

**Spinocerebelläre Ataxie 48:
Mutationssuche im *STIP1 homology and U-box containing protein 1 (STUB1)* Gen
in einem Ataxie- und einem Demenz-Kollektiv**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Patrun, Julia
aus Waiblingen

Gießen 2022

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Institut für Humangenetik

Gutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Dagmar Nolte

Gutachter: Prof. Dr. Dr. med. Hagen Huttner

Tag der Disputation: 05.07.2023

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Befunderhebung am Patienten	1
1.2	Klassifikation der Ataxien	2
1.2.1	Sporadische Ataxien	2
1.2.1.1	Symptomatische Ataxien	2
1.2.1.2	Idiopathisch cerebelläre Ataxien.....	3
1.2.2	Hereditäre Ataxien.....	3
1.2.2.1	Autosomal-rezessive Ataxien	3
1.2.2.2	X-chromosomale Ataxien	5
1.2.2.3	Mitochondriale Ataxien	5
1.2.2.4	Autosomal-dominante Ataxien	5
1.3	Spinocerebelläre Ataxien	6
1.3.1	Klinik der spinocerebellären Ataxien	9
1.3.2	Genetik der spinocerebellären Ataxien.....	11
1.3.3	Therapie der spinocerebellären Ataxien	11
1.4	Spinocerebelläre Ataxie Typ 48.....	11
1.4.1	Klinik der SCA48	12
1.4.2	Demenz als besonderes klinisches Symptom der SCA48	13
1.4.3	Das <i>STUB1</i> -Gen und seine Transkripte.....	13
1.4.3.1	Mutationen in <i>STUB1</i> bei autosomal-rezessivem Erbgang (SCAR16)	14
1.4.3.2	Mutationen in <i>STUB1</i> bei autosomal-dominantem Erbgang (SCA48).....	15
1.4.3.3	Einteilung von genetischen Varianten	16
1.4.4	Struktur und Funktion des CHIP-Proteins.....	17
1.4.5	Tiermodelle.....	19
1.5	Zielsetzung der Arbeit.....	20
2	Material und Methoden.....	21
2.1	Material	21
2.2	Methoden	27
2.2.1	DNA-Extraktion	27
2.2.1.1	Methode	27
2.2.1.2	Durchführung nach dem Spin Protocol von Qiagen	27
2.2.2	RNA-Extraktion.....	28
2.2.2.1	Methode	28
2.2.2.2	Durchführung.....	29
2.2.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	30
2.2.4	PCR.....	30
2.2.4.1	Methode	30
2.2.4.2	PCR des <i>STUB1</i> -Gens.....	33

2.2.4.3	PCR am SCA17-Locus	34
2.2.5	RT-PCR	36
2.2.5.1	Methode	36
2.2.5.2	Durchführung der Umschreibung von RNA in cDNA	36
2.2.5.3	Durchführung der PCR an cDNA	37
2.2.5.4	Haushaltsgen <i>RPL19</i>	38
2.2.6	Agarose-Gelelektrophorese	40
2.2.6.1	Methode	40
2.2.6.2	Durchführung	40
2.2.7	Aufreinigung mittels ExoSAP-IT	41
2.2.7.1	Methode	41
2.2.7.2	Durchführung	42
2.2.8	DNA-Sequenzierung	42
2.2.8.1	Methode	42
2.2.8.2	Durchführung	43
2.2.8.2.1	Vorbereitung der Sequenzierung am SeqStudio-Sequencer	43
2.2.8.2.2	Bedienung des SeqStudio-Sequencers	45
2.2.8.2.3	Sequenzierung über externe Anbieter (Microsynth Göttingen)	45
2.2.9	Auswertung	46
2.2.9.1	Auswertung der Sequenzierung	46
2.2.9.2	Auswertung der Allel-Frequenzen mittels Online-Datenbanken	46
2.2.9.2.1	Referenz-Kollektive für Varianten	47
2.2.9.3	Klassifizierung von Varianten (gutartig bis pathogen) mittels bioinformatischer Vorhersageprogramme und klinischer Datenbanken	48
3	Ergebnisse	50
3.1	Patientenkollektiv	50
3.2	Expression von <i>STUB1</i> in verschiedenen Gewebetypen	51
3.3	Varianten im Ataxie-Kollektiv	52
3.3.1	Varianten vermutlich ohne klinische Relevanz	52
3.3.1.1	5'UTR	53
3.3.1.2	Intron 3	53
3.3.1.3	Intron 4	55
3.3.1.4	Intron 6	55
3.3.2	Varianten mit vermutlich klinischer Relevanz	57
3.3.2.1	Exon 1	57
3.3.2.1.1	Patientenbericht	59
3.3.2.1.2	Stammbaum Pat. 4.1	59
3.3.2.2	Exon 2	61
3.3.2.2.1	Patientenbericht	62
3.3.2.3	Exon 3	63
3.3.2.3.1	Patientenbericht	64
3.3.2.4	Exon 6	65
3.3.2.4.1	Patientenbericht	66
3.3.2.5	Exon 7	66
3.3.2.5.1	Patientenbericht	67

