 0.382		G = 0.603		C = 0.397	
p-Wert	0.664		0.248			
HWG	✓		✓			
<i>KPNA2</i> rs1059558				<i>XPO6</i> rs205384		

Ergebnisse

Genotyp	GG	GA	AA	GG	GA	AA	
Beobachtet	0	92	0	187	194	54	
Erwartet	23	46	23	185.42	197.17	52.42	
Allelfrequenz	G = 0.5		A = 0.5		G = 0.653		A = 0.347
p-Wert	0		0.701				
HWG	✘		✔				

*dieser SNP war nicht mit dem HWG vereinbar und wurde daher von allen weiteren Analysen ausgeschlossen.

5.3.5 Genotypisierung der Patientenproben auf den SNP im *CAST* Gen mittels Restriktionsverdau

Die Typisierung der Proben auf den Polymorphismus rs754615 im *CAST* Gen wurde zunächst mittels HRM durchgeführt (Abbildung 28). Die Schmelzkurven für diesen SNP unterschieden sich im Vergleich zu denen der anderen getesteten Polymorphismen deutlich.

Ein homogener Schmelzvorgang generiert im HRM eine Schmelzkurve mit kontinuierlicher Abnahme der Fluoreszenzintensität (vgl. Abbildung 6). Wie in der normalisierten und Temperatur verschobenen Darstellung zu sehen, erreichten die Schmelzkurven im Fall des SNP rs754615 bei einer Temperatur von 79°C ein Plateau bei einem relativen Fluoreszenzsignal von ca. 75%. Erst nach einem Temperaturanstieg auf ca. 82°C nahm auch die Fluoreszenzintensität weiter ab. Dieses inhomogene Schmelzverhalten wird in der ersten negativen Ableitung durch zwei Peaks deutlich.

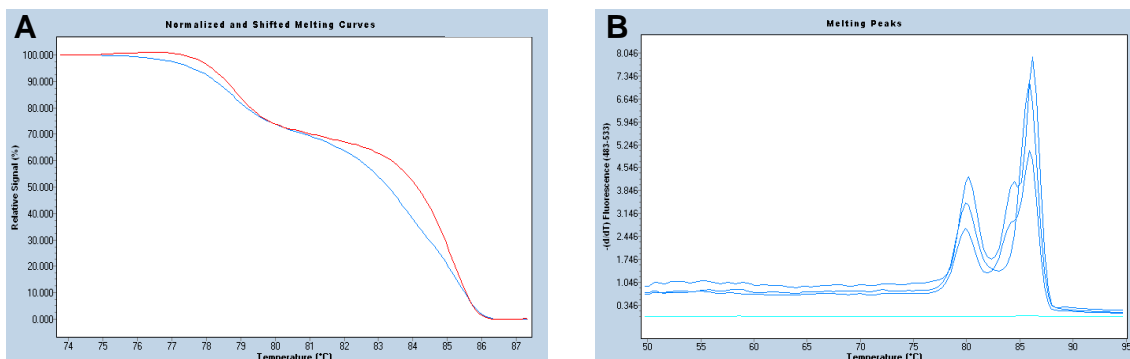


Abbildung 28: Ergebnis des HRM für den SNP rs754615 im CAST Gen

A: Die Schmelzkurven sind in der normalisierten, Temperatur verschobenen Darstellung abgebildet. Beim Abschmelzen der dsDNA nimmt das Fluoreszenzsignal nicht, wie in den HRM Versuchen für die Gene *IPO4*, *XPO6* und *CAPN2*, kontinuierlich ab. Zwischen 79°C und 82°C stagniert das relative Fluoreszenzsignal bei ca. 75 %. Dies spricht dafür, dass der DNA Doppelstrang innerhalb dieses Temperaturbereichs nicht weiter abschmilzt. Erst ab einer Temperatur > 82°C wird wieder eine kontinuierliche Abnahme der Fluoreszenzintensität aufgezeichnet, bis zum Abfall des Fluoreszenzsignals auf 0 %. **B:** In der ersten negativen Ableitung eines weiteren HRM Durchlaufs für den SNP im rs754615 sind zwischen 77°C und 88°C zwei Schmelzspitzen erkennbar. Zwischen den beiden Peaks fällt die relative Signaldifferenz deutlich ab. Daraus lässt sich vermuten, dass die dsDNA in zwei Phasen abschmilzt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die dsDNA rund um den SNP nicht gleichmäßig abschmilzt. Um zu prüfen, ob die Ursache dafür das Vorhandensein mehrerer Schmelzdomänen ist, wurde eine Schmelzanalyse mithilfe des Serviceprogramms <http://www.dna.utah.edu/umelt/um.php> durchgeführt. Das Ergebnis der UMelt Animation (Abbildung 29) zeigt, dass die dsDNA in der Region um den SNP inhomogen abschmilzt. Ist mehr als eine Schmelzdomäne vorhanden, kann von den Unterschieden zwischen den Schmelzprofilen im HRM nicht eindeutig auf deren Sequenz geschlossen werden. Aus diesem Grund wurde zunächst versucht, mit Hilfe des Serviceprogramms Primer3 Version 0.4.0 neue Primer zu designen, deren PCR Produkt ein homogenes Schmelzverhalten zeigt. Durch die UMelt Animation konnte jedoch gezeigt werden, dass keines der neu designten Primerpaare ein PCR Produkt generiert, welches ausschließlich eine Schmelzdomänen aufweist. Beim Vorhandensein von mehr als einer Schmelzdomäne können die unterschiedlichen Schmelzprofile im HRM nicht auf eine unterschiedliche Sequenz zurückgeführt werden. Daher wurde die Genotypisierung der Patientenproben für den SNP rs754615 im *CAST* Gen mittels Restriktionsverdau durchgeführt.

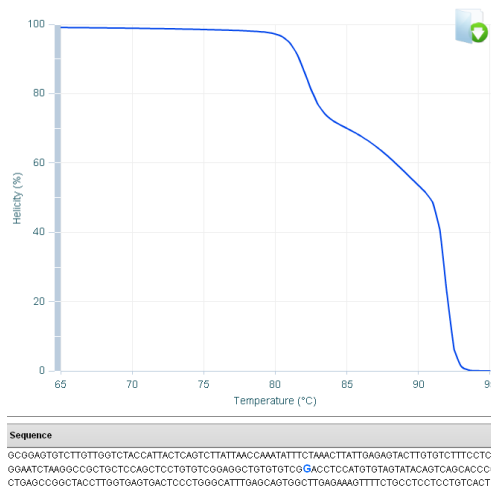
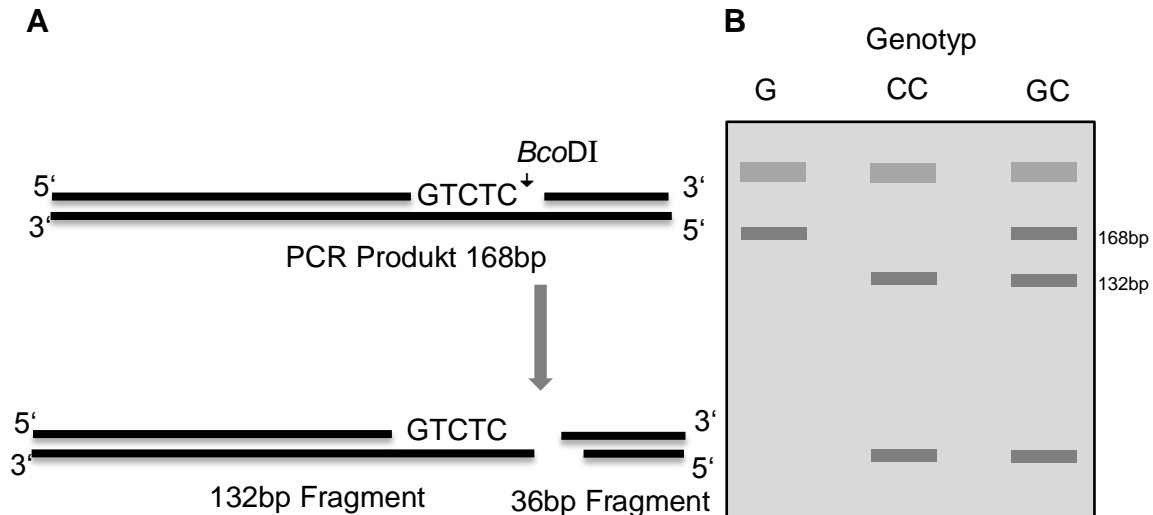


Abbildung 29: Schmelzkurvenanalyse für den DNA Abschnitt um den SNP rs754615 im CAST Gen

In der U-Melt Analyse wurde das Abschmelzen der Doppelstrang DNA um den SNP im CAST Gen animiert. Der DNA Abschnitt ist 245 Basenpaare lang und hat einen GC Gehalt von 50%. Abgebildet ist das Abschmelzen zwischen 65-95°C in 0.5°C Schritten. Es wird deutlich, dass der DNA Abschnitt um die Stelle des SNP (blau) nicht homogen abschmilzt. Es sind mehrere Schmelzdomänen zu erkennen, die in der Schmelzkurvenanalyse mittels HRM in der ersten negativen Ableitung als Peaks sichtbar werden. Eine Zuordnung der Schmelzkurven zu einem bestimmten Genotyp ist somit nicht möglich. Aus diesem Grund wurde für die Genotypisierung des SNP im CAST Gen der Restriktionsverdau gewählt.

Mit Hilfe des NEBcutter Serviceprogramms wurden zwei geeignete Restriktionsenzyme für die Genotypisierung ermittelt. Das Restriktionsenzym *MmeI* schneidet das seltene Allel C (MAF=0.299) nach 168bp des 400bp langen Exons. Auch das Restriktionsenzym *BcoDI* schneidet das seltene Allel C (nach 204bp). Zur Etablierung des Restriktionsverdaus wurden vier verschiedene Versuchsansätze gewählt. Zwei davon mit der Restriktionsendonuklease *MmeI*, wobei einem Ansatz zusätzlich zu den Bestandteilen DNA, Enzym und Cut Smart Puffer (Tabelle 15) 1µl SAM Puffer hinzugefügt wurde. Von den beiden Ansätzen mit dem Restriktionsenzym *BcoDI* wurde einem Ansatz 1µl NEBuffer 4 hinzugegeben. Alle Ansätze wurden zwei Stunden bei 37°C inkubiert. In der anschließenden Agarose-Gelelektrophorese zeigte der Ansatz mit der Restriktionsendonuklease *BcoDI* ohne zusätzlichen NEBuffer 4 als Einziger klare Banden erwarteter Höhe. Aus diesem Grund wurde dieser Ansatz für alle folgenden Versuche ausgewählt. Die Schnittstelle von *BcoDI* sowie die daraus resultierenden Ergebnisse in der Agarose-Gelelektrophorese sind schematisch in Abbildung 30 dargestellt.



Der Verdau der PCR Produkte durch das Restriktionsenzym *BcoDI* führte zu eindeutigen Typisierungsergebnissen. Die Verdauungsprodukte wurden auf ein 2%

Abbildung 30: Schnittstelle der Restriktionsendonuklease *BcoDI* im PCR Produkt um den SNP rs754615 im *CAST* Gen und daraus resultierende Ergebnisse der Agarose-Gelelektrophorese

A: Durch die Primer CAST-Ex23-F1 und CAST-Ex23-R2 wird aus dem den SNP enthaltenden 400bp langen Exon im *CAST* Gen ein 168bp langes PCR Produkt. Das Restriktionsenzym *BcoDI* schneidet die Sequenz 5'GTCTC3'. Die Schnittstelle liegt in 3' Richtung hinter dem Basenpaar 132. Die nach dem Verdau entstandenen Fragmente sind demnach 132bp und 36bp lang. Am 5' Ende kommt es zu einem überhängenden Ende von 5bp. **B:** Schematische Abbildung der Ergebnisse der Agarose-Gelelektrophorese für die drei möglichen Genotypen des Polymorphismus rs754615. Da *BcoDI* das seltenere Allel C (MAF=0.299) schneidet, ist für den Genotyp GG nur eine Bande mit einer Länge von 168bp zu erwarten. Liegt der Genotyp CC vor, werden beide Allele geschnitten. Entsprechend werden in der Agarose-Gelelektrophorese zwei Banden der Länge 132bp und 36bp sichtbar. Das Ergebnis für den Genotyp GC setzt sich aus dem der beiden Homozygoten Varianten zusammen. Das Allel G wird nicht geschnitten, dadurch ergibt sich eine 168bp lange Bande. Das Allel C wird geschnitten, somit entsteht zusätzlich eine Bande der Länge 132bp sowie eine Bande der Länge

Agarosegel geladen und elektrophoretisch getrennt. Die Auswertung bestätigte, dass sich Banden der erwarteten Länge ergaben. Anhand der Banden ließ sich der jeweilige Genotyp einfach ablesen. Die Ergebnisse des Restriktionsverdaus sind in Abbildung 31 dargestellt.

Ergebnisse

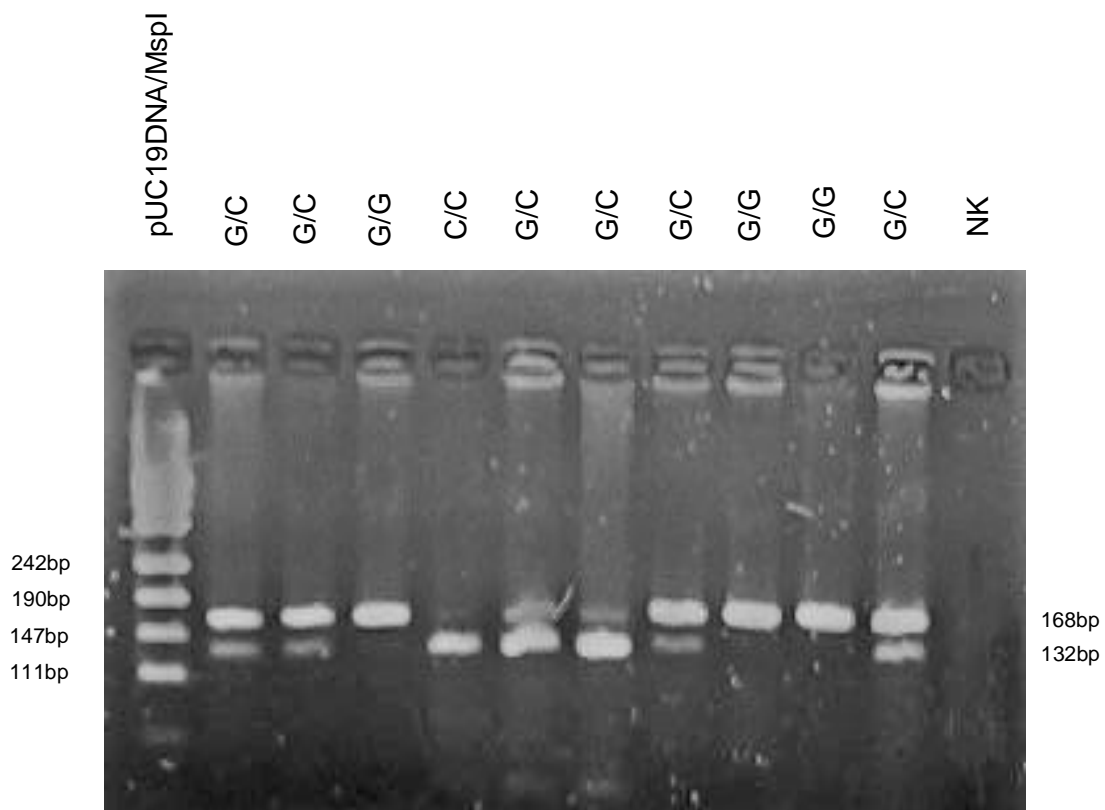


Abbildung 31: Ergebnis des Restriktionsverdau mit der Restriktionsendonuklease *Bco*DI zur Genotypisierung des SNP rs754615 im *CAST* Gen

Die Patientenproben wurden mittels Restriktionsverdau auf den SNP rs754615 typisiert. Die PCR Produkte wurden nach der Amplifikation und dem Verdau durch das Restriktionsenzym *Bco*DI auf ein 2% Agarosegel geladen. Das Agarosegel stellt repräsentativ das Ergebnis des Verdau nach elektrophoretischer Trennung dar. Aufgrund der durch den Verdau entstandenen unterschiedlich langen DNA Fragmente ließ sich der Genotyp anhand der Anzahl und der Position der Banden feststellen. Jede der zehn abgebildeten Patientenproben wies Banden der erwarteten Höhe auf. Sieben davon mit Banden, die auf den Genotyp GC rückschließen ließen. Zwei Proben zeigten nur eine 168bp lange Bande, was dem Genotyp GG entspricht. Bei einer Probe war nur eine Bande mit einer Länge von 132bp zu erkennen. Diese entspricht dem Genotyp CC. Die erwarteten Banden mit einer Länge von 36bp sind in diesem Fall aufgrund der zu geringen Bandenintensität und langen Laufstrecke (vgl. pUC Marker) nicht sichtbar. Die Negativkontrolle zeigt keine Bande. Marker: pUC19/MspI, Fermentas GmbH, St. Leon Rot.

Aus Gruppen von ca. 80 typisierten Patientenproben wurden je drei Proben zur Verifizierung der Typisierungsergebnisse mittels Sequenzierung ausgewählt. Durch die Sequenzierung konnten die durch den Restriktionsverdau bestimmten Genotypen bestätigt werden. Mit Hilfe des in Tabelle 10 aufgeführten Serviceprogramms wurden aus den Typisierungsergebnissen die Allelfrequenzen für den SNP berechnet. In

Ergebnisse

Abbildung 32 ist die Häufigkeit der Genotypen graphisch dargestellt. Fast die Hälfte (49,73%) der Patienten wurden für den SNP rs754615 heterozygot typisiert. Mit einer Häufigkeit von 40,76% homozygoter Proben mit häufigerer Allelfrequenz und 9,51% homozygoter Proben mit seltenerer Allelfrequenz ergibt sich eine MAF von 0.344 (Tabelle 29). Im Vergleich zur MAF, die für diesen Polymorphismus in vorhergehenden Studien beobachtet wurde, ergibt sich eine Abweichung um 0.085. Aus den Typisierungsergebnissen wurde im nächsten Schritt berechnet, ob diese mit dem Hardy Weinberg Gesetz zu vereinbaren sind. Hierfür wurde der Chi-Quadrat Test durchgeführt. Bei einem $p = 0.050$ kann die Nullhypothese, dass die beobachtete Anzahl der Patienten für jeden Genotyp mit dem Hardy Weinberg Gleichgewicht vereinbar ist, unter dem verwendeten Signifikanzniveau von $p \geq 0.05$ beibehalten werden.

Tabelle 29: Übersicht der Genotypisierungsergebnisse für den SNP rs754615 mit Allelfrequenzen und daraus berechneter Vereinbarkeit mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht

Die Tabelle zeigt die Genotypisierungsergebnisse für den SNP rs754615, die mittels Restiktionsverdau ermittelt wurden. Zum Vergleich ist die nach dem Hardy Weinberg Gesetz zu erwartende Anzahl an Patienten für die einzelnen Genotypen aufgeführt. Aus der beobachteten Anzahl an Patienten wurden die Allelfrequenzen berechnet. Um zu prüfen, ob diese mit dem Hardy Weinberg Gleichgewicht vereinbar sind, wurde mit Hilfe des Hardy Weinberg Rechners (Tabelle 10) der Chi-Quadrat Wert errechnet. Dabei ergab sich $p = 0.050$. Dieser Wert ist mit dem HWG vereinbar.

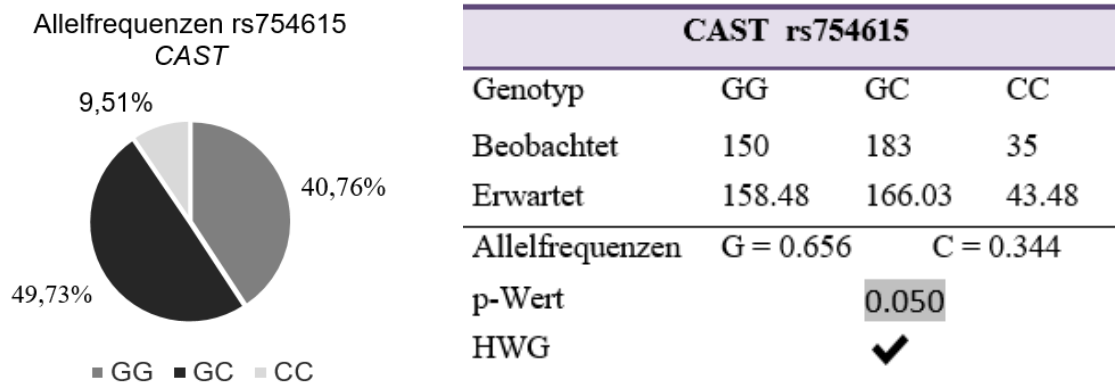


Abbildung 32: Übersicht der relativen Häufigkeit der Genotypen für den SNP rs754615 im CAST Gen

Die Ergebnisse der Genotypisierung wurden zur besseren Übersicht graphisch dargestellt. Die Häufigkeit der einzelnen Genotypen wurde in relativen Zahlen angegeben. Mit 49,73% ist der Anteil der Patienten, die heterozygot sind, am größten. Der Genotyp homozygot mit häufigerer Allelvariante zeigte sich bei 40,76% aller getesteten Patienten während der Genotyp homozygot mit seltenerer Allelvariante bei 9,51% der Patienten vorkam.

5.4 Überprüfen des Einflusses der SNPs auf das Erkrankungsalter der SCA3 Patienten

Aus vorhergehenden Studien ist bekannt, dass die Anzahl der CAG-Wiederholungen im *ATXN3*-Gen direkten Einfluss auf das Erkrankungsalter der SCA3-Patienten nimmt (Maciel et al. 1995; Schöls et al. 1996). Die Patienten erkranken umso früher, je länger der CAG-Abschnitt ist. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass die Anzahl der CAG-Wiederholungen nur etwa 45%-55% zum Erkrankungsalter beiträgt (van de Warrenburg et al. 2005). Viele weitere Faktoren, die das Erkrankungsalter beeinflussen, sind bislang unbekannt.

Im folgenden soll überprüft werden, ob die in dieser Arbeit selektierten Polymorphismen in den nukleozytoplasmatischen Transportproteinen sowie in den Proteinen, die an der Proteolyse von Ataxin-3 beteiligt sind, einen Beitrag zum Erkrankungsalter der SCA3-Patienten leisten. Von allen Proben, die im Rahmen des EUROSCA-Konsortiums von SCA3-Patienten gesammelt wurden, waren die klinischen Daten wie bspw. das Erkrankungsalter bekannt. Das Erkrankungsalter der untersuchten SCA3 Patienten reichte von 10 bis 78 Jahre, dadurch ergibt sich ein durchschnittliches Erkrankungsalter (Age at onset = AAO) dieser Patienten von 39,45 Jahren bei einer durchschnittlichen Anzahl der CAG-Wiederholungen von 70,73 (von 50 bis 83).

Für die nachfolgenden Analysen zum Einfluss der untersuchten Polymorphismen auf das Erkrankungsalter wurde das Statistikprogramm JMP V.12.0 verwendet. Hierzu wurde eine Kovarianzanalyse durchgeführt. Als kontinuierlicher Einflussfaktor wurde die CAG-Repeat Länge gewählt, als nominaler Einflussfaktor die Gruppeneinteilung des Polymorphismus sowie die Wechselwirkung aus diesen beiden Faktoren.

Einige der SCA3 Patienten, deren Daten im Rahmen des EUROSCA-Konsortiums gesammelt wurden, stammen aus einer Familie. Die Familienzugehörigkeit war in der Datenbank hinterlegt. Daher konnten die Berechnungen unter Berücksichtigung der Familienzugehörigkeit als Gewichtungsfaktor erfolgen. Der Gewichtungsfaktor errechnete sich aus eins geteilt durch die Anzahl der Familienmitglieder der jeweiligen Familie.

5.4.1 Überprüfen des Einflusses des SNP rs7146310 in *IPO4* Exon 16 auf das Erkrankungsalter der SCA3

Der SNP rs7146310 im *IPO4* Gen führt durch den Austausch der Base Guanin durch die Base Adenin zu einer Missense-Mutation. Durch das High Resolution Melting im Lightcycler 480 konnten 419 Patientenproben für diesen SNP typisiert werden. Die Ergebnisse der Typisierung ließen sich mit dem Hardy Weinberg Gesetz vereinbaren. Durch die Analyse der hinterlegten Daten zum Erkrankungsalter dieser Patienten konnte das durchschnittliche AAO der drei Genotypen gegenüber gestellt werden. In Abbildung 33 ist das durchschnittliche Erkrankungsalter mit Standardfehler der untersuchten SCA3 Patienten für den Polymorphismus im Importin 4 abgebildet.

Die statistische Auswertung mittels zweizeitigem t-test ergab für den SNP rs7146301 im *IPO4* Gen signifikante Unterschiede zwischen dem Erkrankungsalter der drei Genotypen. Während Patienten mit dem Genotyp GG mit durchschnittlich 43,64 Jahren erkranken, liegt das durchschnittliche Erkrankungsalter der Patienten mit dem Genotyp GA (39,05 Jahre) sowie dem Genotyp AA (30,97 Jahre) deutlich darunter ($p=0,0010$ beziehungsweise $p<0,0001$).

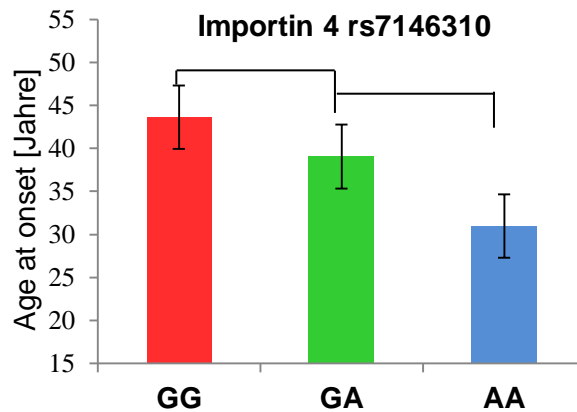


Abbildung 33: Mittleres Erkrankungsalter der SCA3 Patienten unterschieden nach dem Genotyp des SNP rs7146310 im Importin 4 Gen, Exon 16

Durchschnittliches Erkrankungsalter der untersuchten SCA3 Patienten mit heterozygotem Genotyp im Vergleich zu den homozygoten. Dargestellt ist der Median mit jeweiligem Standardfehler. Das durchschnittliche Erkrankungsalter der Patienten mit dem Genotyp GG liegt bei 43,64 Jahren, das der Patienten mit dem Genotyp GA bei 39,05 Jahren respektive 30,97 Jahren für den Genotyp AA. Der zweiseitige t-test ergab signifikante Unterschiede sowohl zwischen dem heterozygoten Genotyp im Vergleich zur häufigeren homozygoten Allelvariante ($p=0,0010$) als auch im Vergleich zur selteneren homozygoten Variante ($p<0,0001$).

Ergebnisse

Um eine allgemeingültige Aussage über den Einfluss des SNP zusätzlich zur Anzahl der CAG-Wiederholungen auf das Erkrankungsalter der SCA3 Patienten treffen zu können, wurde eine Kovarianzanalyse mit der Gruppeneinteilung des Genotyps als nominalem Einflussfaktor durchgeführt. Abbildung 34 zeigt das Ergebnis dieser Berechnung in Form eines Regressionsdiagramms.

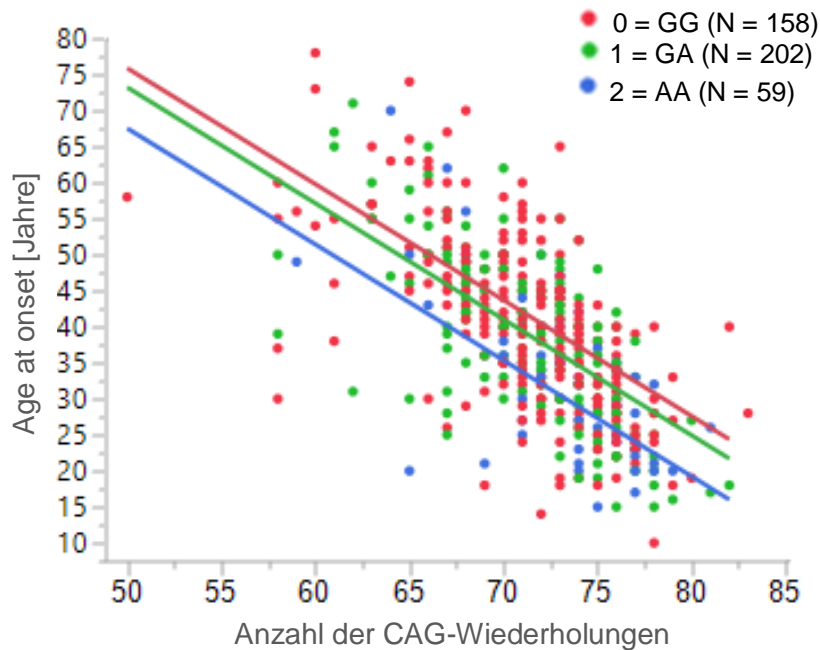


Abbildung 34: Korrelation zwischen der Anzahl der CAG-Wiederholungen und dem Erkrankungsalter der SCA3 Patienten in Bezug auf die Genotypen des SNP rs7146310 im Importin 4 Gen, Exon 16

Die Anzahl der CAG-Wiederholungen im *ATXN3* Gen korreliert invers mit dem Auftreten der ersten Symptome der SCA3 Patienten. Der Genotyp für den SNP rs7146310 hat einen zusätzlichen, signifikanten Einfluss auf das Erkrankungsalter. Patienten (N = Anzahl der typisierten Patienten) mit dem Genotyp AA (blau) erkranken durchschnittlich 12,67 Jahre früher, als Patienten mit dem Genotyp GG (rot). Der SNP erklärt damit 2,94% der Varianz des Erkrankungsalters der SCA3.

In unserer Kohorte von 492 SCA3 Patienten erklärt die Anzahl der CAG-Wiederholungen das Erkrankungsalter zu 43% ($R^2 = 0,432$) und hat damit den stärksten bisher bekannten Einfluss auf den Krankheitsbeginn ($p < 0,0001$). In der Kovarianzanalyse konnte gezeigt werden, dass der SNP rs7146310 einen zusätzlichen hochsignifikanten Effekt auf das Erkrankungsalter der SCA3 Patienten hat ($p < 0,0001$). SCA3 Patienten, die homozygot für die seltenere Variante des SNP sind, entwickeln

Ergebnisse

bereits mit durchschnittlich 30,97 Jahren die ersten Symptome. Das ist im Schnitt 8-13 Jahre früher als bei Patienten, die einen der anderen beiden Genotypen tragen. Insgesamt begründet der Polymorphismus rs7146310 damit 2,94% der Varianz des Erkrankungsalters, die nicht durch die CAG Repeatlänge erklärt werden kann. In Tabelle 30 ist der signifikante Effekt des SNP auf das Erkrankungsalter der SCA3 in der Übersicht dargestellt. Bei Kenntnis des Genotyps eines Patienten für diesen SNP lässt sich das Auftreten der Erstsymptome demnach näherungsweise mit der Formel in Abbildung 35 bestimmen. An einem Beispiel für einen Patienten mit 70 CAG-Wiederholungen wurde das Erkrankungsalter für die drei möglichen Genotypen berechnet. Demnach würde ein Patient mit 70 CAG-Wiederholungen und dem Genotyp AA mit ca. 34,62 Jahren und damit 8,3 Jahre früher als ein Patient mit der gleichen Anzahl CAG-Wiederholungen und dem Genotyp GG erkranken.

	0 (GG) 3,67
AAO = -1,61 x Anzahl der CAG-Wiederholungen + 152	1 (GA) 1,01
	2 (AA) -4,68
<hr/>	
	$42,97 = (-1,61 \times 70) + 152 + 3,67$
	$40,31 = (-1,61 \times 70) + 152 + 1,01$
	$34,62 = (-1,61 \times 70) + 152 - 4,68$

Abbildung 35: Formel zur näherungsweisen Bestimmung des Erkrankungsalters bei Kenntnis der CAG-Wiederholungen und des Genotyps für den SNP rs7146310 in IPO4 Exon 16

Als Beispiel wurde die Formel für einen Patienten mit 70 CAG-Wiederholungen und den drei möglichen Genotypen gelöst. Für den Genotyp AA ergibt sich daraus ein Erkrankungsalter von ca. 34,62 Jahren. Während das die ersten Krankheitssymptome für den Genotyp GG 8,3 Jahre später zu erwarten sind.

Tabelle 30: Effekt des SNP rs7146310 im *IPO4*Ex16 auf das Erkrankungsalter der SCA3

Quelle	Freiheitsgrade	R ²	F-Wert	P-Wert
CAG Repeats	1	0.432	255,88	<0,0001
rs7146310 <i>IPO4</i> Ex16	2	0.461	11,85	<0,0001

5.4.2 Überprüfen des Einflusses des SNP rs11550452 in *IPO4* Exon 17 auf das Erkrankungsalter der SCA3

Im *IPO4* Gen konnten wir einen weiteren Polymorphismus identifizieren, der zu einer Missense-Mutation führt. Er befindet sich im Exon 17 und hat einen Aminosäureaustausch zwischen den zwei basischen, apolaren Aminosäuren Prolin und Alanin zur Folge. Die Genotypisierung mittels High Resolution Melting erfolgte für 440 Patientenproben. In der Chi-Quadrat Analyse konnte gezeigt werden, dass die Typisierungsergebnisse mit dem Hardy Weinberg Gesetz vereinbar sind. Die Bestimmung des durchschnittlichen Erkrankungsalters für die unterschiedlichen Genotypen erfolgte anhand der hinterlegten klinischen Daten. Die Abbildung 36 zeigt das durchschnittliche Auftreten der Erstsymptome bei den 440 getesteten Patienten für den Polymorphismus rs11550452.

Die statistische Auswertung mittels zweizeitigem t-test konnte für den SNP im *IPO4* Gen keinen signifikanten Unterschied des Erkrankungsalters der verschiedenen Genotypen zeigen. Patienten mit dem Genotyp CC erkranken mit durchschnittlich 41,34 Jahren und damit unwesentlich später als Patienten mit dem Genotyp CG (39,36 Jahre). Patienten mit der selteneren homozygoten Allelvariante GG erkranken mit 36,97 Jahren im Mittel 4,37 Jahre früher als Patienten mit der häufigeren homozygoten Allelvariante. Dieser Unterschied erwies sich im zweiseitigen t-test jedoch nicht als signifikant ($p=0,0787$).

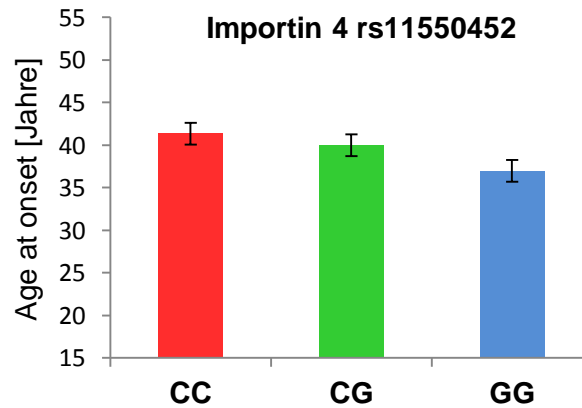


Abbildung 36: Mittleres Erkrankungsalter der SCA3 Patienten unterschieden nach dem Genotyp des SNP rs11550452 im Importin 4 Gen, Exon 17

Durchschnittliches Erkrankungsalter der SCA3 Patienten unterschieden nach Genotyp für den SNP in Importin 4 Exon 17. Dargestellt ist der Median mit jeweiligem Standardfehler. Das durchschnittliche AAO der Patienten mit dem Genotyp CC liegt mit 41,34 Jahren am höchsten. Für die Genotypen CG und GG konnten AAOs von 39,36 bzw. 36,97 Jahren ermittelt werden. Im zweiseitigen t-test konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Erkrankungsalter der Patienten mit unterschiedlichen Genotypen festgestellt werden ($p \geq 0,0787$).

In einer Kovarianzanalyse wurde der gemeinsame Effekt des SNP in *IPO4* Ex17 und der Anzahl der CAG-Wiederholungen auf das Erkrankungsalter der SCA3 untersucht. Die Korrelation zwischen der Anzahl der CAG-Wiederholungen und dem mittleren AAO in Bezug auf die verschiedenen Genotypen wird in Abbildung 37 dargestellt.

Wie schon für den SNP im *IPO4* Ex16 Gen ergab die Kovarianzanalyse einen signifikanten p-Wert ($p=0,0157$) für den gemeinsamen Einfluss mit der Anzahl der CAG-Wiederholungen. In diesem Fall erklärt der SNP sogar 3,38% der Varianz des Erkrankungsalters, die nicht durch die Anzahl der CAG-Wiederholungen erklärt werden kann.

Ergebnisse

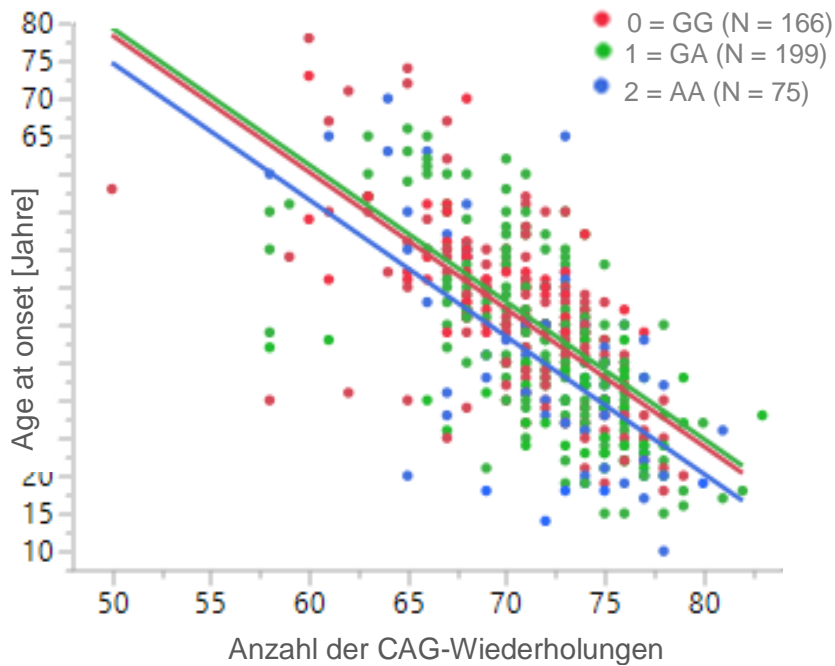


Abbildung 37: Korrelation zwischen der Anzahl der CAG-Wiederholungen und dem Erkrankungsalter der SCA3 Patienten in Bezug auf die Genotypen des SNP rs11550452 im Importin 4 Gen, Exon 17

Es zeigt sich die bekannte inverse Korrelation zwischen der Anzahl der CAG-Wiederholungen im *ATXN3* Gen und dem Auftreten der ersten Symptome bei SCA3 Patienten (N = Anzahl der typisierten Patienten). Der SNP rs11550452 hat einen zusätzlichen, signifikanten Einfluss auf das Erkrankungsalter. Patienten mit dem Genotyp AA erkranken demnach deutlich früher als Patienten die heterozygot für den SNP sind.

Dabei führt ein homozygoter Genotyp für die seltenere Variante zu einem deutlich früheren Auftreten der Erstsymptome. In der

Tabelle 31 ist der signifikante Effekt des SNP auf das Erkrankungsalter der SCA3, in der Übersicht dargestellt. Bei Kenntnis des Genotyps für diesen SNP lässt sich das Auftreten der Erstsymptome demnach näherungsweise mit folgender Formel bestimmen:

$$\text{AAO} = -1,81 \times \text{Anzahl der CAG-Wiederholungen} + 168$$

0 (CC)	0,89
1 (CG)	1,87
2 (GG)	-2,76

Abbildung 38: Formel zur näherungsweisen Bestimmung des Erkrankungsalters bei Kenntnis der CAG-Wiederholungen und des Genotyps für den SNP rs11550452 in *IPO4Ex17*

Tabelle 31: Effekt des SNP rs11550452 im *IPO4Ex17* auf das Erkrankungsalter der SCA3

Quelle	Freiheitsgrade	R ²	F-Wert	P-Wert
CAG Repeats	1	0.438	308,65	<0,0001
rs11550452 <i>IPO4Ex17</i>	2	0.466	4,20	0,0157

5.4.3 Überprüfen des Einflusses des SNP rs205384 in *XPO6* auf das Erkrankungsalter der SCA3

Der SNP im *XPO6* Gen ist mit einer MAF von 0.184 der seltenste der untersuchten Polymorphismen. Er führt zu einer Transversion von Guanin zu Adenin. Diese Missense-Mutation bewirkt einen Aminosäureaustausch der geladenen, basischen Aminosäure Histidin zur ungeladenen Aminosäure Glutamin. Im High Resolution Melting wurden 435 Patienten typisiert. Die Chi-Quadrat Analyse konnte die Vereinbarkeit der Ergebnisse mit dem Hardy Weinberg Gesetz beweisen. Das durchschnittliche Erkrankungsalter der Patienten für die unterschiedlichen Genotypen erfolgte anhand der hinterlegten Daten aus dem EUROSCA-Konsortium. Die Abbildung 39 zeigt das durchschnittliche Erkrankungsalter der SCA3 Patienten bei Erstmanifestation für den Polymorphismus rs205384.

Die statistische Untersuchung des AAOs mittels zweiseitigem t-test zeigte für diesen SNP einen signifikanten Unterschied ($p=0,0013$) zwischen dem Genotyp GG mit einem durchschnittlichen AAO von 40,98 Jahren und dem Genotyp AA bei welchem das durchschnittliche Erkrankungsalter bei 34,00 Jahren liegt. Mit einem medianen AAO von 39,47 Jahren liegt das Erkrankungsalter der Patienten mit dem Genotyp GA zwischen dem der beiden Homozygoten Varianten.

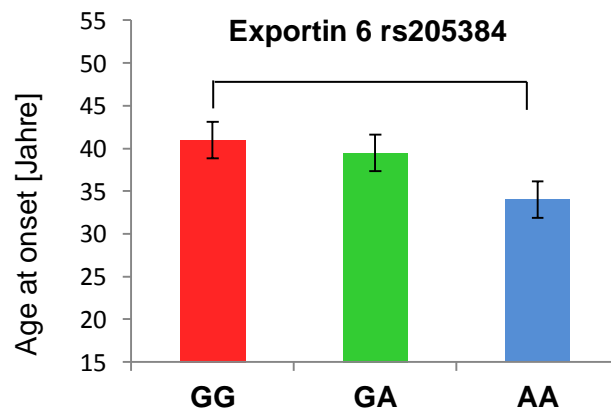


Abbildung 39: Mittleres Erkrankungsalter der SCA3 Patienten unterschieden nach dem Genotyp des SNP rs205384 im Exportin 6 Gen

Durchschnittliches Erkrankungsalter der untersuchten SCA3 Patienten verglichen nach dem Genotyp für den SNP in *XPO6*. Dargestellt ist der Median mit jeweiligem Standardfehler. Das AAO für die Patienten mit dem Genotyp GG lag im Mittel bei 40,98 Jahren. Das AAO der Patienten mit dem Genotyp AA lag im Mittel bei 34,00 Jahren und ist damit signifikant niedriger ($p=0,0013$). Im Vergleich zu dem AAO der Patienten mit dem Genotyp GA ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen ($p=0,1568$).