3.3.2.5.2	Stammbaum Pat. 551.1	68
3.4	Varianten im Demenz-Kollektiv.....	68
3.4.1	Variante vermutlich ohne klinische Relevanz	68
3.4.1.1	3'UTR.....	68
3.4.2	Variante mit klinischer Relevanz	69
3.4.2.1	Intron 3.....	69
3.4.2.1.1	Patientenbericht.....	71
3.4.2.1.2	Stammbaum Pat. AD23	72
3.5	Untersuchung der Repeat-Expansionen im <i>TBP</i>-Gen (<i>SCA17</i>-Locus)	73
3.6	Überblick über die klinisch relevanten Varianten und deren Vorhersagen	73
4	Diskussion	76
4.1	Häufigkeit der <i>SCA48</i>	76
4.2	Genetik der <i>SCA48</i>.....	77
4.2.1	Identifizierte <i>STUB1</i> -Varianten im Ataxie- und Demenz-Kollektiv	77
4.2.1.1	Varianten ohne klinische Signifikanz im Ataxie- und Demenz-Kollektiv	77
4.2.1.2	Identifizierung von Varianten mit vermutlich klinischer Relevanz im Ataxie-Kollektiv	77
4.2.1.2.1	Vergleichende klinische Präsentation von <i>STUB1</i> -Varianten im Ataxie-Kollektiv	78
4.2.1.3	Variante mit vermutlich klinischer Relevanz im Demenz-Kollektiv, Klinik	80
4.2.2	Lokalisation und funktionelle Relevanz der Varianten im Ataxie-Kollektiv	82
4.2.2.1	Varianten in der TPR-Domäne	82
4.2.2.2	Variante in der helikalen Haarnadel-Domäne.....	83
4.2.2.3	Varianten in der U-Box.....	84
4.2.3	Lokalisation und funktionelle Relevanz der Variante im Demenz-Kollektiv	85
4.2.3.1	Digene Einflüsse bei <i>SCA48</i>	86
4.2.4	Bedeutung des Vererbungsmodus bei <i>STUB1</i> -Varianten.....	87
4.2.5	Neuropathologie	88
4.2.6	Tiermodelle.....	89
4.2.7	Relevanz von CHIP-Substraten	90
4.3	Molekulargenetische Testung auf <i>SCA48</i>	91
4.4	Ausblick	92
5	Zusammenfassung	93
6	Summary.....	94
7	Abkürzungsverzeichnis	95

7.1	Buchstabencode für Aminosäuren nach IUPAC	99
8	Abbildungsverzeichnis.....	100
9	Tabellenverzeichnis	102
10	Literatur	103
11	Anhang.....	113
12	Publikationsverzeichnis.....	114
13	Ehrenwörtliche Erklärung.....	115
14	Danksagung	116
15	Tabellarischer Lebenslauf.....	117

Die in dieser Arbeit verwendeten Personenbezeichnungen beziehen sich, sofern nicht anders beschrieben, gleichermaßen auf männliche und weibliche Personen.