Zur Beurteilung des Einflusses des SNP zusätzlich zur Anzahl der CAG-Wiederholungen auf das Erkrankungsalter wurde auch für diesen SNP eine Kovarianzanalyse durchgeführt. Die Korrelation zwischen der Anzahl der CAG-Wiederholungen und dem mittleren AAO bezogen auf die drei Genotypen wird in Abbildung 40 dargestellt.

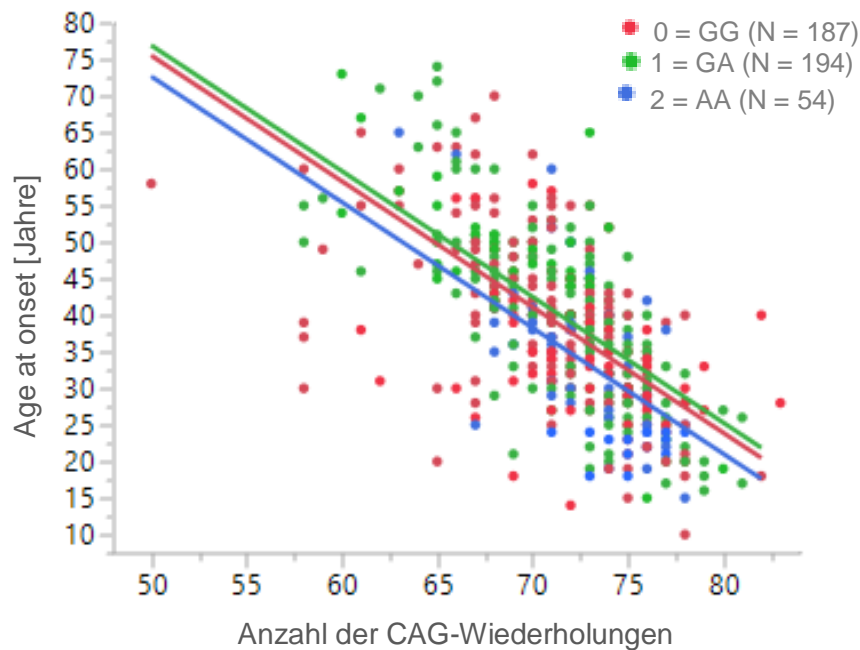


Abbildung 40: Korrelation zwischen der Anzahl der CAG-Wiederholungen und dem Erkrankungsalter der SCA3 Patienten in Bezug auf die Genotypen des SNP rs205384 im Exportin 6 Gen

Die Anzahl der CAG-Wiederholungen im *ATXN3* Gen korreliert invers mit dem Auftreten der ersten Symptome bei SCA3 Patienten. Die Abbildung zeigt den zusätzlichen signifikanten Effekt des SNP rs205384 auf das Erkrankungsalter. Insgesamt wurden 453 Patienten typisiert (N = Anzahl der typisierten Patienten für den jeweiligen Genotyp).

Auch in diesem Fall ergab die Kovarianzanalyse einen signifikanten Effekt des SNP zusätzlich zur Anzahl der CAG-Wiederholungen auf das Erkrankungsalter der SCA3 Patienten ($p=0,0242$). Die seltenere homozygote Allelvariante AA führt dabei zu einem früheren Auftreten der Krankheitssymptome. Der SNP erklärt 0,76% der Varianz des Erkrankungsalters, die nicht anhand der Anzahl der CAG Wiederholungen erklärt werden kann. Die

Tabelle 32 zeigt den signifikanten Effekt des SNP auf das Erkrankungsalter der SCA3. Bei Kenntnis des Genotyps für diesen SNP lässt sich das Auftreten der Erstsymptome demnach näherungsweise mit folgender Formel bestimmen:

$$AAO = -1,72 \times \text{Anzahl der CAG-Wiederholungen} + 161$$

0 (GG)	0,49
1 (GA)	1,88
2 (AA)	-2,37

Abbildung 41: Formel zur näherungsweise Bestimmung des Erkrankungsalters bei Kenntnis der CAG-Wiederholungen und des Genotyps für den SNP rs205384 in XPO6

Tabelle 32: Effekt des SNP rs205384 im XPO6 Gen auf das Erkrankungsalter der SCA3

Quelle	Freiheitsgrade	R ²	F-Wert	P-Wert
CAG Repeats	1	0.432	273,36	<0,0001
rs205384 XPO6	2	0.440	3,76	0,0242

5.4.4 Überprüfen des Einflusses des SNP rs205384 in CAST auf das Erkrankungsalter der SCA3

Im *CAST* Gen, welches für den endogenen Calpaininhibitor Calpastatin codiert, konnte der SNP rs754615 identifiziert werden. Dieser SNP führt durch eine Missense-Mutation zu einem Austausch der polaren Aminosäuren Cystein und Serin. Für den SNP im *CAST* Gen konnte kein High Resolution Melting Ansatz zur Genotypisierung etabliert werden. Es wurde daher der Restriktionsverdau mit der Restriktionsendonuklease *BcoDI* als Methode zur Typisierung gewählt. Auf diese Weise konnten 368 Patientenproben genotypisiert werden. Die Ergebnisse der Typisierung ließen sich mit dem Hardy Weinberg Gesetz vereinbaren. Für die drei Genotypen wurde das durchschnittliche Erkrankungsalter der SCA3 mit Hilfe der im Rahmen des EUROSCA-Konsortiums hinterlegten Daten berechnet. In Abbildung 42 ist das durchschnittliche Erkrankungsalter mit Standardfehler der getesteten SCA3 Patienten für den SNP rs754615 abgebildet.

Die statistische Auswertung mittels zweiseitigem t-test ergab keinen signifikanten Unterschied im Erkrankungsalter für den SNP im Calpastatin Gen ($p \geq 0,167$). Patienten

Ergebnisse

mit dem Genotyp GG erkranken mit durchschnittlich 36,73 Jahren. Das Erkrankungsalter der Patienten mit dem Genotyp CC liegt mit durchschnittlich 37,31 Jahren etwas höher, während die Patienten mit heterozygotem Genotyp am spätesten erkranken (40,65 Jahre).

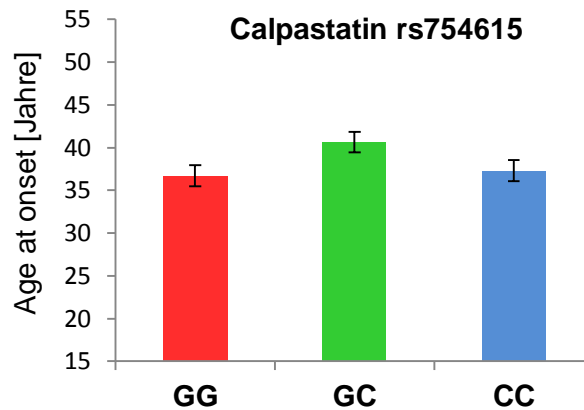


Abbildung 42: Mittleres Erkrankungsalter der SCA3 Patienten unterschieden nach dem Genotyp des SNP rs754615 im *CAST* Gen

Durchschnittliches Erkrankungsalter der untersuchten SCA3 Patienten in Bezug auf den SNP in Calpastatin. Dargestellt ist der Median mit jeweiligem Standardfehler. Patienten mit heterozygotem Genotyp erkranken mit durchschnittlich 40,65 Jahren. Damit besteht kein wesentlicher Unterschied zu dem Erkrankungsalter der homozygoten Patienten (36,73 Jahre und 37,31 Jahre).

Mit Hilfe der Kovarianzanalyse mit der Gruppenzuordnung nach Genotyp als nominalen Einflussfaktor kann eine Aussage über den Einfluss des SNP zusätzlich zu der Anzahl der CAG Wiederholungen auf das Erkrankungsalter der SCA3 getroffen werden. Abbildung 43 zeigt das Regressionsdiagramm dieser Analyse für den SNP rs754615.

Ergebnisse

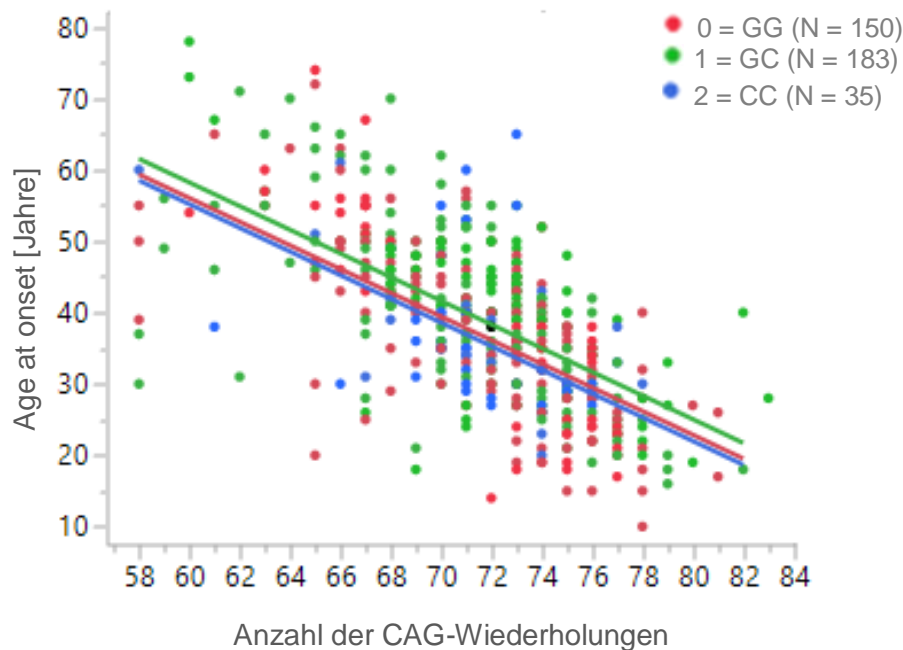


Abbildung 43: Korrelation zwischen der Anzahl der CAG-Wiederholungen und dem Erkrankungsalter der SCA3 Patienten in Bezug auf den Genotyp des SNP rs754615 im *CAST* Gen

Die Ersten Symptome der SCA3 Patienten treten umso früher auf, je mehr CAG-Wiederholungen das Ataxin-3 trägt. Die CAG-Repeatlänge korreliert demnach negativ mit dem Erkrankungsalter. Das Regressionsdiagramm zeigt den zusätzlichen Einfluss des SNP im *CAST* Gen auf das Erkrankungsalter der SCA 3 Patienten (N = Anzahl der typisierten Patienten). Der SNP beeinflusst das Erkrankungsalter nicht signifikant.

In der Kovarianzanalyse konnte gezeigt werden, dass der SNP rs754615 als Einziger der bisher betrachteten SNPs keinen signifikanten Effekt auf Erkrankungsalter der SCA3 Patienten zusätzlich zu der Anzahl der CAG-Wiederholungen hat ($p = 0,0787$). In Tabelle 33 ist der Effekt des SNP auf das Erkrankungsalter der SCA3 in der Übersicht dargestellt.

Tabelle 33: Effekt des SNP rs754615 im *CAST* Gen auf das Erkrankungsalter der SCA3

Quelle	Freiheitsgrade	R ²	F-Wert	P-Wert
CAG Repeats	1	0.430	211,98	<0,0001
rs754615 <i>CAST</i>	2	0.444	2,56	0,0787

Auf eine statistische Analyse des SNPs im CAPN2 Gen wurde verzichtet, da die Genotypisierungsergebnisse nicht mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz vereinbar waren.

Ergebnisse

Ein valider Effekt auf das AAO der SCA3 durch diesen SNP war demnach nicht zu erwarten.

5.5 Zusammenfassende Betrachtung

Das Ziel dieser Arbeit war es, SNPs zu identifizieren, die zusätzlich zu der Anzahl der CAG-Wiederholungen einen Effekt auf das Erkrankungsalter der SCA3 nehmen könnten, und deren Einfluss zu bestimmen.

Dazu wurde das Kollektiv von 492 SCA3-Patienten auf SNPs untersucht, die in Genen liegen, welche für Proteine des nukleozytoplasmatischen Transports oder Enzyme, die an der Proteolyse von Ataxin-3 beteiligt sind, codieren.

Es konnten dabei sechs vielversprechende Polymorphismen, die eine funktionelle Auswirkung auf die Proteinaktivität vermuten ließen, identifiziert werden. Die identifizierten SNPs liegen in Genen, die für die Transportproteine Importin 4, Exportin 6 und Importin subunit alpha-1 codieren. In den an der proteolyse von Ataxin-3 beteiligten Enzymen konnten SNPs in Calpain 2 sowie in dessen endogenem Inhibitor Calpastatin identifiziert werden.

Für eine erfolgreiche Typisierung erfolgte zunächst die Etablierung der High-Resolution-Melting Bedingungen sowie eine Optimierung des Laufzeitprotokolls. Dabei konnte für den SNP im *IPO4* Ex 17 ein HRM Ansatz mit unmarkierter Hybridisierungssonde etabliert werden. Die SNPs in *IPO4* Ex 16, *XPO6*, *KPNA2* und *CAPN2* wurden mittels klassischem HRM typisiert. Für den SNP im *CAST* Gen wurden die Proben mittels Restriktionsverdau genotypisiert. Anhand der etablierten Methoden konnte im Folgenden eindeutig der Nachweis der SNPs in der Normalbevölkerung sowie in den 492 Patientenproben erbracht werden.

Die anschließend durchgeführte Chi-Quadrat Analyse konnte die Vereinbarkeit mit dem Hardy-Weinberg Gesetz für die SNPs in *IPO4*, *XPO6* und *CAST* beweisen. Die erhobenen Allelfrequenzen des SNP im *CAPN2* Gen stimmten nicht mit dem HWG überein. Die Genotypisierung für den SNP im *KPNA2* Gen ergab ausschließlich heterozygote Proben. An dieser Stelle wird eine paraloge DNA Region vermutet.

Ergebnisse

Für die anschließende Analyse zum Einfluss der SNPs auf das Erkrankungsalter der SCA3 wurde ein ein- und zweiseitiger t-test durchgeführt. Die Bestimmung der Unterschiede des AAO ergab signifikante Werte für den SNP rs7146310 in *IPO4* Ex16 und den SNP rs205384 in *XPO6*.

Um den Effekt der SNPs auf das Erkrankungsalter zusätzlich zu der Anzahl der CAG-Wiederholungen zu bestimmen, wurde eine Kovarianzanalyse mit der Anzahl der CAG-Wiederholungen als kontinuierlichen und der Gruppeneinteilung des SNP als nominalem Einflussfaktor durchgeführt. Die Berechnungen erfolgten unter Berücksichtigung der Familienzugehörigkeit in Form eines Gewichtungsfaktors. Die Analyse ergab einen signifikanten Einfluss der zwei SNPs in Importin 4 sowie des SNPs in Exportin 6 auf das Erkrankungsalter der SCA3 zusätzlich zu der Anzahl der CAG-Wiederholungen. Dabei führt ein homozygoter Genotyp für das seltene Allel jeweils zu einer drastischen Verringerung des Auftretens erster Krankheitssymptome.

Welchen Einfluss die SNPs in diesen nukleozytoplasmatischen Transportproteinen auf die Pathogenese der SCA3 haben könnten, wird in Kapitel 6 betrachtet.

Tabelle 34: Übersicht der identifizierten Gene mit Genotypisierungsergebnissen und deren Einfluss auf das AAO der SCA3

Identifiziertes Gen	SNP	AA	Genotypen mit (MAF)	Etablierte Methode	Typisierte Patienten	Vereinbarkeit HWG	Ø AAO	Effekt AAO	
<i>IPO4</i>	rs7146310	Ala → Val	GG	HRM	37,71 %	✓	43,64	p < 0,0001	
			GA (A = 0,297)		48,21 %		39,05		2,94 %
			AA		14,08 %		30,97		
<i>IPO4</i>	rs11550452	Pro → Ala	GG	HRM mit Sonde	37,73 %	✓	41,34	p = 0,0157	
			GC (C = 0,302)		45,23 %		39,36		3,38 %
			CC		17,04 %		36,97		
<i>XPO6</i>	rs205384	His → Gln	GG	HRM	42,99 %	✓	40,98	p = 0,0242	
			GA (A = 0,184)		44,60 %		39,44		0,76 %
			AA		12,41 %		34,00		
<i>CAST</i>	rs754615	Cys → Ser	GG	RV	40,76 %	✓	40,65	p = 0,0787	
			GC (C = 0,299)		49,73 %		37,31		
			CC		9,51 %		36,73		
<i>CAPN2</i>	rs17599	Lys → Gln	AA	HRM	69,01 %	X			
			AC (C = 0,213)		25,12 %				
			CC		5,87 %				
<i>KPNA2</i>	rs1059558	Gly → Ser	GG	HRM	0	Paraloge DNA Region			
			GA (A = 0,465)		100 %				
			AA		0				

6. Diskussion

Ein chronisch progredienter Verlust von Nervenzellen ist charakteristisch für die Gruppe der neurodegenerativen Erkrankungen (Sitzer, 2011). Zu diesen Erkrankungen zählt die Spinozerebelläre Ataxie Typ 3, die häufigste autosomal dominant vererbte Ataxie. Die klinische Symptomatik beruht dabei auf einem ausgeprägten Nervenzelluntergang im Bereich des Kleinhirns (Dürr et al. 1996; Yamada et al. 2001). Bisher ist keine wirksame medikamentöse Therapie verfügbar. Die Patienten versterben daher aufgrund der Unaufhaltsamkeit der Symptome nach durchschnittlich 21 Jahren an der Erkrankung (Kieling et al. 2007). Der Krankheitsbeginn unterliegt jedoch einer großen Varianz und kann zwischen 7 und 80 Jahren liegen (Carvalho et al. 2008).

Das Erkrankungsalter und die Progredienz der SCA3 werden hauptsächlich durch die Anzahl der CAG-Wiederholungen im *ATX3* Gen bestimmt, welche für einen Polyglutaminbereich codieren (van de Warrenburg et al. 2002). Die meisten Patienten tragen Wiederholungseinheiten von mehr als 51 CAGs und zeigen erste Symptome im mittleren Erwachsenenalter (Maciel et al. 2001; Lima et al. 2005; Dürr et al. 1996). Eine hohe Zahl der CAG-Wiederholungen ist dabei mit einem früheren Erkrankungsalter assoziiert (Schöls et al. 1996; Maciel et al. 1995). Die Varianz des AAO ist jedoch hoch und wird von weiteren genetischen Faktoren beeinflusst.

Aufgrund der hohen Variabilität der klinischen Ausprägung ist die Erkrankung vor allem in frühen Stadien klinisch schwer zu diagnostizieren. Es fehlen spezifische Symptome. Die Beurteilung des "Erkrankungsalters" stellt daher eine Herausforderung dar, die so präzise wie möglich angegangen werden muss. Meistens beobachten die Verwandten der Betroffenen die ersten Anzeichen der Erkrankung und legen damit den Krankheitsbeginn fest (Franca et al. 2012). Diese initialen Symptome sind jedoch meist subtil und sehr heterogen (Lima and Coutinho 1980). Auch wenn in den meisten Arbeiten das Auftreten der Gangataxie als Erkrankungsbeginn festgelegt wird, existiert keine exakte Definition. Studien zum Zelluntergang in den betroffenen Hirnregionen konnten zeigen, dass dieser neben den motorischen Symptomen auch zu kognitiven Defiziten führt (Ma et al. 2014; Giocondo and Curcio 2017). Daher müsste eine exakte

Methode zur Bestimmung des Erkrankungsalters motorische und kognitive Symptome erfassen. Eine Verbesserung der Bestimmung des AAO kann nur durch prospektive Studien in genetisch getesteten Risikopatienten erreicht werden. Das den Studien zur SCA3 zu Grunde liegende Erkrankungsalter ist demnach ein individueller Wert, festgelegt als "Auftreten der Erstsymptome". Aus medizinischer Sicht könnte dieser Zeitpunkt auch Jahre früher oder später liegen.

6.1 Selektion von Kandidatengen und Identifizierung der SNPs

Einige Studien wurden zur Suche genetischer Modifikatoren der SCA3 durchgeführt (Peng et al. 2014; Bettencourt et al. 2011; Bilen and Bonini 2007). Dabei wurden bereits verschiedene Polymorphismen identifiziert, die einen Einfluss auf das Erkrankungsalter der SCA3 haben (Schmidt et al., 2012, (Peng et al. 2014). Auch für andere Polyglutaminerkrankungen wie bspw. die Chorea Huntington konnte der Einfluss von SNPs in Genen, die für an der Pathogenese beteiligte Proteine codieren auf das Erkrankungsalter beschrieben werden (Metzger, Bauer, Tomiuk, Laccone, Didonato, Gellera, Soliveri, et al. 2006; Metzger, Bauer, Tomiuk, Laccone, Didonato, Gellera, Mariotti, et al. 2006).

6.1.1 Es konnten 29 Kandidatengene selektiert werden

Die Erweiterung des Polyglutamin Abschnitts in Ataxin-3 führt zu veränderten Interaktionen mit Proteinen die bspw. an der Proteolyse von Ataxin-3 beteiligt sind. Ein expandierter Polyglutaminbereich beeinflusst damit die Funktion von Ataxin-3 und der mit Ataxin-3 interagierenden Proteine. Diese Proteine sind somit Kandidaten auf der Suche nach Krankheitsmodifikatoren.

Die Aggregation der Polyglutaminfragmente des mutierten Ataxin-3 stellt einen der wichtigsten pathogenetischen Faktoren der SCA3 dar. Obwohl die Rolle der nukleären Einschlusskörperchen kontrovers diskutiert wird (Teixeira-Castro et al. 2011; Shao and Diamond 2007), ist klar, dass die Entstehung der N-terminalen Polyglutamin Fragmente durch Proteolyse ein Mediator in der Neuropathogenese der SCA3 ist (Haacke et al. 2006; Hubener et al. 2013; Evers, Toonen, and van Roon-Mom 2014). Eine Reihe von Studien zeigen, dass Calpaine eine wichtige Funktion in der Proteolyse des Ataxin-3

besitzen und aufgrund des Einflusses auf die Ausbildung der nukleären Einschlusskörperchen möglicherweise eine Rolle in der Entstehung der SCA3 spielen (Evers, Toonen, and van Roon-Mom 2014; Hubener et al. 2013; Haacke et al. 2006; Berke et al. 2004; Koch et al. 2011). Verschiedene Proteine, welche an der Proteolyse von Ataxin-3 beteiligt sind, wurden bereits mit der Pathogenese der SCA3 in Verbindung gebracht (Berke et al. 2004; Haacke, Hartl, and Breuer 2007).

Mehrere Studien haben den Zellkern als vorherrschende Lokalisation der Pathogenese der SCA3 identifiziert (Bichelmeier et al. 2007). Die Ergebnisse von Bichelmeier und Kollegen implizieren, dass Defekte des nukleozytoplasmatischen Transports in engem Zusammenhang mit der Pathologie und neuronalen Spezifität stehen. Sowa und Kollegen konnten das kürzlich für das Karyopherin KPNA3 beweisen. In vivo sowie in vitro konnten sie zeigen, dass die intrazelluläre Lokalisation und damit Aggregation von Ataxin-3 maßgeblich von KPNA3 beeinflusst wird (Sowa et al. 2018). Es liegt nahe, dass es weitere Faktoren den nukleozytoplasmatischen Transport von Ataxin-3 bestimmen. Es galt daher herauszufinden, ob in Genen, die für nukleozytoplasmatische Transportproteine kodieren, SNPs mit Einfluss auf das Erkrankungsalter der SCA3 zu finden sind.

Entsprechend dieser Überlegung konnten 29 Gene selektiert werden, die in unsere Untersuchung auf relevante SNPs eingeschlossen werden sollten. Wir haben Polymorphismen in Genen, die für proteolytische Enzyme und Transportproteine kodieren und damit direkt mit Ataxin-3 interagieren oder als Modifikatoren in vorhergehenden Studien beschrieben wurden, analysiert.

6.1.2 Es konnten sechs SNPs in den Kandidatengenen identifiziert werden

Um zu überprüfen, ob in den Kandidatengenen SNPs liegen, wurden diese anhand festgelegter Kriterien überprüft. Dabei sollten nur SNPs in die Arbeit eingeschlossen werden, von denen ein relevanter Einfluss auf die Funktionalität des Proteins zu erwarten war. Aus diesem Grund war es notwendig, zunächst Kriterien für die Suche nach relevanten SNPs zu definieren. Genau wie in anderen Arbeiten zum Einfluss von SNPs auf das Erkrankungsalter neurodegenerativer Erkrankungen wurde der Mindestwert für die Häufigkeit des selteneren Allels (engl.: minor allele frequency,

MAF) des SNP auf ≥ 0.10 festgelegt (Schmidt et al., 2012; Metzger, Bauer, Tomiuk, Laccone, Didonato, Gellera, Mariotti, et al. 2006). Zudem ist es am wahrscheinlichsten, dass Missensemutationen, die einen Amniosaustausch zur Folge haben, am ehesten Einfluss auf die Funktionalität des Proteins nehmen.

Dabei mussten die festgelegten Kriterien bereits durch vorhergehende Studien, wie beispielsweise das HapMap Projekt, bestätigt sein. Wobei nur SNPs in diese Arbeit eingeschlossen wurden, die in Mitteleuropäern vorkommen. Wenn ein Polymorphismus einen Effekt auf das Erkrankungsalter einer Population zeigt, kann er weniger oder keinen Einfluss in einer zweiten Population haben (Hernandez-Avila et al. 2007). Solche populationspezifischen Effekte krankheitsmodifizierender Faktoren sind für einige neurodegenerative Erkrankungen wie dem M. Parkinson oder der Chorea Huntington gefunden worden (Metzger et al. 2008; Lv et al. 2017). Ob die Ergebnisse dieser Arbeit einen populationsübergreifenden Effekt haben, müsste daher durch Studien in anderen Populationen getestet werden.

Es konnten sechs Polymorphismen in den kodierenden Bereichen der Gene *IPO4*, *XPO6*, *CAST*, *CAPN2* und *KPNA2* identifiziert werden.

6.2 Das HRM ist eine geeignete Methode zur Genotypisierung der Patientenkohorte

Nachdem die sechs SNPs identifiziert waren, erfolgte die Etablierung einer geeigneten Methode zur Genotypisierung der Patientenproben. Die HRM Technik bietet viele Vorteile. Es handelt sich um ein homogenes geschlossenes System, da das Reaktionsgefäß zwischen der Amplifikation und der Analyse im LightCycler nicht mehr geöffnet werden muss. Die Gefahr einer Kontamination wird dadurch relevant gesenkt (Reed, Kent, and Wittwer 2007). Im Vergleich zu anderen Techniken, bei denen das PCR Produkt bspw. auf ein Gel aufgetragen werden muss, ist das HRM unkompliziert durchführbar. Der im Mastermix enthaltene Fluoreszenzfarbstoff hemmt die PCR im Gegensatz zu anderen Farbstoffen wie bspw. SYBR Green I auch in hohen Konzentrationen nicht (Herrmann et al. 2006; Erali, Palais, and Wittwer 2008). Eine

Diskussion

signifikante Kostenersparnis ergibt sich aus der Tatsache, dass im Unterschied zu anderen Methoden wie beispielsweise der SSCA, dHPLC oder DGGE keine anschließenden Trennverfahren nötig sind (Taylor 2009). Zudem bietet kein anderes Verfahren eine vergleichbar hohe Sensitivität und Spezifität (Reed and Wittwer 2004).

Es existieren jedoch einige Hinweise zu Faktoren, welche die Genotypisierung erschweren können. Ein entscheidender Faktor sind Schmelztemperaturunterschiede innerhalb der Gruppe von Proben mit gleichem Genotyp. Diese können aufgrund von Unterschieden der chemischen Zusammensetzung der DNA Proben zustande kommen. Der Einfluss auf die Schmelzkurven ist abhängig von dem verwendeten Instrument und den eingesetzten Reaktionsgefäßen. Versuche mit Mikrotiter-Platten, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurden, sind dabei störanfälliger als Versuche, in denen Kapillaren eingesetzt werden (Herrmann et al. 2007). Der Signalunterschied als Maß der Differenzierung zwischen zwei Proben war in den in dieser Arbeit durchgeführten HRM Versuchen jedoch immer ausreichend hoch um sicher zwischen den Genotypen unterscheiden zu können.

Die generierten Amplifikationsprodukte in den durchgeführten Versuchen zählten zwischen 118bp und 215bp. Die Auflösung des HRM hätte durch den Einsatz kürzerer Amplifikationsprodukte vermutlich noch verbessert werden können (Liew et al. 2004; Slomka et al. 2017; Erali, Voelkerding, and Wittwer 2008). Die Sensitivität des HRM mit kurzen Amplifikationsprodukten (<100bp) ist genauso hoch wie unter Verwendung von unmarkierten Hybridierungssonden. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass längere Amplifikationsprodukte (>200bp) das Risiko für falsch typisierte Proben erhöhen (Liew et al. 2007). Je länger das Amplifikationsprodukt, desto geringer ist der Einfluss des einzelnen Basenaustauschs auf die Schmelztemperatur des gesamten Amplikons. Aus diesem Grund war es notwendig, die Primer so zu wählen, dass möglichst kurze Amplifikationsprodukte entstehen. Das längste Amplikon dieser Arbeit zählte 215bp und war damit länger, als in der Arbeit von Liew und Kollegen empfohlen. Im Gegensatz zu deren Berichten, in welchen bei einer Größe des Amplikons von >200 die Spezifität des klassischen HRM lediglich 77% beträgt, konnten in dieser Arbeit auch die SNPs innerhalb der längeren Amplifikationsprodukte zuverlässig genotypisiert werden. Alle Ergebnisse wurden dabei mittels Sequenzierung validiert. Dieser

Unterschied ist sehr wahrscheinlich auf die höhere Auflösung des LightCyclers im Vergleich zu dem in der Arbeit von Liew und Kollegen verwendeten High Resolution Instrument HR-1 (Idaho Technology) zurückzuführen. Diese These wird durch die Arbeit von Herrmann und Kollegen unterstützt. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Schmelztemperaturunterschiede innerhalb der Proben mit dem gleichen Genotyp stark von dem verwendeten Instrument abhängig sind (Herrmann et al. 2007). Zudem gibt es Arbeiten, die bekräftigen, dass auch Amplifikate mit bis zu 544bp sicher mittels HRM typisiert werden können (Wittwer et al. 2003). Eine weitere Limitierung des HRM besteht in der Möglichkeit, dass andere unerwartete SNPs die Genotypisierung der zu untersuchenden Mutation behindern (Slomka et al. 2017). Um die Wahrscheinlichkeit dafür zu senken, ist es wiederum von Vorteil, möglichst kleine Amplifikate zu generieren.

Im untersuchten SNP rs11550452 in *IPO4* kommt es zu einem Austausch von G zu C. Ein Nachteil des HRM besteht in der Herausforderung der Differenzierung zwischen diesen Basenpaar neutralen Varianten, die keine Veränderung des GC Gehaltes bewirken. Bei diesen G/C oder A/T Varianten ändert sich der T_m Wert um maximal 0.4°C. Daher konnten die unterschiedlichen Genotypen dieses SNP im klassischen HRM Ansatz nicht differenziert werden. Gundry und Kollegen konnten zeigen, dass die Verwendung von zwei Doppelstrang Oligonukleotiden - sogenannten internen Kalibratoren - eine Unterscheidung dieser Basenpaar neutralen Varianten auch ohne Sonde ermöglicht (Gundry et al. 2008). In dieser Arbeit wurde für den einzigen Basenpaar neutralen SNP im *IPO4* Gen jedoch die Genotypisierung mit unmarkierter Hybridisierungsprobe als Methode gewählt. Dies hatte zur Folge, dass trotz der geringen Änderung des T_m Werts 440 Proben sicher typisiert werden konnten. Die Literatur hierzu belegt die hohe Spezifität und Sensitivität dieses Vorgehens (Erali, Palais, and Wittwer 2008; Vossen et al. 2009).

Das High Resolution Melting als Methode zur einfachen und kostengünstigen Genotypisierung wurde von zahlreichen anderen Arbeitsgruppen eingesetzt (Lieveld et al. 2017; De Leeneer et al. 2009; Wahyuningsih et al. 2017). In dieser Arbeit konnten mittels HRM und der Anwendung unmarkierter Hybridisierungsproben für alle sechs selektierten Gene ausreichend viele Patientenproben sicher genotypisiert werden.

6.2.1 Für den SNP in *IPO4Ex17* konnte ein HRM Ansatz mit unmarkierter Hybridisierungssonde etabliert werden.

Eine Limitation des HRM besteht, wie bereits erwähnt, in der Differenzierung von Basenpaar neutralen Varianten wie im Exon17 des Importin 4. Bei diesen Basenpaar neutralen Varianten ändert sich der T_m Wert um maximal 0.4°C , was eine sichere Differenzierung im klassischen HRM unmöglich macht. In *IPO4Ex17* kommt es zu einem Austausch zwischen Guanin und Cytosin. Dieser SNP bewirkt demnach eine ausreichend hohe Veränderung der Schmelztemperatur des DNA Fragmentes. Es ist vielfach beschrieben, dass in solchen Fällen unmarkierte Hybridisierungssonden mit Erfolg zur Genotypisierung eingesetzt werden können (De Leeneer et al. 2009; Erali, Palais, and Wittwer 2008; Zhou et al. 2004; Liew et al. 2007). Unter anderem wurden bisher krankheitsassoziierte SNPs für die Faktor-V-Leiden Mutation oder die Mukoviszidose mit Hilfe unmarkierter Hybridisierungssonden untersucht (Zhou et al. 2004; Zhou et al. 2005). Mit Hybridisierungssonde beträgt der Unterschied der Schmelztemperaturen der homozygoten Varianten $2-8^\circ\text{C}$. Daher ist die Detektion mittels High Resolution Melting nicht zwingend nötig (Erali, Palais, and Wittwer 2008). Aufgrund der zu erwartenden höheren Sensitivität wurde jedoch ein HRM Ansatz etabliert. Trotz der zwischenzeitlich kontrovers diskutierten Effektivität der asymmetrischen PCR (Sanchez et al. 2004) wurde, wie von Zhou und Kollegen empfohlen, ein asymmetrischer PCR Ansatz gewählt (Zhou et al. 2004). Das erforderliche Design der Sonden und die Kosten für die Sonden sind Nachteile der HRM Methode mit unmarkierter Hybridisierungssonde (Zhou et al. 2004). In den Etablierungsversuchen erleichterte eine höhere MgCl_2 Konzentration die Differenzierung der Proben. Diese Beobachtung ist wahrscheinlich auf die stabilere Interaktion der Primer zurückzuführen. Im Rahmen der Etablierung zeigte die Erhöhung der PCR Zyklen im Laufzeitprotokoll auf 55 Zyklen einen vorteilhaften Effekt auf die Differenzierung der Proben. Dies deutet darauf hin, dass durch die hohe Zyklenzahl die maximale Menge der Sonden-DNA Duplexen ausgebildet werden und die Gruppierung so erleichtert wird. Nach der Optimierung des Protokolls wurden 25 CEPH DNA Proben und eine Negativkontrolle typisiert, um die Reaktionsbedingungen zu validieren. Die designten Sonden konnten alle Proben korrekt typisieren. Es ergaben sich keine falsch positiven oder falsch negativen Ergebnisse. Folglich wird geschlossen, dass die

Genotypisierung mit unmarkierter Hybridisierungssonde eine geeignete Methode zur Genotypisierung des SNPs rs11550452 in *IPO4 Ex17* ist. Durchschnittlich unterschieden sich die Schmelztemperaturen der häufigeren und der selteneren Variante um ca. 4°C. Daher konnten die Ergebnisse problemlos interpretiert werden. Die beobachteten Schmelztemperaturunterschiede sind konsistent mit den Ergebnissen von Liew und Kollegen (Liew et al. 2007).

6.2.2 Für die SNPs in *IPO4Ex16*, *XPO6*, *CAPN2* und *KPNA2* konnte ein klassischer HRM Ansatz etabliert werden

Die vier SNPs in *IPO4Ex16*, *XPO6*, *CAPN2* und *KPNA2* sind nicht Basenpaar neutral. Es ist daher grundsätzlich möglich, diese SNPs anhand ihres Schmelzverhaltens in einem klassischen HRM Ansatz ohne Hybridisierungssonde zu typisieren. Im Gegensatz zu Wittwer und Kollegen zeigte die Arbeitsgruppe um Liew, dass bei Fragmenten >200bp unter Verwendung unmarkierter Hybridisierungssonden eine höhere Sensitivität und Spezifität zu erwarten ist (Liew et al. 2007; Wittwer 2009). Daher wurde zunächst versucht, ein Setting mit unmarkierter Hybridisierungssonde zu etablieren. Obwohl die gleichen Versuchsbedingungen wie bereits für *IPO4 Ex17* angewendet wurden, konnte anhand der designten Sonden unerwarteterweise kein Sondersignal generiert werden. Es konnte daher keine Zuordnung der Genotypen stattfinden. Um zu überprüfen, ob diese Abweichung auf die Sondensequenz zurückzuführen ist, wurden neue Sonden designet. Eine Unterscheidung der Genotypen war jedoch weiterhin nicht möglich. Auch die folgenden Etablierungsversuche mit Anpassung der MgCl₂ Konzentration und der Anzahl der PCR Zyklen, die in anderen Arbeiten zu einer besseren Auflösung führten, brachten keinen Erfolg (De Leener et al. 2009).

Slomka und Kollegen konnten erst kürzlich zeigen, dass eine relevante Fehlerquelle in der Reproduzierbarkeit des Pipettierens liegt. Da es sich beim HRM um ein closed tube Verfahren handelt, wird die Form der Schmelzkurven hoch sensitiv von Veränderungen der Umgebung wie beispielsweise dem pH Wert, ionischen Kräften oder der Kationenkonzentration beeinflusst. Daher sollten Unterschiede im Pipettiervorgang strikt vermieden werden. Kleinste Pipettierunterschiede, welche in anderen Methoden

Diskussion

keine Veränderungen bedingen, führen im HRM auch bei vorgeschalteter PCR zu merklichen Schwierigkeiten und inkorrektter Zuordnung des Genotyps (Slomka et al. 2017). Diese These wird durch die Arbeit von Tucker und Kollegen unterstützt. Deren Ergebnisse verdeutlichen, dass korrektes Pipettieren aller Reaktionsansätze um das gleiche Volumen und die gleiche Konzentration der Reaktionskomponenten zu garantieren, unverzichtbar ist, da Unterschiede insbesondere der Salzkonzentration starken Einfluss auf das Schmelzverhalten haben (Tucker and Huynh 2014).

Darüber hinaus konnten durch die Arbeitsgruppe um Slomka Unterschiede der DNA Qualität und verschiedene Methoden zur Isolierung der verwendeten DNA als limitierende Faktoren in der Differenzierung der Proben im HRM identifiziert werden. Da wie in den genannten Arbeiten empfohlen, ein Mastermix für alle Proben in einem Experiment verwendet wurde und für alle Versuche die gleiche CEPH- und Patienten DNA verwendet wurde, schließt das beide Möglichkeiten als Ursache für die fehlgeschlagene Etablierung aus. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Ursache im Zusammenspiel mehrerer Faktoren liegt.

In der Literatur ist beschrieben, dass SNPs anhand ihrer Schmelzkurvenunterschiede auch ohne Hybridisierungssonde sicher typisiert werden können (Vossen et al. 2009; Smith, Lu, and Alvarado Bremer 2010; Bruzzone and Steer 2015). Aus diesem Grund erfolgte die Genotypisierung der vier SNPs mittels klassischem HRM. Anders als für die Genotypisierung anhand der Schmelzkurvenunterschiede empfohlen, wurde auf eine Verkürzung der zuvor generierten DNA Fragmente bewusst verzichtet (Montgomery et al. 2007). Eine Verkürzung der Sequenz auf <200bp war nicht nötig, um eine hohe Sensitivität und Spezifität zu erreichen. Im Gegensatz zu der Genotypisierung mit unmarkierten Sonden wurde ein symmetrischer PCR Ansatz verwendet. So konnte eine bessere Differenzierung zwischen den Schmelzkurven erreicht werden. Auch in diesem Fall zeigte eine Erhöhung der PCR Zyklen eine Verbesserung der Gruppenzuordnung. Anschließend an die Etablierung wurden 15-25 CEPH DNA Proben typisiert, um die Versuchsbedingungen zu validieren. Während der Typisierung der Patienten DNA gab es nur vereinzelt Proben, die keiner Schmelzgruppe zugeordnet werden konnten. In diesen Fällen erfolgte ein zusätzlicher HRM Durchlauf mit Patientenproben, deren Genotyp bereits bekannt war. Für die seltenen Fälle, in denen auch daran anschließend

keine Zuordnung möglich war, wurde eine Sequenzierung durchgeführt. Auf diese Weise konnten nahezu alle Proben korrekt typisiert werden. Daher schienen unbekannte SNPs in Sequenzen, die komplementär zu den Primern sind und in anderen Arbeiten zu Problemen der Schmelzkurvenzuordnung geführt haben, keine Rolle zu spielen (Slomka et al. 2017).

Insgesamt zeigte sich, dass für alle SNPs eine Differenzierung der Schmelzkurven sowohl zwischen heterozygoten und homozygoten Proben als auch zwischen den Beiden homozygoten Varianten möglich ist.

6.2.3 Die Genotypisierung des SNP im *CAST* Gen war mittels HRM nicht möglich

Für den SNP rs205384 im *CAST* Gen sollte ebenfalls ein HRM Ansatz etabliert werden. Im HRM konnten die Genotypen jedoch nicht differenziert werden. Die Ursache hierfür lag im ungleichmäßigen Abschmelzen der dsDNA rund um den SNP. Um zu prüfen, ob die Ursache dafür das Vorhandensein mehrerer Schmelzdomänen war, wurde eine Schmelzanalyse mithilfe einer UMelt Animation durchgeführt. So konnte gezeigt werden, dass zwei Schmelzdomänen vorhanden waren. Daher konnte von den Unterschieden zwischen den Schmelzprofilen im HRM nicht auf deren Sequenz geschlossen werden. Aus diesem Grund wurde zunächst versucht, Primer zu designen, deren PCR Produkt ein homogenes Schmelzverhalten zeigen. Durch eine erneute UMelt Animation konnte jedoch belegt werden, dass keines der neu designten Primerpaare ein homogen abschmelzendes PCR Produkt generiert. In der Literatur ist beschrieben, dass das HRM als Genotypisierungsmethode für längere Fragmente mit mehreren Schmelzdomänen ungeeignet ist, da die Differenzierung der Schmelzkurven dadurch relevant eingeschränkt wird (Wojdacz, Dobrovic, and Hansen 2008). Daher wurde der Restriktionsverdau als Methode zur Genotypisierung gewählt. Es konnte schon früh gezeigt werden, dass sich Restriktionsendonukleasen hervorragend zur Genotypisierung von SNPs eignen (Maeda et al. 1989; Gotoda et al. 1992). In dieser Arbeit konnte die Restriktionsendonuklease *BcoDI* zur Genotypisierung des SNP im *CAST* Gen etabliert werden. *BcoDI* schneidet den selteneren Haplotyp C. In den Versuchen zur Validierung der Versuchsbedingungen konnten 17 CEPH DNA Proben korrekt typisiert werden.