1 Einleitung

Eine Ataxie wird als beeinträchtigte Koordination der willkürlichen Muskelbewegung definiert. Sie kann durch eine Vielzahl an Ursachen hervorgerufen werden. Meist wird eine Ataxie durch eine cerebelläre Funktionsstörung oder einen beeinträchtigten afferenten Input in das Cerebellum verursacht. (Ashizawa und Xia, 2016) Neben einigen anderen Faktoren können der Erkrankung eine Reihe an genetischen Defekten zugrunde liegen. Wissenschaftliche Fortschritte tragen zu der Identifizierung weiterer neuer genetischer Ursachen und einem besseren Verständnis für wichtige Stoffwechselwege des Cerebellums bei. (Kuo, 2019; Perlman, 1998 updated 2022)

1.1 Befunderhebung am Patienten

Zur Abklärung einer Ataxie ist eine umfassende körperliche neurologische Untersuchung des Patienten notwendig, wobei das Augenmerk auf folgende Untersuchungen gelegt wird: Die Stand- und Gangprüfung wird zur Feststellung einer Gleichgewichtsstörung durchgeführt, wobei eine Gangunsicherheit oft das erste Symptom bei Patienten mit cerebellärer Ataxie ist. (Luo et al., 2017; Kuo, 2019) Zu der Prüfung des Ganges gehört auch der Seiltänzerengang, der ein Gehen unter erschwerten Bedingungen darstellt (Hacke, 2016). Mit dem Fortschreiten der Stadien einer Ataxie-Erkrankung zeigt sich eine verstärkte Tendenz zu einem breitbeinigen Gang mit stark verkürzter Schrittlänge. Die Untersuchung der unteren Extremitäten im Knie-Hacke-Versuch kann Defizite der korrekten Bewegungsausführung aufzeigen. Auch eine Untersuchung der Koordination der Hände kann funktionelle Defizite offenbaren: Im Finger-Nase- oder Finger-Finger-Versuch kann sowohl ein Intentionstremor wie auch eine Dysmetrie nachgewiesen werden. (Kuo, 2019) Bei der Ausführung alternierender Bewegungen der Hände kann sich eine Dysdiadochokinese zeigen (Hacke, 2016). Eine Untersuchung der Augen kann verschiedene Störungen der Augenmuskelbewegungen aufzeigen. Auffälligkeiten in der Sprache sollten erfasst werden. Weitere Symptome können beispielsweise eine Dystonie, Hyperreflexie, Parkinsonismus oder eine sensorische Neuropathie sein. (Kuo, 2019) Der *Scale for the Assessment and Rating of Ataxia*-(SARA)-Score stellt eine Möglichkeit zur Bewertung der Schwere von Ataxien anhand klinischer Untersuchungen dar (Subramony, 2007).

Eine kraniale Bildgebung in Form einer Magnetresonanztomographie (MRT) sollte zu jeder klärenden Diagnostik gehören. Hier lassen sich Aussagen über die Struktur des

Cerebellums treffen und mögliche Ursachen, beispielsweise eine Raumforderung, ausschließen. (Hacke, 2016)

1.2 Klassifikation der Ataxien

Ataxien können ihrer zugrunde liegenden Ursache nach in sporadische oder hereditäre Ataxien aufgeteilt werden. Eine ausführliche Anamnese und körperliche Untersuchung des Patienten sollen klären, wo die Ursache der Ataxie liegt. Die Anamnese gibt wichtige Hinweise auf den Beginn und zeitlichen Verlauf der Symptomatik, weitere Symptome und das Auftreten von ähnlichen Krankheitsfällen in der Familie. Bei einer positiven Familienanamnese liegt eine genetische Ursache nahe, über eine Stammbaumerhebung kann u. U. auf den Erbgang geschlossen werden. (Hacke, 2016)

1.2.1 Sporadische Ataxien

Die sporadischen Ataxien werden in symptomatische und idiopathische cerebelläre Ataxien unterteilt (Hacke, 2016).

1.2.1.1 Symptomatische Ataxien

Symptomatische Ataxien können durch chemische, medikamentöse oder physikalische Noxen sowie metabolische oder immunologische Prozesse ausgelöst werden.