Zusammengefasst betrachtet war der Restriktionsverdau im Fall des *CAST* Gen eine effektive Methode zur Genotypisierung. Aufgrund des Auftretens mehrerer Schmelzdomänen im HRM konnte dieses nicht etabliert werden.

6.3 Die SNPs konnten in der Normalbevölkerung und in den Patientenproben nachgewiesen werden

Nachdem für jeden SNP eine Methode zur Genotypisierung etabliert werden konnte, erfolgte der Nachweis der SNPs in der Normalbevölkerung (anhand von CEPH DNA Proben) und in 492 Patientenproben. Alle SNPs, bis auf den SNP in *KPNA2*, konnten dabei nachgewiesen werden. Die ermittelten Allelfrequenzen stimmten dabei wie erwartet denen aus vorhergehenden Studien wie bspw. dem HAPMAP Projekt überein. Es ergaben sich keine signifikanten Abweichungen.

Der Umfang der Patientenkohorte ist häufig ein entscheidender, limitierender Faktor in Bevölkerungsstudien. Daher wurden die Patientenproben gemeinsam, unabhängig von ihrer ethnischen Zugehörigkeit betrachtet und typisiert, um dadurch die Aussagekraft der statistischen Analyse zu erhöhen. Auf diese Weise bilden wir ein größeres Kollektiv ab als die meisten *SCA3* Studien (Long et al. 2015; Kazachkova et al. 2017). Ein Populationsspezifischer Effekt kann daher jedoch nicht ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit müssten, wie bereits erwähnt (Kapitel 6.1.2), entsprechend in anderen Populationen bestätigt werden.

Die Anzahl der typisierten Proben variiert zwischen den untersuchten Genen. Für einige Proben konnte trotz wiederholter Typisierung mit Positivkontrolle kein Genotyp festgelegt werden. In vielen Fällen handelte es sich um die gleichen Patientenproben, so dass die beobachteten Resultate sehr wahrscheinlich auf eine mangelnde DNA Qualität dieser Proben zurückzuführen sind. Die quantitative Heteroduplexanalyse, wie Sie von Liew sowie Vossen und Kollegen beschrieben wurde, hätte vermutlich nicht zur Verbesserung der Ergebnisse beigetragen, da die betreffenden Proben keine homogenen Schmelzkurven generierten (Palais, Liew, and Wittwer 2005; Liew et al. 2004; Vossen et al. 2009).

Der SNP rs1059558, der im *KPNA2* Gen identifiziert wurde, konnte mit einer erwarteten MAF von 0.465 (wie Sie in den genutzten Datenbanken beschrieben wurde) in der Normalbevölkerung nicht in den Patientenproben nachgewiesen werden. Alle genotypisierten DNA Proben waren heterozygot. Daraus ergibt sich die Vermutung, dass es sich um eine paraloge DNA Region handeln könnte. Das Fehlen von homozygoten Genotypen in den untersuchten SCA3 Patienten und in den CEPH DNA Proben könnte jedoch auch die Hypothese unterstützen, dass der Aminosäureaustausch von Glycin zu Serin einen schwerwiegenden Effekt hervorruft. Es kann nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass der Polymorphismus in seiner homozygoten Form einen so gravierenden Effekt ausübt, dass er selektive Eigenschaften im frühen oder ungeborenen Leben hat.

6.3.1 Nicht alle Genotypisierungsergebnisse sind mit dem HWG vereinbar

Aus den Typisierungsergebnissen der Patientenproben wurde berechnet, ob diese mit dem Hardy Weinberg Gleichgewicht zu vereinbaren sind. Das war dann der Fall, wenn die per Chi-Quadrattest errechnete Wahrscheinlichkeit ≥ 0.05 war. Die Genotypisierungsergebnisse der beiden SNPs rs7146310 und rs11550452 im *IPO4* Gen sowie des SNP rs205384 im *XPO6* Gen waren mit dem Hardy Weinberg Gleichgewicht vereinbar. Der ermittelte p-Wert für den SNP rs754615 im *CAST* Gen betrug exakt 0.05. Der Chi-Quadrattest ist ein approximativer Test. Das bedeutet, dass die exakte Überschreitungswahrscheinlichkeit p mit wachsendem Stichprobenumfang genauer geschätzt wird. Bei einer Erweiterung des Stichprobenumfangs wäre demnach ein höheres Signifikanzniveau denkbar.

Für den SNP im *CAPN2* Gen wurde, anders als erwartet, ein p-Wert < 0.05 festgestellt. Daher wurde dieser SNP von allen weiteren Analysen ausgeschlossen. Unter den untersuchten Patientenproben fanden sich mehr homozygote als erwartet. Ein sogenannter Heterozygotenmangel kann durch den Wahlund Effekt begründet sein. Dieser Effekt besagt, dass räumlich oder zeitlich isolierte Subpopulationen eine vollständige genetische Durchmischung der Gesamtpopulation verhindern. Wenn man eine unterschiedliche genetische Komposition der Subpopulationen voraussetzt, führt dies zu einem Mangel an heterozygoten Individuen relativ zu dem in der

Diskussion

Gesamtpopulation erwarteten Wert (Wahlund 1928). Darüber hinaus können Konsanguinität und assortative Paarung einen Heterozygotenmangel bewirken (Seyffert, 1998). Wobei beide Möglichkeiten in diesem Fall vermutlich wenig Bedeutung haben. Isolationsfaktoren sind wenig wahrscheinlich, da unsere Kohorte Patientenproben aus ganz Mitteleuropa umfasst. Von einer assortativen Paarung ist nur auszugehen, wenn es sich um genetische Veränderungen handelt, die Auswirkungen auf den Phänotyp haben. Ein weiterer denkbarer Grund für Abweichungen vom Hardy-Weinberg Gleichgewicht kann wiederum der Einfluss des Genotyps auf das Überleben sein. Dieser Effekt scheint jedoch unwahrscheinlich.

Es schien zunächst auch denkbar, dass sich die Abweichung vom Hardy Weinberg Gesetz durch eine gemeinsame Lokalisation von *CAPN2* und *ATXN3* auf dem gleichen Chromosom erklären lässt. *ATXN3* liegt, wie bereits erwähnt, auf Chromosom 14, *CAPN2* auf dem langen Arm von Chromosom 1. Eine fehlerhafte Typisierung der Proben kann nicht ausgeschlossen werden. Eine falsche Zuordnung von Schmerzkurven zur sequenzierten Indexprobe wäre als mögliche Ursache denkbar. Jedoch müsste die Abweichung vom HWG sehr groß sein, um sicher als Folge von Genotypisierungsfehlern interpretiert werden zu können.

Die Möglichkeit, dass Nullallele Einfluss auf die Typisierungsergebnisse genommen haben könnten, wird im Folgenden betrachtet. Wenn Allele nicht oder nur eingeschränkt amplifiziert werden, spricht man von Nullallelen. Wird in der PCR eines der beiden Allele häufiger amplifiziert als das Andere, kann das zu einer erhöhten Anzahl von Falsch-Homozygoten Proben führen. Entsprechend entsteht ein Heterozygotenmangel (Chakraborty et al. 1992). Nach dieser Überlegung könnten Patienten, die homozygot für das Nullallel sind, anhand des HRM nicht typisiert und müssen aus dem Kollektiv ausgeschlossen werden. Im Fall von des *CAPN2* Gen könnte das Allel mit der Variante C das Nullallel sein. Nur 5,8 % der untersuchten Proben trugen den Genotyp CC. Wohingegen mit 25,12 % ein Heterozygotenmangel bestand.

Warum die beobachteten Allelfrequenzen nicht mit den erwarteten Allelfrequenzen entsprechend dem Hardy Weinberg Gesetz übereinstimmen, kann nicht abschließend erklärt werden.

6.3.2 Die Genotypisierungsergebnisse konnten durch die anschließende Sequenzierung validiert werden

Um zu überprüfen, ob die Genotypisierungsergebnisse valide sind, erfolgte nach dem HRM und dem Restriktionsverdau die Sanger Sequenzierung zufällig ausgewählter Proben. Das ist möglich, da durch die HRM Analyse die Struktur der DNA nicht zerstört wird (Vossen et al. 2009). Die Verifizierung der High Resolution Ergebnisse mittels direkter Sequenzierung gilt laut aktueller Literatur als Goldstandard (Slomka et al. 2017; Er and Chang 2012). Die von den Schmelzprofilen im HRM und der Agarosegelelektrophorese nach Restriktionsverdau abgeleiteten Annahmen bezüglich der Genotypen dieser Proben konnten so bestätigt werden. Manche Sequenzen zeigten in der Auswertung der Sequenzierungsergebnisse multiple Peaks von Beginn der Sequenz an. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass mehr als eine Bindungsstelle für den Primer vorhanden war oder dass die PCR Reaktion nicht ausreichend aufgereinigt wurde. In diesen Fällen wurden die Proben erneut sequenziert. In diesem zweiten Sequenzierdurchlauf wurde jeweils der zuvor nicht verwendete Sequenzierprimer eingesetzt.

Von Er und Kollegen wird empfohlen, jede unbekannte Probe, die eine eigene Schmelzkurve im HRM darstellt, mittels Sequenzierung zu verifizieren (Er and Chang 2012). Aufgrund des damit verbundenen hohen Zeitaufwandes und der großen Patientenkohorte wurde darauf verzichtet. Das HRM hat, wie bereits erwähnt eine extrem hohe Spezifität und Sensitivität (Reed and Wittwer 2004). Daher steht zur Diskussion, ob eine Verifizierung mittels Sequenzierung von mehr als nur einer Probe pro Schmelzgruppe den hohen Zeitaufwand und die zusätzlichen Kosten rechtfertigt.

In dieser Arbeit konnten die Ergebnisse der HRM Genotypisierung entsprechend der aktuellen Empfehlungen durch die anschließende Sequenzierung ausgewählter Indexproben zuverlässig verifiziert werden, was den hohen Zeitaufwand rechtfertigt.

6.4 Das Erkrankungsalter der SCA3 wird durch Polymorphismen in nukleozytoplasmatischen Transportproteinen beeinflusst

Nachdem die vier SNPs in der Patientenkohorte nachgewiesen werden konnten, erfolgte die Untersuchung des Einflusses der SNPs auf das Erkrankungsalter der SCA3. Hierzu wurde eine Kovarianzanalyse mit dem kontinuierlichen Einflussfaktor CAG-Repeat Länge und der Gruppeneinteilung des Polymorphismus als nominalen Einflussfaktor sowie einer Wechselwirkung aus Beiden durchgeführt. Die Kovarianzanalyse wurde bereits im Rahmen anderer Arbeiten erfolgreich zum Nachweis des Einflusses von SNPs auf das Erkrankungsalter neurodegenerativer Polyglutaminerkrankungen angewendet (Long et al. 2015; Metzger, Bauer, Tomiuk, Laccone, Didonato, Gellera, Soliveri, et al. 2006). In unserer Patientenkohorte waren nicht ausschließlich unabhängige Individuen. Es wurden auch Familien mit bis zu elf Familienmitgliedern in die Untersuchung eingeschlossen. Daher erfolgte die statistische Analyse unter Berücksichtigung der Familienzugehörigkeit als Gewichtungsfaktor.

Das Ergebnis dieser Analyse zeigte, dass das Erkrankungsalter der SCA3 Patienten negativ mit der Anzahl der CAG-Wiederholungen im expandierten *ATXN3* Gen korreliert ($p < 0,0001$). Diese Beobachtung ist mit den Ergebnissen aus frühen Studien zur SCA3 konsistent (Maciel et al. 1995; Schöls et al. 1996). Darüber hinaus konnte im Rahmen der statistischen Analyse gezeigt werden, dass die Varianz des Erkrankungsalters in unserer Kohorte nur zu $<50\%$ von der Anzahl der CAG Wiederholungen erklärt wird. Das ist weniger als in anderen Studien beschrieben wurde (Schöls et al. 1996; van de Warrenburg et al. 2005; Tezenas du Montcel et al. 2014). Wobei sich die Abweichung vermutlich durch die kleinere Kohorte und Unterschiede der ethnischen Herkunft erklären lässt.

Interessanterweise konnten wir zeigen, dass die drei SNPs in den nukleozytoplasmatischen Transportproteinen signifikanten Einfluss auf das Erkrankungsalter der SCA3, zusätzlich zu der Anzahl an CAG Wiederholungen haben, während für den SNP im *CAST* Gen kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden konnte.

6.4.1 Die SNPs rs7146310 und rs11550452 in *IPO4* haben einen signifikanten Einfluss auf das Erkrankungsalter der SCA3

Die statistische Analyse ergab, dass die zwei Polymorphismen rs7146310 und rs11550452 in *IPO4* einen signifikanten Einfluss auf das Erkrankungsalter der SCA3 haben ($p < 0,0001$ respektive $p = 0,0157$). Dabei ist die seltenere Variante AA des SNP rs7146310 mit einem früheren Eintreten der Symptome von durchschnittlich 12,67 Jahren im Vergleich zu der häufigeren Variante GG verbunden. Der Polymorphismus erklärt damit 2,94% der Varianz des Erkrankungsalters, das nicht durch die Anzahl der CAG Wiederholungen erklärt werden kann. Der SNP rs11550452 erklärt 3,38% der Varianz des AAO und hat somit einen noch stärkeren Einfluss. Im zweiseitigen t-test konnte für diesen SNP wider Erwarten kein signifikanter Unterschied des Erkrankungsbeginns zwischen den einzelnen Genotypen festgestellt werden.

Wie bereits mehrfach beschrieben, ist die intrazelluläre Lokalisation von Ataxin-3 in der Vergangenheit häufig eng mit der Pathogenese der SCA3 in Verbindung gebracht worden (Tait et al. 1998; Bichelmeier et al. 2007). Hierbei scheint der nukleozytoplasmatische Transport von besonderem Interesse für das Verständnis der molekularen Pathogenese zu sein (Pozzi et al. 2008). Proteine werden mit Hilfe von Kerntransport-Rezeptoren, die meisten davon Mitglieder der Karyopherin- β Familie, in den Zellkern transportiert (Cautain et al. 2015; Soniat and Chook 2015). Importin 4 ist Teil dieser Familie und fungiert als Rezeptor für Nukleäre Lokalisationssignale. Kurz vor der Polyglutamineinheit des *ATXN3* Gens liegt das einzige funktionell aktive Nukleäre Lokalisationssignal (Tait et al. 1998; Antony et al. 2009). Es ist vorstellbar, dass die untersuchten SNPs durch den hervorgerufenen Aminosäureaustausch zu strukturellen Veränderungen in Importin 4 führen, die einen funktionellen Einfluss auf die Transportfunktion haben und Nukleäre Lokalisationssignale dadurch suffizienter oder insuffizienter gebunden werden. Um zu überprüfen, ob der polymorphe Austausch von Alanin zu Valin und von Prolin zu Alanin an den Aminosäurepositionen 513 und 580 im *IPO4* Gen strukturelle Effekte vermuten lässt, führten wir eine Analyse der Sekundärstruktur von Importin 4 durch. Der rs7146310 und der rs11550452 liegen nach diesen Vorhersagen in einer α -Helix und sind vollkommen im hydrophoben Kern des Proteins verborgen. Basierend auf dieser Tatsache ist es vorstellbar, dass die SNPs den hydrophoben Kern von Importin 4 entweder zerstören und damit die Stabilität

beeinträchtigen oder zu lokalen Strukturunterbrechungen führen. In beiden Fällen wäre mit einer funktionellen Beeinträchtigung des Proteins zu rechnen. Über das *IPO4* Gen verteilt liegen einige bekannte Proteinbindungsstellen. Die zwei SNPs befinden sich jedoch in keiner dieser funktionell bedeutenden Domänen. Daher ist ein direkter Einfluss der SNPs auf die Bindung von Ataxin-3 an Importin 4 eher unwahrscheinlich. Über den funktionellen Effekt der Polymorphismen auf die Pathogenese der SCA3 lässt sich daher nur spekulieren. Patienten, die den Genotyp GG tragen, erkranken im Fall beider SNPs 4-12 Jahre später. Denkbar ist, dass der Kerntransport und die Degradation des mutierten Ataxin-3 in diesem Fall beeinträchtigt sind. Das wiederum könnte zu einem Anstieg des gelösten, mutierten Ataxin-3 im Zytoplasma führen, ohne dass nukleäre Einschlusskörperchen ausgebildet werden können. Dass Störungen des nukleozytoplasmatischen Transports ursächlich für viele neurodegenerative Erkrankungen sind, wurde erst kürzlich von Kim und Kollegen zusammenfassend dargestellt (Kim and Taylor 2017). Für den Transportrezeptor Karyopherin α -3 konnte sogar ein direkter Zusammenhang mit der Kernaggregation von Ataxin-3 bewiesen werden. Wird *KNPA3* im Mausmodell gezielt ausgeschaltet, führt dies zu einem abgeschwächten neurologischen Phänotyp (Sowa et al. 2018). Interessanterweise sind Kerntransportrezeptoren als genetische Modifikatoren mit Einfluss auf die Neurodegeneration der Amyotrophen Lateralsklerose in Hefe- und Drosophila Modellen beschrieben (Freibaum et al. 2015; Zhang et al. 2016). Zwei kürzlich erschienene Studien vertreten die Auffassung, dass mutiertes Huntingtin generelle Defekte im Nukleozytoplasmatischen Transport induziert und dass diese Ausfälle zentrale Faktoren der Pathogenese der Chorea Huntington sind (Gasset-Rosa et al. 2017; Grima et al. 2017). Insgesamt ist wenig über die spezifische Funktion von Importin 4 bekannt. Es transportiert den Vitamin D Rezeptor (VDR) in den Nukleus. Kürzlich wurde der Einfluss von Transkriptionsfaktoren auf die Expression von Importin 4 näher untersucht (Xu et al. 2017; Miyauchi et al. 2005; Chachami et al. 2009). Von Bedeutung für das Verständnis der funktionellen Beeinträchtigung des Proteins durch die SNPs könnte seine Funktion als Chaperon sein (Jakel et al. 2002). Chaperone können die Ausbildung von Proteinaggregaten inhibieren, indem sie deren hydrophobe Seitenketten abschirmen (Buchner 2002). Eine Beeinträchtigung dieser Funktion durch die SNPs in *IPO4* könnte

zu einer verstärkten Aggregation von Ataxin-3 führen und so das frühere Erkrankungsalter der Patienten, die den Genotyp AA tragen, erklären.

Die hier erzielten Ergebnisse verdeutlichen in jedem Fall, dass die zwei SNPs und damit das *IPO4* Gen stark mit der Pathogenese der SCA3 verknüpft sind. Es sind jedoch weitere Studien nötig, um den Einfluss der SNPs genauer zu untersuchen. Das unvollständige Wissen über die Funktion der nukleozytoplasmatischen Transportproteine in der SCA3 sollte Anlass sein, für die SNPs in Importin 4 eine funktionelle Bestätigung in Zellkultur anzuschließen. So könnten Hinweise auf den genauen Mechanismus der Beeinflussung des Erkrankungsalters gewonnen werden. Da beide Polymorphismen einen Aminosäureaustausch bedingen, könnte man Expressionskonstrukte des modifizierten Importin 4 zusammen mit GFP-getaggten Ataxin-3 Konstrukten cotransfizieren. Anschließend wäre eine Änderung der Lokalisation von Ataxin-3 mittels Fluoreszenzmikroskopie erkennbar. Die ubiquitäre Expression von Importin 4 lässt eine entscheidende Funktion im Transport verschiedenster Proteine vermuten. Ob Importin 4 als Zielstruktur für neue Therapieansätze genutzt werden kann, bleibt daher fraglich.

Abschließend stellen die hier dargestellten Ergebnisse einen weiteren Hinweis für die wichtige Verbindung zwischen dem Kerntransport und der Pathogenese der SCA3 dar. Da Veränderungen in Transportproteinen auch für andere neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer und M. Parkinson gefunden wurden, könnte der genetische Modifikator *IPO4* auch eine wichtige Rolle in der Pathogenese dieser Erkrankungen spielen.

6.4.2 Der SNP rs205384 in *XPO6* hat einen signifikanten Einfluss auf das Erkrankungsalter der SCA3

Wie in dieser Arbeit bereits für *IPO4* gezeigt, wurde auch ein signifikanter Einfluss des SNPs im *XPO6* Gen auf das Erkrankungsalter der SCA3 festgestellt ($p=0,0242$). Der Haplotyp A ist mit einem früheren Erkrankungsbeginn von durchschnittlich 6,98 Jahren im Vergleich zum Haplotyp G verknüpft. Es werden dadurch 0,76% der Varianz des Erkrankungsalters der SCA3 erklärt, die nicht durch die CAG-Wiederholungen erklärt werden können.

Diskussion

Für die Pathogenese der SCA3 spielt die intrazelluläre Lokalisation von Ataxin-3 eine maßgebliche Rolle. Wie bereits beschrieben, scheint der Kerntransport ein Auslöser für die Induktion der Neurodegeneration zu sein. Es konnte schließlich schon früh gezeigt werden, dass die nukleäre Lokalisation Voraussetzung für die Ausbildung des Phänotyps der SCA3 ist (Bichelmeier et al. 2007). Der Transport von Proteinen über die Zellkernmembran ist abhängig von Kerntransport-Rezeptoren, zu denen neben Importin 4 auch das Exportin 6 zählt (Cautain et al. 2015; Soniat and Chook 2015). Es wird, wie alle Transportproteine, ubiquitär exprimiert. Die Expression im Gehirn ist allerdings stärker ausgeprägt als in den meisten anderen Geweben. Exportin 6 bindet nukleäre Exportsignale, wodurch die Transportkaskade in das Zytoplasma initiiert wird. Innerhalb der Josephindomäne im *ATXN3* Gen liegen zwei solcher Kernexportsignale (NES), das NES 71 und das NES 141 (Antony et al. 2009; Macedo-Ribeiro et al. 2009). Der Haplotyp A, der mit einem früheren Auftreten der Erstsymptome verbunden ist, könnte die Exportfunktion durch eine herabgesetzte Affinität zu diesen Kernexportsignalen beeinflussen und so zu einer verstärkten Akkumulation von Ataxin-3 im Zellkern führen. Über die interagierenden Proteine von Exportin 6 ist jedoch wenig bekannt. Es wurde beschrieben, dass das auf Chromosom 14 liegende Protein den Export von Profilin-Aktin Komplexen vermittelt, welche für die Ausbildung und Stabilität des Zytoskeletts wichtig sind (Park, Park, and Lim 2011; Stuken, Hartmann, and Gorlich 2003). Auch Ataxin-3 steht im Verdacht, an der Organisation des Zytoskeletts beteiligt zu sein (Rodrigues et al. 2010). Durch eine Beeinträchtigung der Funktion von Exportin 6 könnte daher die geordnete Struktur der Zelle verloren gehen und dadurch der neurodegenerative Prozess verstärkt werden. Diese Effekte sind jedoch rein spekulativ. Um eine fundierte Aussage über die Auswirkung des Aminosäureaustauschs von Histidin zu Glutamin an Position 737 im Exportin 6 treffen zu können, wurde eine Analyse der Sekundärstruktur durchgeführt. Diese ergab, dass der SNP rs205384 innerhalb einer β -Faltblattstruktur verborgen im Inneren des Proteins liegt. Es befindet sich keine bekannte Proteinbindungsstelle oder funktionell bedeutende Domäne in der Nähe des SNPs. Trotzdem ist es denkbar, dass der SNP durch den Austausch von Histidin zu Glutamin die Stabilität und Struktur des Proteinkerns stört und so zu einer funktionellen Beeinträchtigung führt.

Auch wenn die genauen Mechanismen zum aktuellen Zeitpunkt unklar sind, konnte mit dem SNP im *XPO6* Gen ein neuer genetischer Modifikator der SCA3 identifiziert werden. Zum besseren Verständnis wäre auch in diesem Fall eine funktionelle Bestätigung der Ergebnisse in Zellkultur mit Hilfe modifizierter Expressionskonstrukte von Exportin 6 sinnvoll. Die Identifikation von Importin 4 und Exportin 6 bildet eine Grundlage, um den Einfluss der nukleozytoplasmatischer Transportproteine auf den Verlauf der SCA3 näher zu untersuchen.

6.4.3 Der SNP rs754615 in *CAST* hat keinen Einfluss auf das Erkrankungsalter der SCA3

Die statistische Analyse ergab, dass der SNP im *CAST* Gen keinen signifikanten Einfluss auf das Erkrankungsalter der SCA3 hat. Weder im zweiseitigen t-test noch in der Kovarianzanalyse konnten signifikante Unterschiede festgestellt werden. Der Aminosäureaustausch von Cystein zu Serin scheint keine funktionelle Beeinträchtigung von Calpastatin mit Auswirkungen auf die Proteolyse oder Lokalisation von Ataxin-3 zu bewirken. Das ist überraschend, da Calpastatin in der aktuellen Literatur sehr eng mit der Pathogenese der SCA3 in Verbindung gebracht wird. Calpastatin hemmt Calpain spezifisch und damit die proteolytische Spaltung von Ataxin-3. Ohne seine proteolytische Spaltung ist der nukleozytoplasmatische Transport von Ataxin-3 nicht möglich. Durch die Hemmung von Calpain wird so die Tendenz von Ataxin-3, sich zu Aggregaten zu formieren, gesenkt (Haacke, Hartl, and Breuer 2007). So kann die durch gespaltenes Ataxin-3 hervorgerufene stärkere und schnellere Progression des neurologischen Phänotyps gehemmt werden (Hubener et al. 2013). Dies deutet darauf hin, dass Calpastatin eine besondere Rolle bei der „toxischen Fragment“-Hypothese zukommt. Um zu verstehen, weshalb der SNP keinen Einfluss auf die Pathogenese der SCA3 nimmt, wurde eine Analyse der Sekundärstruktur von Calpastatin durchgeführt. Der SNP liegt, anders als die SNPs in Importin 4 und Exportin 6, ungeschützt an der hydrophilen Oberfläche des Proteins, was den fehlenden funktionellen Einfluss erklären könnte.

7. Ausblick und Fazit

Im Rahmen dieser Arbeit konnten mit den Polymorphismen in Importin 4 und Exportin 6 drei neue genetische Modifikatoren der SCA3 identifiziert und deren signifikanter Einfluss auf das Erkrankungsalter der SCA3 Patienten bewiesen werden.

Aufgrund des starken Einflusses der Polymorphismen rs7146310 und rs11550452 in *IPO4* auf das Erkrankungsalter könnte besonders diesem Gen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der SCA3 zukommen.

Der genaue Zusammenhang ist allerdings unbekannt und sollte im Fokus zukünftiger Forschung stehen. Funktionelle Analysen wie eine Bestätigung in Zellkultur müssten folgen, um Hinweise auf den Mechanismus der Beeinflussung des Erkrankungsalters zu gewinnen. Ein gezieltes Ausschalten des *IPO4* Gens und eine anschließende Untersuchung der Ataxin-3 Lokalisation könnte Aufschluss über die Beteiligung am Kerntransport von Importin-4 geben.

Die Identifikation dieser beiden Proteine stellt einen Ausgangspunkt dar, um den Einfluss der nukleozytoplasmatischen Transportproteine auf den Verlauf der SCA3 und die Möglichkeit, ihn als Therapeutischen Ansatzpunkt zu nutzen, weiter aufzuklären.

Das in dieser Arbeit beschriebene Vorgehen bei der Untersuchung der SNPs könnte helfen, weitere modifizierende Faktoren des Erkrankungsalters der SCA3 zu identifizieren. Vermutlich bestehen weitere genetische, epigenetische und Umweltfaktoren, die das Erkrankungsalter der SCA3 beeinflussen. Diese Faktoren zu präzisieren, wird entscheidend sein, um mehr Erkenntnisse über die Pathogenese der SCA3 zu gewinnen und die Effekte von Substanzen zukünftiger Medikamentöser Ansätze klarer zu definieren.

8. Literaturverzeichnis

8.1 Artikel

- Akpinar, S. 1987. 'Restless legs syndrome treatment with dopaminergic drugs', *Clin Neuropharmacol*, 10: 69-79.
- Alves, S., I. Nascimento-Ferreira, G. Auregan, R. Hassig, N. Dufour, E. Brouillet, M. C. Pedroso de Lima, P. Hantraye, L. Pereira de Almeida, and N. Deglon. 2008. 'Allele-specific RNA silencing of mutant ataxin-3 mediates neuroprotection in a rat model of Machado-Joseph disease', *PLoS One*, 3: e3341.
- Alves, S., I. Nascimento-Ferreira, N. Dufour, R. Hassig, G. Auregan, C. Nobrega, E. Brouillet, P. Hantraye, M. C. Pedroso de Lima, N. Deglon, and L. P. de Almeida. 2010. 'Silencing ataxin-3 mitigates degeneration in a rat model of Machado-Joseph disease: no role for wild-type ataxin-3?', *Hum Mol Genet*, 19: 2380-94.
- Antony, P. M., S. Mantele, P. Mollenkopf, J. Boy, R. H. Kehlenbach, O. Riess, and T. Schmidt. 2009. 'Identification and functional dissection of localization signals within ataxin-3', *Neurobiol Dis*, 36: 280-92.
- Berke, S. J., F. A. Schmiegel, E. R. Brunt, L. M. Ellerby, and H. L. Paulson. 2004. 'Caspase-mediated proteolysis of the polyglutamine disease protein ataxin-3', *J Neurochem*, 89: 908-18.
- Bettencourt, C., and M. Lima. 2011. 'Machado-Joseph Disease: from first descriptions to new perspectives', *Orphanet J Rare Dis*, 6: 35.
- Bettencourt, C., M. Raposo, N. Kazachkova, T. Cymbron, C. Santos, T. Kay, J. Vasconcelos, P. Maciel, K. C. Donis, M. L. Saraiva-Pereira, L. B. Jardim, J. Sequeiros, and M. Lima. 2011. 'The APOE epsilon2 allele increases the risk of earlier age at onset in Machado-Joseph disease', *Arch Neurol*, 68: 1580-3.
- Bichelmeier, U., T. Schmidt, J. Hubener, J. Boy, L. Ruttiger, K. Habig, S. Poths, M. Bonin, M. Knipper, W. J. Schmidt, J. Wilbertz, H. Wolburg, F. Laccone, and O. Riess. 2007. 'Nuclear localization of ataxin-3 is required for the manifestation of symptoms in SCA3: in vivo evidence', *J Neurosci*, 27: 7418-28.
- Bilen, J., and N. M. Bonini. 2007. 'Genome-wide screen for modifiers of ataxin-3 neurodegeneration in Drosophila', *PLoS Genet*, 3: 1950-64.
- Breuer, P., A. Haacke, B. O. Evert, and U. Wullner. 2010. 'Nuclear aggregation of polyglutamine-expanded ataxin-3: fragments escape the cytoplasmic quality control', *J Biol Chem*, 285: 6532-7.
- Bruzzone, C. M., and C. J. Steer. 2015. 'High-resolution melting analysis of single nucleotide polymorphisms', *Methods Mol Biol*, 1310: 5-27.
- Buchner, J. 2002. 'Introduction: the cellular protein folding machinery', *Cell Mol Life Sci*, 59: 1587-8.
- Buhmann, C., A. Bussopulos, and M. Oechsner. 2003. 'Dopaminergic response in Parkinsonian phenotype of Machado-Joseph disease', *Mov Disord*, 18: 219-21.
- Burnett, B., F. Li, and R. N. Pittman. 2003. 'The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin-3 binds polyubiquitylated proteins and has ubiquitin protease activity', *Hum Mol Genet*, 12: 3195-205.
- Cancel, G., I. Gourfinkel-An, G. Stevanin, O. Didierjean, N. Abbas, E. Hirsch, Y. Agid, and A. Brice. 1998. 'Somatic mosaicism of the CAG repeat expansion in spinocerebellar ataxia type 3/Machado-Joseph disease', *Hum Mutat*, 11: 23-7.
- Carvalho, D. R., A. La Rocque-Ferreira, I. M. Rizzo, E. U. Imamura, and C. E. Speck-Martins. 2008. 'Homozygosity enhances severity in spinocerebellar ataxia type 3', *Pediatr Neurol*, 38: 296-9.

Literaturverzeichnis

- Cautain, B., R. Hill, N. de Pedro, and W. Link. 2015. 'Components and regulation of nuclear transport processes', *Febs j*, 282: 445-62.
- Cha, J. H., and L. S. th Dure. 1994. 'Trinucleotide repeats in neurologic diseases: an hypothesis concerning the pathogenesis of Huntington's disease, Kennedy's disease, and spinocerebellar ataxia type I', *Life Sci*, 54: 1459-64.
- Chachami, G., E. Paraskeva, J. M. Mingot, G. G. Braliou, D. Gorlich, and G. Simos. 2009. 'Transport of hypoxia-inducible factor HIF-1alpha into the nucleus involves importins 4 and 7', *Biochem Biophys Res Commun*, 390: 235-40.
- Chai, Y., S. L. Koppenhafer, N. M. Bonini, and H. L. Paulson. 1999. 'Analysis of the role of heat shock protein (Hsp) molecular chaperones in polyglutamine disease', *J Neurosci*, 19: 10338-47.
- Chai, Y., S. L. Koppenhafer, S. J. Shoesmith, M. K. Perez, and H. L. Paulson. 1999. 'Evidence for proteasome involvement in polyglutamine disease: localization to nuclear inclusions in SCA3/MJD and suppression of polyglutamine aggregation in vitro', *Hum Mol Genet*, 8: 673-82.
- Chai, Y., J. Shao, V. M. Miller, A. Williams, and H. L. Paulson. 2002. 'Live-cell imaging reveals divergent intracellular dynamics of polyglutamine disease proteins and supports a sequestration model of pathogenesis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 9310-5.
- Chakraborty, R., M. De Andrade, S. P. Daiger, and B. Budowle. 1992. 'Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications', *Ann Hum Genet*, 56: 45-57.
- Chou, L. S., E. Lyon, and C. T. Wittwer. 2005. 'A comparison of high-resolution melting analysis with denaturing high-performance liquid chromatography for mutation scanning: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene as a model', *Am J Clin Pathol*, 124: 330-8.
- Costa Mdo, C., and H. L. Paulson. 2012. 'Toward understanding Machado-Joseph disease', *Prog Neurobiol*, 97: 239-57.
- De Leener, K., I. Coene, B. Poppe, A. De Paepe, and K. Claes. 2009. 'Genotyping of frequent BRCA1/2 SNPs with unlabeled probes: a supplement to HRMCA mutation scanning, allowing the strong reduction of sequencing burden', *J Mol Diagn*, 11: 415-9.
- de Mattos, E. P., M. Kolbe Musskopf, V. Bielefeldt Leotti, M. L. Saraiva-Pereira, and L. B. Jardim. 2018. 'Genetic risk factors for modulation of age at onset in Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3: a systematic review and meta-analysis', *J Neurol Neurosurg Psychiatry*.
- deSilva, Deepika, and Jana Blackett. 2007. 'Assay: High-Resolution Melting & Unlabeled Probes', *GEN*, 27 No.3.
- DeStefano, A. L., L. A. Cupples, P. Maciel, C. Gaspar, J. Radvany, D. M. Dawson, L. Sudarsky, L. Corwin, P. Coutinho, P. MacLeod, and et al. 1996. 'A familial factor independent of CAG repeat length influences age at onset of Machado-Joseph disease', *Am J Hum Genet*, 59: 119-27.
- Dürr, A., G. Stevanin, G. Cancel, N. Abbas, H. Chneiweiss, Y. Agid, J. Feingold, and A. Brice. 1995. 'Gender equality in Machado-Joseph disease', *Nat Genet*, 11: 118-9.
- Dürr, A., G. Stevanin, G. Cancel, C. Duyckaerts, N. Abbas, O. Didierjean, H. Chneiweiss, A. Benomar, O. Lyon-Caen, J. Julien, M. Serdaru, C. Penet, Y. Agid, and A. Brice. 1996. 'Spinocerebellar ataxia 3 and Machado-Joseph disease: clinical, molecular, and neuropathological features', *Ann Neurol*, 39: 490-9.
- Elenitoba-Johnson, K. S., and S. D. Bohling. 2001. 'Solution-based scanning for single-base alterations using a double-stranded DNA binding dye and fluorescence-melting profiles', *Am J Pathol*, 159: 845-53.
- Ellerby, L. M., A. S. Hackam, S. S. Propp, H. M. Ellerby, S. Rabizadeh, N. R. Cashman, M. A. Trifiro, L. Pinsky, C. L. Wellington, G. S. Salvesen, M. R. Hayden, and D. E. Bredesen. 1999. 'Kennedy's disease: caspase cleavage of the androgen receptor is a crucial event in cytotoxicity', *J Neurochem*, 72: 185-95.

- Emmel, V. E., I. Alonso, L. B. Jardim, M. L. Saraiva-Pereira, and J. Sequeiros. 2011. 'Does DNA methylation in the promoter region of the ATXN3 gene modify age at onset in MJD (SCA3) patients?', *Clin Genet*, 79: 100-2.
- Er, T. K., and J. G. Chang. 2012. 'High-resolution melting: applications in genetic disorders', *Clin Chim Acta*, 414: 197-201.
- Erali, M., R. Palais, and C. Wittwer. 2008. 'SNP genotyping by unlabeled probe melting analysis', *Methods Mol Biol*, 429: 199-206.
- Erali, M., K. V. Voelkerding, and C. T. Wittwer. 2008. 'High resolution melting applications for clinical laboratory medicine', *Exp Mol Pathol*, 85: 50-8.
- Esteves, S., S. Duarte-Silva, L. Naia, A. Neves-Carvalho, A. Teixeira-Castro, A. C. Rego, A. Silva-Fernandes, and P. Maciel. 2015. 'Limited Effect of Chronic Valproic Acid Treatment in a Mouse Model of Machado-Joseph Disease', *PLoS One*, 10: e0141610.
- Etchebehere, E. C., F. Cendes, I. Lopes-Cendes, J. A. Pereira, M. C. Lima, C. R. Sansana, C. A. Silva, M. F. Camargo, A. O. Santos, C. D. Ramos, and E. E. Camargo. 2001. 'Brain single-photon emission computed tomography and magnetic resonance imaging in Machado-Joseph disease', *Arch Neurol*, 58: 1257-63.
- Evers, M. M., L. J. Toonen, and W. M. van Roon-Mom. 2014. 'Ataxin-3 protein and RNA toxicity in spinocerebellar ataxia type 3: current insights and emerging therapeutic strategies', *Mol Neurobiol*, 49: 1513-31.
- Evert, B. O., J. Araujo, A. M. Vieira-Saecker, R. A. de Vos, S. Harendza, T. Klockgether, and U. Wullner. 2006. 'Ataxin-3 represses transcription via chromatin binding, interaction with histone deacetylase 3, and histone deacetylation', *J Neurosci*, 26: 11474-86.
- Franca, M. C., Jr., V. E. Emmel, A. D'Abreu, C. V. Maurer-Morelli, R. Secolin, L. C. Bonadia, M. S. da Silva, A. Nucci, L. B. Jardim, M. L. Saraiva-Pereira, W. Marques, Jr., H. Paulson, and I. Lopes-Cendes. 2012. 'Normal ATXN3 Allele but Not CHIP Polymorphisms Modulates Age at Onset in Machado-Joseph Disease', *Front Neurol*, 3: 164.
- Freibaum, B. D., Y. Lu, R. Lopez-Gonzalez, N. C. Kim, S. Almeida, K. H. Lee, N. Badders, M. Valentine, B. L. Miller, P. C. Wong, L. Petrucelli, H. J. Kim, F. B. Gao, and J. P. Taylor. 2015. 'GGGGCC repeat expansion in C9orf72 compromises nucleocytoplasmic transport', *Nature*, 525: 129-33.
- Gan, S. R., W. Ni, Y. Dong, N. Wang, and Z. Y. Wu. 2015. 'Population genetics and new insight into range of CAG repeats of spinocerebellar ataxia type 3 in the Han Chinese population', *PLoS One*, 10: e0134405.
- Gasset-Rosa, F., C. Chillon-Marinhas, A. Goginashvili, R. S. Atwal, J. W. Artates, R. Tabet, V. C. Wheeler, A. G. Bang, D. W. Cleveland, and C. Lagier-Tourenne. 2017. 'Polyglutamine-Expanded Huntingtin Exacerbates Age-Related Disruption of Nuclear Integrity and Nucleocytoplasmic Transport', *Neuron*, 94: 48-57.e4.
- Giocondo, F., and G. Curcio. 2017. 'Spinocerebellar ataxia: a critical review of cognitive and socio-cognitive deficits', *Int J Neurosci*: 1-10.
- Gochard, A., K. Mondon, B. De Toffol, and A. Autret. 2009. '[Vitamin B12 deficiency and neurological disorders: a case report and literature review]', *Rev Neurol (Paris)*, 165: 1095-8.
- Gotoda, T., N. Yamada, T. Murase, H. Shimano, M. Shimada, K. Harada, M. Kawamura, K. Kozaki, and Y. Yazaki. 1992. 'Detection of three separate DNA polymorphisms in the human lipoprotein lipase gene by gene amplification and restriction endonuclease digestion', *J Lipid Res*, 33: 1067-72.
- Graham, R., M. Liew, C. Meadows, E. Lyon, and C. T. Wittwer. 2005. 'Distinguishing different DNA heterozygotes by high-resolution melting', *Clin Chem*, 51: 1295-8.
- Grima, J. C., J. G. Daigle, N. Arbez, K. C. Cunningham, K. Zhang, J. Ochaba, C. Geater, E. Morozko, J. Stocksdales, J. C. Glatzer, J. T. Pham, I. Ahmed, Q. Peng, H. Wadhwa, O. Pletnikova, J. C. Troncoso, W. Duan, S. H. Snyder, L. P. Ranum, L. M. Thompson, T.