Unter den toxisch bedingten Ataxien ist die alkoholinduzierte cerebelläre Degeneration die häufigste. Chronischer Alkoholabusus kann durch einen Vitamin-B1-Mangel und eine Störung des Kalziumhaushalts zu einer Degeneration des Cerebellums führen, welche sich in einer Stand- und Gangataxie mit Betonung der unteren Extremitäten äußert. Weitere Noxen sind Medikamente mit der Folge einer irreversiblen Ataxie, beispielsweise durch Amiodaron oder bestimmte Zytostatika, und Schwermetalle oder Lösungsmittel. Weiterhin kann der Mangel an Vitamin B1, B12 und E zu einer Ataxie führen. Die Wernicke-Enzephalopathie beruht auf einem Mangel an Vitamin B1 (Thiamin) und führt neben einer Ataxie zu Verwirrtheit und Augenbewegungsstörungen. Der Vitamin-B12-Mangel hat eine betont afferente Ataxie mit sensomotorischer Polyneuropathie und Degeneration des Hinterstrangs des Rückenmarks zur Folge. Ein Vitamin-E-Mangel kann sich durch eine Stand- und Gangataxie und sensible Neuropathie äußern. Eine weitere Genese der Ataxie kann durch immunologische Prozesse vermittelt werden. Durch eine extracerebelläre Tumorerkrankung, beispielsweise der Lunge, der Ovarien oder der Mamma, kann es zu einer paraneoplastischen Degeneration des cerebellären Cortex kommen. Eine Infektion

durch Viren, z. B. Varizella-Zoster-, Röteln-, Epstein-Barr- oder Mumps-Viren, kann als Komplikation zu cerebellären Enzephalitiden mit einer Ataxie führen. Weiterhin bestehen Ataxien durch Infektionen des Zentralen Nervensystems durch z. B. Prionenerkrankungen oder Neuroborreliose. Als physikalische Noxen einer Ataxie wurden beispielsweise eine Sepsis oder ein Hitzschlag beobachtet. (Hacke, 2016)

1.2.1.2 Idiopathisch cerebelläre Ataxien

Die Diagnose einer idiopathischen Ataxie wird gestellt, wenn keine Ursache im Rahmen einer symptomatischen oder hereditären Ataxie gefunden werden konnte. Es ist davon auszugehen, dass auch bisher unbekannte genetische Erkrankungen ursächlich sein können. Das Erscheinungsbild und der Verlauf des Erkrankungsbildes weisen eine hohe Variabilität auf. Klinisch treten eine Stand-, Gang- und Extremitätenataxie auf. Dazu kommen eine Dysarthrie, cerebelläre Störungen in der Okulomotorik, Schluckstörungen und weitere neurologische Symptome. Die cerebelläre Verlaufsform der Multisystematrophie wird zu den idiopathischen Ataxien gezählt. Hier ist das Vorhandensein von autonomen Störungen, z. B. einer Harninkontinenz, typisch. (Hacke, 2016)

1.2.2 Hereditäre Ataxien

Die Gruppe der hereditären Ataxien wird nach ihrem Vererbungsmuster klassifiziert. Sie wird in autosomal-rezessive, autosomal-dominante, X-chromosomale und mitochondriale Ataxien unterteilt. Zusätzlich zur medizinischen Vorgeschichte des Patienten inklusive Familienanamnese, körperlichen Untersuchung und bildgebenden Verfahren stellt die molekulargenetische Testung auf Erbkrankheiten ein wichtiges Verfahren der Diagnostik dar. (Bird, 1998 updated 2019)

1.2.2.1 Autosomal-rezessive Ataxien

Die autosomal-rezessiven Ataxien sind in ihrer genetischen Ursache und Klinik sehr variabel. Gemeinsam ist der meist frühe Erkrankungsbeginn vor dem 20. Lebensjahr. (Hacke, 2016) Ihre Prävalenz liegt bei 3:100.000 (Ruano et al., 2014; Bird, 1998 updated 2019).

Die weltweit am häufigsten auftretende hereditäre Ataxie ist die Friedreich-Ataxie. Die Prävalenz liegt bei 1:20.000 bis 1:125.000. Ursächlich ist eine homozygote GAA-Repeat-Expansion im *FXN*-Gen, das für Frataxin codiert. Ein kleiner Teil der Patienten weist eine compound-heterozygote Form auf, bei der eine GAA-Expansion auf dem

einen und eine Punktmutation auf dem anderen Allel zu finden ist. Das *FXN*-Gen ist wichtig für den Eisenstoffwechsel in Mitochondrien. Die Mutation führt zu einer Ablagerung von Eisen in dem Zellorganell und somit zu einer Störung der Atmungskette und einer geringeren Produktion an Adenosintriphosphat (ATP). Im Vordergrund der Symptomatik steht eine Stand- und Gangataxie, welche progredient verläuft und im Verlauf ebenfalls die oberen Extremitäten betrifft. Hinzu kommen meist eine Dysarthrie, eine Reduktion der Muskeleigenreflexe, Pyramidenbahnzeichen und Störungen der Tiefensensibilität. Der Großteil der Patienten weist Skelettdeformitäten auf, typisch ist beispielsweise der Friedreich-Fuß. Weiterhin können nach einem langen Verlauf ein Seh- und Hörverlust und Blasenstörungen auftreten. Eine ursächliche Therapie ist zu diesem Zeitpunkt nicht vorhanden. Eine kombinierte Gabe von Vitamin E und Coenzym Q10 kann einen positiven Effekt haben. Der mittlere Erkrankungsbeginn liegt bei 15 Jahren (J.) und die mittlere Dauer bis zur Rollstuhlpflicht nach Beginn ebenfalls bei 15 J. (Hacke, 2016)

Weitere relativ häufige autosomal-rezessive Ataxien sind die Ataxie mit okulomotorischer Apraxie (AOA) Typ 1 und 2 und die Ataxia-Telangiectasia. Als spastische Ataxien (engl. *spastic ataxia*, SPAX) werden Erkrankungen bezeichnet, welche ein gemeinsames Auftreten von Zeichen einer cerebellären Ataxie und Spastik haben. Vier von fünf zugeordneten SPAX (SPAX2-5) werden autosomal-rezessiv vererbt, eine Ausnahme bildet die autosomal-dominant vererbte SPAX1. (Bird, 1998 updated 2019)

Hereditäre Ataxien können im Allgemeinen nicht ursächlich behandelt werden. Es existieren vier bekannte autosomal-rezessive Subtypen, welche aufgrund ihrer Pathogenese eine Therapieoption aufweisen und eine Verbesserung der Symptome erzielen können. Dies sind die Ataxie mit Vitamin E-Mangel (engl. *Ataxia with vitamin E deficiency*, AVED), die Refsum-Krankheit, die Zerebro-tendinöse Xanthomatose (engl. *Cerebrotendinous xanthomatosis*, CTX) und die autosomal-rezessive Ataxie assoziiert mit Coenzym Q10-Mangel (autosomal-rezessive spinocerebelläre Ataxie 9, SCAR9). Sie werden mittels einer Gabe von Vitamin E (AVED), von Chenodesoxycholsäure (CTX) und von Coenzym Q10 (SCAR9), oder einer Diät von Phytansäure (Refsum-Krankheit) behandelt. (Bird, 1998 updated 2019)

1.2.2.2 X-chromosomale Ataxien

Das Fragile-X-Tremor-Ataxie-Syndrom (FXTAS) entsteht durch Prämutationen im *Fragile X messenger ribonucleoprotein 1 (FMR1)* Gen auf dem X-Chromosom. Diese bestehen aus CGG-Expansionen in Form von 55 bis 200 Triplets. Die entstehende veränderte *messenger RNA* (mRNA; RNA für Ribonukleinsäure, engl. *ribonucleic acid*) mit vermehrten Triplett-Wiederholungen soll eine toxische Wirkung (*Gain-of-function*) haben. Die Penetranz bei männlichen Trägern der Prämutation ist deutlich höher (ca. 40 %) als bei weiblichen Trägerinnen (16 % ab dem 50. Lebensjahr). Charakteristisch ist ein später Erkrankungsbeginn jenseits des 50. Lebensjahres und ein langsam progredienter Verlauf. Häufige Symptome sind eine cerebelläre Ataxie, ein Aktionstremor, Rigor, Bradykinese und eine Neuropathie. Außerdem können die verbale und nonverbale Intelligenz und exekutive Funktion eingeschränkt sein. Autonome Dysfunktionen in Form von Harn- und Stuhlinkontinenz, Impotenz und orthostatischer Hypotension können auftreten. (Hacke, 2016)

1.2.2.3 Mitochondriale Ataxien

Es treten genetische Mutationen der mitochondrialen Desoxyribonukleinsäure (DNA, engl. *deoxyribonucleic acid*) auf, welche eine progressive Ataxie zur Folge haben können. Dazu zählen die Myoklonusepilepsie mit *ragged-red-fibers* (MERRF), das Neuropathie-Ataxie-Retinopathia-pigmentosa-Syndrom (NARP-Syndrom) und das Kearns-Sayre-Syndrom. Als weitere Symptome wurden Krampfanfälle, Retinopathie, Kardiomyopathie und Diabetes mellitus beobachtet. (Da Pozzo et al., 2009; Bird, 1998 updated 2019) Im mitochondrialen *MTATP6*-Gen konnten Mutationen identifiziert werden, welche sich klinisch durch eine *adult-onset* Ataxie äußern und nur aufgrund dieser Symptomatik nicht von anderen spinocerebellären Ataxien (SCA) unterschieden werden können (Pfeffer et al., 2012).