- E. Lloyd, C. A. Ross, and J. D. Rothstein. 2017. 'Mutant Huntingtin Disrupts the Nuclear Pore Complex', *Neuron*, 94: 93-107.e6.
- Gundry, C. N., S. F. Dobrowolski, Y. R. Martin, T. C. Robbins, L. M. Nay, N. Boyd, T. Coyne, M. D. Wall, C. T. Wittwer, and D. H. Teng. 2008. 'Base-pair neutral homozygotes can be discriminated by calibrated high-resolution melting of small amplicons', *Nucleic Acids Res*, 36: 3401-8.
- Haacke, A., S. A. Broadley, R. Boteva, N. Tzvetkov, F. U. Hartl, and P. Breuer. 2006. 'Proteolytic cleavage of polyglutamine-expanded ataxin-3 is critical for aggregation and sequestration of non-expanded ataxin-3', *Hum Mol Genet*, 15: 555-68.
- Haacke, A., F. U. Hartl, and P. Breuer. 2007. 'Calpain inhibition is sufficient to suppress aggregation of polyglutamine-expanded ataxin-3', *J Biol Chem*, 282: 18851-6.
- Hernandez-Avila, C. A., J. Covault, G. Wand, H. Zhang, J. Gelernter, and H. R. Kranzler. 2007. 'Population-specific effects of the Asn40Asp polymorphism at the mu-opioid receptor gene (OPRM1) on HPA-axis activation', *Pharmacogenet Genomics*, 17: 1031-8.
- Herrmann, M. G., J. D. Durtschi, L. K. Bromley, C. T. Wittwer, and K. V. Voelkerding. 2006. 'Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping: cross-platform comparison of instruments and dyes', *Clin Chem*, 52: 494-503.
- Herrmann, M. G., J. D. Durtschi, C. T. Wittwer, and K. V. Voelkerding. 2007. 'Expanded instrument comparison of amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping', *Clin Chem*, 53: 1544-8.
- Horimoto, Y., M. Matsumoto, H. Akatsu, A. Kojima, M. Yoshida, K. Nokura, H. Yuasa, E. Katada, T. Yamamoto, K. Kosaka, Y. Hashizume, H. Yamamoto, and S. Mitake. 2011. 'Longitudinal study on MRI intensity changes of Machado-Joseph disease: correlation between MRI findings and neuropathological changes', *J Neurol*, 258: 1657-64.
- Hu, J., M. Matsui, K. T. Gagnon, J. C. Schwartz, S. Gabillet, K. Arar, J. Wu, I. Bezprozvanny, and D. R. Corey. 2009. 'Allele-specific silencing of mutant huntingtin and ataxin-3 genes by targeting expanded CAG repeats in mRNAs', *Nat Biotechnol*, 27: 478-84.
- Hubener, J., J. J. Weber, C. Richter, L. Honold, A. Weiss, F. Murad, P. Breuer, U. Wullner, P. Bellstedt, F. Paquet-Durand, J. Takano, T. C. Saido, O. Riess, and H. P. Nguyen. 2013. 'Calpain-mediated ataxin-3 cleavage in the molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3)', *Hum Mol Genet*, 22: 508-18.
- Ichikawa, Y., J. Goto, M. Hattori, A. Toyoda, K. Ishii, S. Y. Jeong, H. Hashida, N. Masuda, K. Ogata, F. Kasai, M. Hirai, P. Maciel, G. A. Rouleau, Y. Sakaki, and I. Kanazawa. 2001. 'The genomic structure and expression of MJD, the Machado-Joseph disease gene', *J Hum Genet*, 46: 413-22.
- Igarashi, S., Y. Takiyama, G. Cancel, E. A. Rogaeva, H. Sasaki, A. Wakisaka, Y. X. Zhou, H. Takano, K. Endo, K. Sanpei, M. Oyake, H. Tanaka, G. Stevanin, N. Abbas, A. Durr, E. I. Rogaev, R. Sherrington, T. Tsuda, M. Ikeda, E. Cassa, M. Nishizawa, A. Benomar, J. Julien, J. Weissenbach, G. X. Wang, Y. Agid, P. H. St George-Hyslop, A. Brice, and S. Tsuji. 1996. 'Intergenerational instability of the CAG repeat of the gene for Machado-Joseph disease (MJD1) is affected by the genotype of the normal chromosome: implications for the molecular mechanisms of the instability of the CAG repeat', *Hum Mol Genet*, 5: 923-32.
- Ilg, W., M. Synofzik, D. Brotz, S. Burkard, M. A. Giese, and L. Schols. 2009. 'Intensive coordinative training improves motor performance in degenerative cerebellar disease', *Neurology*, 73: 1823-30.
- Iwabuchi, K., K. Tsuchiya, T. Uchihara, and S. Yagishita. 1999. 'Autosomal dominant spinocerebellar degenerations. Clinical, pathological, and genetic correlations', *Rev Neurol (Paris)*, 155: 255-70.
- Jakel, S., J. M. Mingot, P. Schwarzmaier, E. Hartmann, and D. Gorlich. 2002. 'Importins fulfil a dual function as nuclear import receptors and cytoplasmic chaperones for exposed basic domains', *Embo j*, 21: 377-86.

Literaturverzeichnis

- Jung, J., K. Xu, D. Lessing, and N. M. Bonini. 2009. 'Preventing Ataxin-3 protein cleavage mitigates degeneration in a Drosophila model of SCA3', *Hum Mol Genet*, 18: 4843-52.
- Kawaguchi, Y., T. Okamoto, M. Taniwaki, M. Aizawa, M. Inoue, S. Katayama, H. Kawakami, S. Nakamura, M. Nishimura, I. Akiguchi, and et al. 1994. 'CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1', *Nat Genet*, 8: 221-8.
- Kawakami, H., H. Maruyama, S. Nakamura, Y. Kawaguchi, A. Kakizuka, M. Doyu, and G. Sobue. 1995. 'Unique features of the CAG repeats in Machado-Joseph disease', *Nat Genet*, 9: 344-5.
- Kazachkova, N., M. Raposo, A. Ramos, R. Montiel, and M. Lima. 2017. 'Promoter Variant Alters Expression of the Autophagic BECN1 Gene: Implications for Clinical Manifestations of Machado-Joseph Disease', *Cerebellum*.
- Kieling, C., P. R. Prestes, M. L. Saraiva-Pereira, and L. B. Jardim. 2007. 'Survival estimates for patients with Machado-Joseph disease (SCA3)', *Clin Genet*, 72: 543-5.
- Kim, H. J., and J. P. Taylor. 2017. 'Lost in Transportation: Nucleocytoplasmic Transport Defects in ALS and Other Neurodegenerative Diseases', *Neuron*, 96: 285-97.
- Kim, Y. J., Y. Yi, E. Sapp, Y. Wang, B. Cuiffo, K. B. Kegel, Z. H. Qin, N. Aronin, and M. DiFiglia. 2001. 'Caspase 3-cleaved N-terminal fragments of wild-type and mutant huntingtin are present in normal and Huntington's disease brains, associate with membranes, and undergo calpain-dependent proteolysis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 12784-9.
- Klaes, A., E. Reckziegel, M. C. Franca, Jr., T. J. Rezende, L. M. Vedolin, L. B. Jardim, and J. A. Saute. 2016. 'MR Imaging in Spinocerebellar Ataxias: A Systematic Review', *AJNR Am J Neuroradiol*, 37: 1405-12.
- Koch, P., P. Breuer, M. Peitz, J. Jungverdorben, J. Kesavan, D. Poppe, J. Doerr, J. Ladewig, J. Mertens, T. Tuting, P. Hoffmann, T. Klockgether, B. O. Evert, U. Wullner, and O. Brustle. 2011. 'Excitation-induced ataxin-3 aggregation in neurons from patients with Machado-Joseph disease', *Nature*, 480: 543-6.
- Lang, A. E., E. A. Rogaeva, T. Tsuda, J. Hutterer, and P. St George-Hyslop. 1994. 'Homozygous inheritance of the Machado-Joseph disease gene', *Ann Neurol*, 36: 443-7.
- Lei, L. F., G. P. Yang, J. L. Wang, D. M. Chuang, W. H. Song, B. S. Tang, and H. Jiang. 2016. 'Safety and efficacy of valproic acid treatment in SCA3/MJD patients', *Parkinsonism Relat Disord*, 26: 55-61.
- Lerer, I., D. Merims, D. Abeliovich, J. Zlotogora, and N. Gadoth. 1996. 'Machado-Joseph disease: correlation between the clinical features, the CAG repeat length and homozygosity for the mutation', *Eur J Hum Genet*, 4: 3-7.
- Lerman, L. S., and K. Silverstein. 1987. 'Computational simulation of DNA melting and its application to denaturing gradient gel electrophoresis', *Methods Enzymol*, 155: 482-501.
- Li, F., T. Macfarlan, R. N. Pittman, and D. Chakravarti. 2002. 'Ataxin-3 is a histone-binding protein with two independent transcriptional corepressor activities', *J Biol Chem*, 277: 45004-12.
- Lieveld, M., A. Carregosa, I. Benoy, N. Redzic, M. Berth, and D. Vanden Broeck. 2017. 'A high resolution melting (HRM) technology-based assay for cost-efficient clinical detection and genotyping of herpes simplex virus (HSV)-1 and HSV-2', *J Virol Methods*, 248: 181-86.
- Liew, M., R. Pryor, R. Palais, C. Meadows, M. Erali, E. Lyon, and C. Wittwer. 2004. 'Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons', *Clin Chem*, 50: 1156-64.
- Liew, M., M. Seipp, J. Durtschi, R. L. Margraf, S. Dames, M. Erali, K. Voelkerding, and C. Wittwer. 2007. 'Closed-tube SNP genotyping without labeled probes/a comparison between unlabeled probe and amplicon melting', *Am J Clin Pathol*, 127: 341-8.
- Lima, L., and P. Coutinho. 1980. 'Clinical criteria for diagnosis of Machado-Joseph disease: report of a non-Azorena Portuguese family', *Neurology*, 30: 319-22.

Literaturverzeichnis

- Lima, M., M. C. Costa, R. Montiel, A. Ferro, C. Santos, C. Silva, C. Bettencourt, A. Sousa, J. Sequeiros, P. Coutinho, and P. Maciel. 2005. 'Population genetics of wild-type CAG repeats in the Machado-Joseph disease gene in Portugal', *Hum Hered*, 60: 156-63.
- Liu, Y., and Y. Ye. 2012. 'Roles of p97-associated deubiquitinases in protein quality control at the endoplasmic reticulum', *Curr Protein Pept Sci*, 13: 436-46.
- Long, Z., Z. Chen, C. Wang, F. Huang, H. Peng, X. Hou, D. Ding, W. Ye, J. Wang, Q. Pan, J. Li, K. Xia, B. Tang, T. Ashizawa, and H. Jiang. 2015. 'Two novel SNPs in ATXN3 3' UTR may decrease age at onset of SCA3/MJD in Chinese patients', *PLoS One*, 10: e0117488.
- Lv, Z., W. Tian, Q. Ma, Y. Hao, and Y. Yang. 2017. 'Interactions between four gene polymorphisms and their association with patients with Parkinson's disease in a Chinese Han population', *Int J Neurosci*, 127: 1154-60.
- Ma, J., C. Wu, J. Lei, and X. Zhang. 2014. 'Cognitive impairments in patients with spinocerebellar ataxia types 1, 2 and 3 are positively correlated to the clinical severity of ataxia symptoms', *Int J Clin Exp Med*, 7: 5765-71.
- Macedo-Ribeiro, S., L. Cortes, P. Maciel, and A. L. Carvalho. 2009. 'Nucleocytoplasmic shuttling activity of ataxin-3', *PLoS One*, 4: e5834.
- Maciel, P., M. C. Costa, A. Ferro, M. Rousseau, C. S. Santos, C. Gaspar, J. Barros, G. A. Rouleau, P. Coutinho, and J. Sequeiros. 2001. 'Improvement in the molecular diagnosis of Machado-Joseph disease', *Arch Neurol*, 58: 1821-7.
- Maciel, P., C. Gaspar, A. L. DeStefano, I. Silveira, P. Coutinho, J. Radvany, D. M. Dawson, L. Sudarsky, J. Guimaraes, J. E. Loureiro, and et al. 1995. 'Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease', *Am J Hum Genet*, 57: 54-61.
- Maeda, M., N. Murayama, H. Ishii, N. Uryu, M. Ota, K. Tsuji, and H. Inoko. 1989. 'A simple and rapid method for HLA-DQA1 genotyping by digestion of PCR-amplified DNA with allele specific restriction endonucleases', *Tissue Antigens*, 34: 290-8.
- Mao, Y., F. Senic-Matuglia, P. P. Di Fiore, S. Polo, M. E. Hodsdon, and P. De Camilli. 2005. 'Deubiquitinating function of ataxin-3: insights from the solution structure of the Josephin domain', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 12700-5.
- Maruyama, H., S. Nakamura, Z. Matsuyama, T. Sakai, M. Doyu, G. Sobue, M. Seto, M. Tsujihata, T. Oh-i, T. Nishio, and et al. 1995. 'Molecular features of the CAG repeats and clinical manifestation of Machado-Joseph disease', *Hum Mol Genet*, 4: 807-12.
- Masino, L., V. Musi, R. P. Menon, P. Fusi, G. Kelly, T. A. Frenkiel, Y. Trottier, and A. Pastore. 2003. 'Domain architecture of the polyglutamine protein ataxin-3: a globular domain followed by a flexible tail', *FEBS Lett*, 549: 21-5.
- Metzger, S., P. Bauer, J. Tomiuk, F. Laccone, S. Didonato, C. Gellera, C. Mariotti, H. W. Lange, H. Weirich-Schwaiger, G. K. Wenning, K. Seppi, B. Melegh, V. Havasi, L. Baliko, S. Wiczorek, J. Zaremba, D. Hoffman-Zacharska, A. Sulek, A. N. Basak, E. Soydan, J. Zidovska, V. Kebrdlova, M. Pandolfo, P. Ribai, L. Kadasi, M. Kvasnicova, B. H. Weber, F. Kreuz, M. Dose, M. Stuhmann, and O. Riess. 2006. 'Genetic analysis of candidate genes modifying the age-at-onset in Huntington's disease', *Hum Genet*, 120: 285-92.
- Metzger, S., P. Bauer, J. Tomiuk, F. Laccone, S. Didonato, C. Gellera, P. Soliveri, H. W. Lange, H. Weirich-Schwaiger, G. K. Wenning, B. Melegh, V. Havasi, L. Baliko, S. Wiczorek, L. Arning, J. Zaremba, A. Sulek, D. Hoffman-Zacharska, A. N. Basak, N. Ersoy, J. Zidovska, V. Kebrdlova, M. Pandolfo, P. Ribai, L. Kadasi, M. Kvasnicova, B. H. Weber, F. Kreuz, M. Dose, M. Stuhmann, and O. Riess. 2006. 'The S18Y polymorphism in the UCHL1 gene is a genetic modifier in Huntington's disease', *Neurogenetics*, 7: 27-30.
- Metzger, S., J. Rong, H. P. Nguyen, A. Cape, J. Tomiuk, A. S. Soehn, P. Propping, Y. Freudenberg-Hua, J. Freudenberg, L. Tong, S. H. Li, X. J. Li, and O. Riess. 2008.

- 'Huntingtin-associated protein-1 is a modifier of the age-at-onset of Huntington's disease', *Hum Mol Genet*, 17: 1137-46.
- Miyauchi, Y., T. Michigami, N. Sakaguchi, T. Sekimoto, Y. Yoneda, J. W. Pike, M. Yamagata, and K. Ozono. 2005. 'Importin 4 is responsible for ligand-independent nuclear translocation of vitamin D receptor', *J Biol Chem*, 280: 40901-8.
- Montgomery, J., C. T. Wittwer, R. Palais, and L. Zhou. 2007. 'Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis', *Nat Protoc*, 2: 59-66.
- Mueller, T., P. Breuer, I. Schmitt, J. Walter, B. O. Evert, and U. Wullner. 2009. 'CK2-dependent phosphorylation determines cellular localization and stability of ataxin-3', *Hum Mol Genet*, 18: 3334-43.
- Nicastro, G., R. P. Menon, L. Masino, P. P. Knowles, N. Q. McDonald, and A. Pastore. 2005. 'The solution structure of the Josephin domain of ataxin-3: structural determinants for molecular recognition', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 10493-8.
- Nijman, S. M., M. P. Luna-Vargas, A. Velds, T. R. Brummelkamp, A. M. Dirac, T. K. Sixma, and R. Bernards. 2005. 'A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes', *Cell*, 123: 773-86.
- Noorani, A., Z. Sadiq, N. Minakaran, C. Coleman, V. A. Thomas, and K. Mokbel. 2008. 'Paraneoplastic cerebellar degeneration as a presentation of breast cancer - a case report and review of the literature', *Int Semin Surg Oncol*, 5: 8.
- Nunes, M. B., A. R. Martinez, T. J. Rezende, J. H. Friedman, I. Lopes-Cendes, A. D'Abreu, and M. C. Franca, Jr. 2015. 'Dystonia in Machado-Joseph disease: Clinical profile, therapy and anatomical basis', *Parkinsonism Relat Disord*, 21: 1441-7.
- Orita, M., H. Iwahana, H. Kanazawa, K. Hayashi, and T. Sekiya. 1989. 'Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86: 2766-70.
- Padiath, Q. S., A. K. Srivastava, S. Roy, S. Jain, and S. K. Brahmachari. 2005. 'Identification of a novel 45 repeat unstable allele associated with a disease phenotype at the MJD1/SCA3 locus', *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 133b: 124-6.
- Palais, R. A., M. A. Liew, and C. T. Wittwer. 2005. 'Quantitative heteroduplex analysis for single nucleotide polymorphism genotyping', *Anal Biochem*, 346: 167-75.
- Park, S. H., T. J. Park, and I. K. Lim. 2011. 'Reduction of exportin 6 activity leads to actin accumulation via failure of RanGTP restoration and NTF2 sequestration in the nuclei of senescent cells', *Exp Cell Res*, 317: 941-54.
- Paulson, H. L., S. S. Das, P. B. Crino, M. K. Perez, S. C. Patel, D. Gotsdiner, K. H. Fischbeck, and R. N. Pittman. 1997. 'Machado-Joseph disease gene product is a cytoplasmic protein widely expressed in brain', *Ann Neurol*, 41: 453-62.
- Paulson, H. L., M. K. Perez, Y. Trottier, J. Q. Trojanowski, S. H. Subramony, S. S. Das, P. Vig, J. L. Mandel, K. H. Fischbeck, and R. N. Pittman. 1997. 'Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinocerebellar ataxia type 3', *Neuron*, 19: 333-44.
- Peng, H., C. Wang, Z. Chen, Z. Sun, B. Jiao, K. Li, F. Huang, X. Hou, J. Wang, L. Shen, K. Xia, B. Tang, and H. Jiang. 2014. 'APOE epsilon2 allele may decrease the age at onset in patients with spinocerebellar ataxia type 3 or Machado-Joseph disease from the Chinese Han population', *Neurobiol Aging*, 35: 2179.e15-8.
- Pozzi, C., M. Valtorta, G. Tedeschi, E. Galbusera, V. Pastori, A. Bigi, S. Nonnis, E. Grassi, and P. Fusi. 2008. 'Study of subcellular localization and proteolysis of ataxin-3', *Neurobiol Dis*, 30: 190-200.
- Reed, G. H., J. O. Kent, and C. T. Wittwer. 2007. 'High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics', *Pharmacogenomics*, 8: 597-608.
- Reed, G. H., and C. T. Wittwer. 2004. 'Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis', *Clin Chem*, 50: 1748-54.
- Reina, C. P., X. Zhong, and R. N. Pittman. 2010. 'Proteotoxic stress increases nuclear localization of ataxin-3', *Hum Mol Genet*, 19: 235-49.

Literaturverzeichnis

- Riess, O., U. Rub, A. Pastore, P. Bauer, and L. Schols. 2008. 'SCA3: neurological features, pathogenesis and animal models', *Cerebellum*, 7: 125-37.
- Robitaille, Y., I. Lopes-Cendes, M. Becher, G. Rouleau, and A. W. Clark. 1997. 'The neuropathology of CAG repeat diseases: review and update of genetic and molecular features', *Brain Pathol*, 7: 901-26.
- Rodrigues, A. J., M. do Carmo Costa, T. L. Silva, D. Ferreira, F. Bajanca, E. Logarinho, and P. Maciel. 2010. 'Absence of ataxin-3 leads to cytoskeletal disorganization and increased cell death', *Biochim Biophys Acta*, 1803: 1154-63.
- Romano, S., G. Coarelli, C. Marcotulli, L. Leonardi, F. Piccolo, M. Spadaro, M. Frontali, M. Ferraldeschi, M. C. Vulpiani, F. Ponzelli, M. Salvetti, F. Orzi, A. Petrucci, N. Vanacore, C. Casali, and G. Ristori. 2015. 'Riluzole in patients with hereditary cerebellar ataxia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial', *Lancet Neurol*, 14: 985-91.
- Rub, U., E. R. Brunt, and T. Deller. 2008. 'New insights into the pathoanatomy of spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease)', *Curr Opin Neurol*, 21: 111-6.
- Rub, U., R. A. de Vos, E. R. Brunt, T. Sebesteny, L. Schols, G. Auburger, J. Bohl, E. Ghebremedhin, K. Gierga, K. Seidel, W. den Dunnen, H. Heinsen, H. Paulson, and T. Deller. 2006. 'Spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3): thalamic neurodegeneration occurs independently from thalamic ataxin-3 immunopositive neuronal intranuclear inclusions', *Brain Pathol*, 16: 218-27.
- Rub, U., L. Schols, H. Paulson, G. Auburger, P. Kermer, J. C. Jen, K. Seidel, H. W. Korf, and T. Deller. 2013. 'Clinical features, neurogenetics and neuropathology of the polyglutamine spinocerebellar ataxias type 1, 2, 3, 6 and 7', *Prog Neurobiol*, 104: 38-66.
- Sakai, T., and H. Kawakami. 1996. 'Machado-Joseph disease: A proposal of spastic paraplegic subtype', *Neurology*, 46: 846-7.
- Sanchez, J. A., K. E. Pierce, J. E. Rice, and L. J. Wangh. 2004. 'Linear-after-the-exponential (LATE)-PCR: an advanced method of asymmetric PCR and its uses in quantitative real-time analysis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 1933-8.
- Sanchez Mejia, R. O., and R. M. Friedlander. 2001. 'Caspases in Huntington's disease', *Neuroscientist*, 7: 480-9.
- Schmidt, J., T. Schmidt, M. Golla, L. Lehmann, J. J. Weber, J. Hubener-Schmid, and O. Riess. 2016. 'In vivo assessment of riluzole as a potential therapeutic drug for spinocerebellar ataxia type 3', *J Neurochem*, 138: 150-62.
- Schmidt, T., G. B. Landwehrmeyer, I. Schmitt, Y. Trottier, G. Auburger, F. Laccone, T. Klockgether, M. Volpel, J. T. Epplen, L. Schols, and O. Riess. 1998. 'An isoform of ataxin-3 accumulates in the nucleus of neuronal cells in affected brain regions of SCA3 patients', *Brain Pathol*, 8: 669-79.
- Schmidt, T., K. S. Lindenberg, A. Krebs, L. Schols, F. Laccone, J. Herms, M. Rechsteiner, O. Riess, and G. B. Landwehrmeyer. 2002. 'Protein surveillance machinery in brains with spinocerebellar ataxia type 3: redistribution and differential recruitment of 26S proteasome subunits and chaperones to neuronal intranuclear inclusions', *Ann Neurol*, 51: 302-10.
- Schmitt, I., M. Linden, H. Khazneh, B. O. Evert, P. Breuer, T. Klockgether, and U. Wuellner. 2007. 'Inactivation of the mouse Atxn3 (ataxin-3) gene increases protein ubiquitination', *Biochem Biophys Res Commun*, 362: 734-9.
- Schmitz-Hubsch, T., M. Coudert, P. Bauer, P. Giunti, C. Globas, L. Baliko, A. Filla, C. Mariotti, M. Rakowicz, P. Charles, P. Ribai, S. Szymanski, J. Infante, B. P. van de Warrenburg, A. Durr, D. Timmann, S. Boesch, R. Fancellu, R. Rola, C. Depondt, L. Schols, E. Zdienicka, J. S. Kang, S. Dohlinger, B. Kremer, D. A. Stephenson, B. Melegh, M. Pandolfo, S. di Donato, S. T. du Montcel, and T. Klockgether. 2008. 'Spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6: disease severity and nonataxia symptoms', *Neurology*, 71: 982-9.