1.2.2.4 Autosomal-dominante Ataxien

Zu den autosomal-dominant vererbten Ataxien werden die autosomal-dominanten cerebellären Ataxien (engl. *autosomal dominant cerebellar ataxias*, ADCAs), deren Großteil die SCA ausmachen, und die episodischen Ataxien gezählt (Hacke, 2016; Bird, 1998 updated 2019).

Episodische Ataxien äußern sich durch episodische Attacken mit unsicherem Gang, welcher oft mit Dysarthrie oder Nystagmus assoziiert ist. Weiterhin können je nach Subtyp weitere Symptome auftreten, beispielsweise eine Myokymie,

Gleichgewichtsstörungen, ein Hörverlust, Schwindel und Doppelbilder. Die Attacken können Stunden bis Tage andauern. Die Erkrankung beginnt meist vor dem 20. Lebensjahr. (Jen et al., 2007; Bird, 1998 updated 2019; Sullivan et al., 2019)

1.3 Spinocerebelläre Ataxien

Die SCA bilden die häufigste Gruppe der autosomal-dominant vererbten Ataxien (Hacke, 2016). Die Subtypen werden numerisch nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung benannt. Die Prävalenz wird weltweit auf 1-5:100.000 geschätzt. Weltweit ist SCA3 die häufigste Form. (Bird, 1998 updated 2019; Ruano et al., 2014) In Mitteleuropa treten die Typen SCA1, 2, 3 und 6 am häufigsten auf (Hacke, 2016). Die Prävalenz der SCA-Subtypen kann regional variieren, oft aufgrund von Gründereffekten (Bird, 1998 updated 2019).

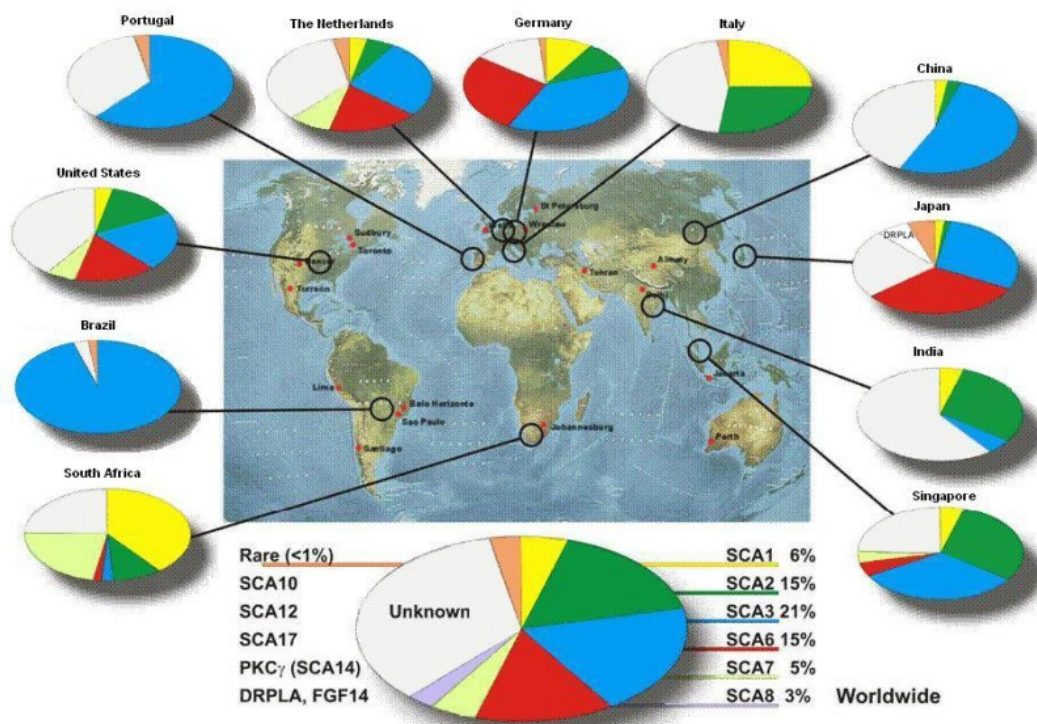


Abbildung 1: Weltweite Verteilung der SCA-Subtypen aus Perlman, 1998 updated 2022.