- Schöls, L., G. Amoiridis, T. Buttner, H. Przuntek, J. T. Epplen, and O. Riess. 1997. 'Autosomal dominant cerebellar ataxia: phenotypic differences in genetically defined subtypes?', *Ann Neurol*, 42: 924-32.
- Schöls, L., G. Amoiridis, J. T. Epplen, M. Langkafel, H. Przuntek, and O. Riess. 1996. 'Relations between genotype and phenotype in German patients with the Machado-Joseph disease mutation', *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 61: 466-70.
- Schöls, L., P. Bauer, T. Schmidt, T. Schulte, and O. Riess. 2004. 'Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis', *Lancet Neurol*, 3: 291-304.
- Schöls, L., J. Haan, O. Riess, G. Amoiridis, and H. Przuntek. 1998. 'Sleep disturbance in spinocerebellar ataxias: is the SCA3 mutation a cause of restless legs syndrome?', *Neurology*, 51: 1603-7.
- Schöls, L., M. Reimold, K. Seidel, C. Globas, K. Brockmann, T. K. Hauser, G. Auburger, K. Burk, W. den Dunnen, G. Reischl, H. W. Korf, E. R. Brunt, and U. Rub. 2015. 'No parkinsonism in SCA2 and SCA3 despite severe neurodegeneration of the dopaminergic substantia nigra', *Brain*, 138: 3316-26.
- Schulz, J. B., J. Borkert, S. Wolf, T. Schmitz-Hubsch, M. Rakowicz, C. Mariotti, L. Schols, D. Timmann, B. van de Warrenburg, A. Durr, M. Pandolfo, J. S. Kang, A. G. Mandly, T. Nagele, M. Grisoli, R. Boguslawska, P. Bauer, T. Klockgether, and T. K. Hauser. 2010. 'Visualization, quantification and correlation of brain atrophy with clinical symptoms in spinocerebellar ataxia types 1, 3 and 6', *Neuroimage*, 49: 158-68.
- Seidel, K., S. Siswanto, E. R. Brunt, W. den Dunnen, H. W. Korf, and U. Rub. 2012. 'Brain pathology of spinocerebellar ataxias', *Acta Neuropathol*, 124: 1-21.
- Shao, J., and M. I. Diamond. 2007. 'Polyglutamine diseases: emerging concepts in pathogenesis and therapy', *Hum Mol Genet*, 16 Spec No. 2: R115-23.
- Simoës, A. T., N. Goncalves, A. Koeppen, N. Deglon, S. Kugler, C. B. Duarte, and L. Pereira de Almeida. 2012. 'Calpastatin-mediated inhibition of calpains in the mouse brain prevents mutant ataxin 3 proteolysis, nuclear localization and aggregation, relieving Machado-Joseph disease', *Brain*, 135: 2428-39.
- Simoës, A. T., N. Goncalves, R. J. Nobre, C. B. Duarte, and L. Pereira de Almeida. 2014. 'Calpain inhibition reduces ataxin-3 cleavage alleviating neuropathology and motor impairments in mouse models of Machado-Joseph disease', *Hum Mol Genet*, 23: 4932-44.
- Slomka, M., M. Sobalska-Kwapis, M. Wachulec, G. Bartosz, and D. Strapagiel. 2017. 'High Resolution Melting (HRM) for High-Throughput Genotyping-Limitations and Caveats in Practical Case Studies', *Int J Mol Sci*, 18.
- Smith, B. L., C. P. Lu, and J. R. Alvarado Bremer. 2010. 'High-resolution melting analysis (HRMA): a highly sensitive inexpensive genotyping alternative for population studies', *Mol Ecol Resour*, 10: 193-6.
- Sobue, G., M. Doyu, N. Nakao, N. Shimada, T. Mitsuma, H. Maruyama, S. Kawakami, and S. Nakamura. 1996. 'Homozygosity for Machado-Joseph disease gene enhances phenotypic severity', *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 60: 354-6.
- Soniat, M., and Y. M. Chook. 2015. 'Nuclear localization signals for four distinct karyopherin-beta nuclear import systems', *Biochem J*, 468: 353-62.
- Souza, G. N., N. Kersting, A. C. Krum-Santos, A. S. Santos, G. V. Furtado, D. Pacheco, T. A. Goncalves, J. A. Saute, L. Schuler-Faccini, E. P. Mattos, M. L. Saraiva-Pereira, and L. B. Jardim. 2016. 'Spinocerebellar ataxia type 3/Machado-Joseph disease: segregation patterns and factors influencing instability of expanded CAG transmissions', *Clin Genet*, 90: 134-40.
- Sowa, A. S., E. Martin, I. M. Martins, J. Schmidt, R. Depping, J. J. Weber, F. Rother, E. Hartmann, M. Bader, O. Riess, H. Tricoire, and T. Schmidt. 2018. 'Karyopherin alpha-3 is a key protein in the pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 3 controlling the nuclear localization of ataxin-3', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115: E2624-e33.

- Steffan, J. S., A. Kazantsev, O. Spasic-Boskovic, M. Greenwald, Y. Z. Zhu, H. Gohler, E. E. Wanker, G. P. Bates, D. E. Housman, and L. M. Thompson. 2000. 'The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 6763-8.
- Stuven, T., E. Hartmann, and D. Gorlich. 2003. 'Exportin 6: a novel nuclear export receptor that is specific for profilin.actin complexes', *Embo j*, 22: 5928-40.
- Suite, N. D., J. Sequeiros, and G. M. McKhann. 1986. 'Machado-Joseph disease in a Sicilian-American family', *J Neurogenet*, 3: 177-82.
- Sun, Y. M., C. Lu, and Z. Y. Wu. 2016. 'Spinocerebellar ataxia: relationship between phenotype and genotype - a review', *Clin Genet*.
- Tait, D., M. Riccio, A. Sittler, E. Scherzinger, S. Santi, A. Ognibene, N. M. Maraldi, H. Lehrach, and E. E. Wanker. 1998. 'Ataxin-3 is transported into the nucleus and associates with the nuclear matrix', *Hum Mol Genet*, 7: 991-7.
- Takiyama, Y., M. Nishizawa, H. Tanaka, S. Kawashima, H. Sakamoto, Y. Karube, H. Shimazaki, M. Soutome, K. Endo, S. Ohta, and et al. 1993. 'The gene for Machado-Joseph disease maps to human chromosome 14q', *Nat Genet*, 4: 300-4.
- Taylor, C. F. 2009. 'Mutation scanning using high-resolution melting', *Biochem Soc Trans*, 37: 433-7.
- Taylor, C. F., and G. R. Taylor. 2004. 'Current and emerging techniques for diagnostic mutation detection: an overview of methods for mutation detection', *Methods Mol Med*, 92: 9-44.
- Teixeira-Castro, A., M. Ailion, A. Jalles, H. R. Brignull, J. L. Vilaca, N. Dias, P. Rodrigues, J. F. Oliveira, A. Neves-Carvalho, R. I. Morimoto, and P. Maciel. 2011. 'Neuron-specific proteotoxicity of mutant ataxin-3 in *C. elegans*: rescue by the DAF-16 and HSF-1 pathways', *Hum Mol Genet*, 20: 2996-3009.
- Teixeira-Castro, A., A. Jalles, S. Esteves, S. Kang, L. da Silva Santos, A. Silva-Fernandes, M. F. Neto, R. M. Brielmann, C. Bessa, S. Duarte-Silva, A. Miranda, S. Oliveira, A. Neves-Carvalho, J. Bessa, T. Summavielle, R. B. Silverman, P. Oliveira, R. I. Morimoto, and P. Maciel. 2015. 'Serotonergic signalling suppresses ataxin 3 aggregation and neurotoxicity in animal models of Machado-Joseph disease', *Brain*, 138: 3221-37.
- Tezenas du Montcel, S., A. Durr, P. Bauer, K. P. Figueroa, Y. Ichikawa, A. Brussino, S. Forlani, M. Rakowicz, L. Schols, C. Mariotti, B. P. van de Warrenburg, L. Orsi, P. Giunti, A. Filla, S. Szymanski, T. Klockgether, J. Berciano, M. Pandolfo, S. Boesch, B. Melegh, D. Timmann, P. Mandich, A. Camuzat, J. Goto, T. Ashizawa, C. Cazeneuve, S. Tsuji, S. M. Pulst, A. Brusco, O. Riess, A. Brice, and G. Stevanin. 2014. 'Modulation of the age at onset in spinocerebellar ataxia by CAG tracts in various genes', *Brain*, 137: 2444-55.
- The Huntington's Disease Collaborative Research Group, T. 1993. 'A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group', *Cell*, 72: 971-83.
- Tindall, E. A., D. C. Petersen, P. Woodbridge, K. Schipany, and V. M. Hayes. 2009. 'Assessing high-resolution melt curve analysis for accurate detection of gene variants in complex DNA fragments', *Hum Mutat*, 30: 876-83.
- Tost, J., and I. G. Gut. 2002. 'Genotyping single nucleotide polymorphisms by mass spectrometry', *Mass Spectrom Rev*, 21: 388-418.
- Trottier, Y., G. Cancel, I. An-Gourfinkel, Y. Lutz, C. Weber, A. Brice, E. Hirsch, and J. L. Mandel. 1998. 'Heterogeneous intracellular localization and expression of ataxin-3', *Neurobiol Dis*, 5: 335-47.
- Tsuji, S., O. Onodera, J. Goto, and M. Nishizawa. 2008. 'Sporadic ataxias in Japan--a population-based epidemiological study', *Cerebellum*, 7: 189-97.
- Tucker, E. J., and B. L. Huynh. 2014. 'Genotyping by high-resolution melting analysis', *Methods Mol Biol*, 1145: 59-66.

- Tuite, P. J., E. A. Rogaeva, P. H. St George-Hyslop, and A. E. Lang. 1995. 'Dopa-responsive parkinsonism phenotype of Machado-Joseph disease: confirmation of 14q CAG expansion', *Ann Neurol*, 38: 684-7.
- Tzvetkov, N., and P. Breuer. 2007. 'Josephin domain-containing proteins from a variety of species are active de-ubiquitination enzymes', *Biol Chem*, 388: 973-8.
- van de Warrenburg, B. P., H. Hendriks, A. Durr, M. C. van Zuijlen, G. Stevanin, A. Camuzat, R. J. Sinke, A. Brice, and B. P. Kremer. 2005. 'Age at onset variance analysis in spinocerebellar ataxias: a study in a Dutch-French cohort', *Ann Neurol*, 57: 505-12.
- van de Warrenburg, B. P., R. J. Sinke, C. C. Verschuuren-Bemelmans, H. Scheffer, E. R. Brunt, P. F. Ippel, J. A. Maat-Kievit, D. Dooijes, N. C. Notermans, D. Lindhout, N. V. Knoers, and H. P. Kremer. 2002. 'Spinocerebellar ataxias in the Netherlands: prevalence and age at onset variance analysis', *Neurology*, 58: 702-8.
- van der Stoep, N., C. D. van Paridon, T. Janssens, P. Krenkova, A. Stambergova, M. Macek, G. Matthijs, and E. Bakker. 2009. 'Diagnostic guidelines for high-resolution melting curve (HRM) analysis: an interlaboratory validation of BRCA1 mutation scanning using the 96-well LightScanner', *Hum Mutat*, 30: 899-909.
- Vernino, S. 2012. 'Paraneoplastic cerebellar degeneration', *Handb Clin Neurol*, 103: 215-23.
- Vossen, R. H., E. Aten, A. Roos, and J. T. den Dunnen. 2009. 'High-resolution melting analysis (HRMA): more than just sequence variant screening', *Hum Mutat*, 30: 860-6.
- Wahyuningsih, H., K. Cayami F, U. Bahrudin, A. Sobirin M, F. Ep Mundhofir, S. Mh Faradz, and I. Hisatome. 2017. 'Optimization of PCR Condition: The First Study of High Resolution Melting Technique for Screening of APOA1 Variance', *Yonago Acta Med*, 60: 24-30.
- Wang, C., H. Peng, J. Li, D. Ding, Z. Chen, Z. Long, Y. Peng, X. Zhou, W. Ye, K. Li, Q. Xu, S. Ai, C. Song, L. Weng, R. Qiu, K. Xia, B. Tang, and H. Jiang. 2017. 'Alteration of methylation status in the ATXN3 gene promoter region is linked to the SCA3/MJD', *Neurobiol Aging*, 53: 192.e5-92.e10.
- Warrick, J. M., L. M. Morabito, J. Bilen, B. Gordesky-Gold, L. Z. Faust, H. L. Paulson, and N. M. Bonini. 2005. 'Ataxin-3 suppresses polyglutamine neurodegeneration in Drosophila by a ubiquitin-associated mechanism', *Mol Cell*, 18: 37-48.
- Wellington, C. L., L. M. Ellerby, A. S. Hackam, R. L. Margolis, M. A. Trifiro, R. Singaraja, K. McCutcheon, G. S. Salvesen, S. S. Propp, M. Bromm, K. J. Rowland, T. Zhang, D. Rasper, S. Roy, N. Thornberry, L. Pinsky, A. Kakizuka, C. A. Ross, D. W. Nicholson, D. E. Bredesen, and M. R. Hayden. 1998. 'Caspase cleavage of gene products associated with triplet expansion disorders generates truncated fragments containing the polyglutamine tract', *J Biol Chem*, 273: 9158-67.
- Wittwer, C. T. 2009. 'High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations', *Hum Mutat*, 30: 857-9.
- Wittwer, C. T., G. H. Reed, C. N. Gundry, J. G. Vandersteen, and R. J. Pryor. 2003. 'High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen', *Clin Chem*, 49: 853-60.
- Wojdacz, T. K., A. Dobrovic, and L. L. Hansen. 2008. 'Methylation-sensitive high-resolution melting', *Nat Protoc*, 3: 1903-8.
- Wu, Y., Y. Peng, and Y. Wang. 2015. 'An insight into advances in the pathogenesis and therapeutic strategies of spinocerebellar ataxia type 3', *Rev Neurosci*, 26: 95-104.
- Xiao, W., and P. J. Oefner. 2001. 'Denaturing high-performance liquid chromatography: A review', *Hum Mutat*, 17: 439-74.
- Xu, P., W. Lin, F. Liu, A. Tartakoff, and T. Tao. 2017. 'Competitive regulation of IPO4 transcription by ELK1 and GABP', *Gene*, 613: 30-38.
- Yamada, M., S. Hayashi, S. Tsuji, and H. Takahashi. 2001. 'Involvement of the cerebral cortex and autonomic ganglia in Machado-Joseph disease', *Acta Neuropathol*, 101: 140-4.

Literaturverzeichnis

- Yamada, M., C. F. Tan, C. Inenaga, S. Tsuji, and H. Takahashi. 2004. 'Sharing of polyglutamine localization by the neuronal nucleus and cytoplasm in CAG-repeat diseases', *Neuropathol Appl Neurobiol*, 30: 665-75.
- Zhang, Y. J., T. F. Gendron, J. C. Grima, H. Sasaguri, K. Jansen-West, Y. F. Xu, R. B. Katzman, J. Gass, M. E. Murray, M. Shinohara, W. L. Lin, A. Garrett, J. N. Stankowski, L. Daugherty, J. Tong, E. A. Perkerson, M. Yue, J. Chew, M. Castanedes-Casey, A. Kurti, Z. S. Wang, A. M. Liesinger, J. D. Baker, J. Jiang, C. Lagier-Tourenne, D. Edbauer, D. W. Cleveland, R. Rademakers, K. B. Boylan, G. Bu, C. D. Link, C. A. Dickey, J. D. Rothstein, D. W. Dickson, J. D. Fryer, and L. Petrucelli. 2016. 'C9ORF72 poly(GA) aggregates sequester and impair HR23 and nucleocytoplasmic transport proteins', *Nat Neurosci*, 19: 668-77.
- Zhang, Y., M. Zhang, F. Yu, S. Lu, H. Sun, H. Tang, and Z. Peng. 2015. 'Karyopherin alpha 2 is a novel prognostic marker and a potential therapeutic target for colon cancer', *J Exp Clin Cancer Res*, 34: 145.
- Zhong, X., and R. N. Pittman. 2006. 'Ataxin-3 binds VCP/p97 and regulates retrotranslocation of ERAD substrates', *Hum Mol Genet*, 15: 2409-20.
- Zhou, L., R. J. Errigo, H. Lu, M. A. Poritz, M. T. Seipp, and C. T. Wittwer. 2008. 'Snapback primer genotyping with saturating DNA dye and melting analysis', *Clin Chem*, 54: 1648-56.
- Zhou, L., A. N. Myers, J. G. Vandersteen, L. Wang, and C. T. Wittwer. 2004. 'Closed-tube genotyping with unlabeled oligonucleotide probes and a saturating DNA dye', *Clin Chem*, 50: 1328-35.
- Zhou, L., L. Wang, R. Palais, R. Pryor, and C. T. Wittwer. 2005. 'High-resolution DNA melting analysis for simultaneous mutation scanning and genotyping in solution', *Clin Chem*, 51: 1770-7.

8.2 Bücher

- Lüllmann-Rauch R. (2015). Lehrbuch Histologie. (S. 184-220) (5.Auflage) Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Seyffert, W. (1998). Lehrbuch der Genetik. (S. 483-488) Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Sitzer M., Steinmetz H. (2011). Lehrbuch Neurologie. (S. 22-48) (1.Auflage) Urban&Fischer Verlag, München

8.3 Internetquellen

- Bird T.D. (2012). Hereditary ataxia overview. Online über URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1138/>. URL abgerufen am 30.12.2016.
- Klockgether, T. (2012): Ataxien des Erwachsenenalters. AWMF-Registernummer: 030/031 Online über URL: <http://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/030-031.html>. URL abgerufen am 21.11.2016.
- Bundesgesundheitsministerium (2017): Seltene Erkrankungen. Online über URL: <https://www.bundesgesundheitsministerium.de/themen/praevention/gesundheitsgefahren/seltene-erkrankungen.html> URL abgerufen am 04.02.2017

9. Eidestattliche Erklärung

Die Arbeit wurde im Institut für Medizinische Genetik und angewandte Genomik der Universität Tübingen unter Betreuung von Prof. Rieß durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Thorsten Schmidt.

Sämtliche Versuche wurden von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Beratung durch das Institut für Biometrie durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinem Doktorvater Professor Dr. Olaf Rieß für die kritische Durchsicht und die Ratschläge zu dieser Arbeit danken.

Mein großer Dank gilt außerdem Privatdozentin R. Schüle-Freyer für die freundliche Bereitschaft, diese Arbeit als Gutachterin zu betreuen.

Ich möchte mich herzlich bei meinem Betreuer Herrn Dr. Thorsten Schmidt bedanken, der das Vertrauen hatte, mich mit dieser anspruchsvollen experimentellen Doktorarbeit zu betrauen. Danke für deine wertvollen Ratschläge, deine große Geduld und die Bereitschaft, Probleme jeder Zeit gemeinsam zu diskutieren.

Ein besonderer Dank geht an Frau Professor Dr. Marlies Knipper. Mit Ihrem großen Engagement und der mitreißenden Begeisterung für die Forschung sind Sie für alle IZKF Promovenden ein Vorbild. Vielen Dank, dass Sie mir die Möglichkeit gegeben haben, mich für die Zeit des Promotionskollegs ausschließlich auf mein Forschungsprojekt zu konzentrieren.

Meinen Kollegen aus der Arbeitsgruppe und der gesamten Abteilung möchte ich für deren immerwährende Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima danken. Insbesondere Matthias Golla, Zinah Wassouf, Carolin Walter, Daniel Weißhäupl und Janine Magg, auf deren Unterstützung ich stets zählen konnte.

Danksagung

Mein Dank gilt weiterhin den Promovenden des IZKF Kollegs für den anregenden Austausch und die spannenden Einblicke in andere Forschungsgebiete. Unsere Seminarwochenenden ließen die Herausforderung, eine aufwendige Dissertation parallel zu Studium und Beruf zu meistern, wesentlich kleiner erscheinen.

Nicht zuletzt möchte ich Frau Dr. Kathrin Hoffmann danken, ohne deren Leidenschaft für die Biologie und insbesondere die Humangenetik ich diese Dissertation vermutlich nicht begonnen hätte.

Der herzlichste Dank gilt meinen Eltern, ohne die mein Studium und damit diese Dissertation nicht so unbeschwert möglich gewesen wären. Liebe Mama, lieber Papa, danke für eure uneingeschränkte Unterstützung!