Die Gruppe der SCAs zeichnet sich durch ein heterogenes Bild an Genotypen und Phänotypen aus. Gemeinsam ist die durch eine Degeneration des Cerebellums bedingte Ataxie. (Sullivan et al., 2019) Die Dentatorubrale-Pallidolysiale Atrophie (DRPLA) stellt einen komplexen Subtyp dar und imitiert Chorea Huntington (Perlman, 1998 updated 2022). In Tabelle 1 sind bisher zugeordnete SCA-Subtypen dargestellt.

Tabelle 1: Überblick über die Genetik der spinocerebellären Ataxien

SCA-Subtyp	Gen	Lokalisation	Protein	Mutation
SCA1	<i>ATXN1</i>	6p22.3	Ataxin-1	CAG-EX
SCA2	<i>ATXN2</i>	12q24,12	Ataxin-2	CAG-EX
SCA3 (MJD)	<i>ATXN3</i>	14q32.12	Ataxin-3	CAG-EX
SCA4	<i>PLEKHG4[†]</i>	16q22.1	Puratrophin-1 [†]	unbekannt
SCA5	<i>SPTBN2</i>	11q13.2	Beta-III-Spectrin	MM, IFD
SCA6	<i>CACNA1A</i>	19p13.13	Spannungsabhängiger Calcium-Kanal-Untereinheit $\alpha 1A$	CAG-EX
SCA7	<i>ATXN7</i>	3p14.1	Ataxin-7	CAG-EX
SCA8	<i>ATXN8/ATXN8OS</i>	13q21	ATXN8OS	CAG/CTG-EX
SCA9	nicht vergeben			
SCA10	<i>ATXN10</i>	22q13.31	Ataxin-10	ATTCT-EX
SCA11	<i>TTBK2</i>	15q15.2	Tau-Tubulin-Kinase 2	FM
SCA12	<i>PPP2R2B</i>	5q32	Serin/Threonin-Protein Phosphatase 2A 55 kDa regulatorische Untereinheit B β -Isoform	CAG-EX
SCA13	<i>KCNC3</i>	19q13.33	Spannungsabhängiger Kaliumkanal Kv3.3	MM
SCA14	<i>PRKCG</i>	19q13.42	Protein Kinase C γ -Typ	MM, IFD
SCA15	<i>ITPR1</i>	3p26.1	Inositol 1,4,5-Trisphosphat-Rezeptor Typ 1	MM, D <i>ITPR1</i>
SCA16	s. SCA15			
SCA17	<i>TBP</i>	6q27	TATA-Box-Bindeprotein	CAG/CAA-EX
SCA18	<i>IFRD1</i>	7q22-q32	Interferon-related developmental regulator 1	MM
SCA19	<i>KCND3</i>	1p21-q21	Spannungsabhängiger Kaliumkanal Kv4.3	MM, D, DU
SCA20	unbekannt	11q12.2-11q12.3	unbekannt	DU
SCA21	<i>TMEM240</i>	7p15.1-21.3	Transmembranprotein 240	MM, NM
SCA22	s. SCA19	AV		
SCA23	<i>PDYN</i>	20p13	Proenkephalin-B	MM
SCA24	nicht vergeben			
SCA25	unbekannt	2p15-21	unbekannt	unbekannt
SCA26	<i>EEF2</i>	19p13.3	Elongationsfaktor 2	MM
SCA27	<i>FGF14</i>	13q33.1	Fibroblasten-Wachstumsfaktor 14	MM

SCA28	<i>AFG3L2</i>	18p11.21	ATPase family gene 3-like 2 (katalytische Untereinheit der mitochondrialen AAA-Protease)	MM, I, D
SCA29	<i>ITPR1</i>	3p26	Inositol 1,4,5-Trisphosphat-Rezeptor Typ 1	MM
SCA30	unbekannt	4q34.3-q35.1	unbekannt	unbekannt
SCA31	<i>BEAN1</i>	16q22.1	BEAN1	I TGGAA-EX
SCA32	unbekannt	7q32-33	unbekannt	unbekannt
SCA33	nicht vergeben			
SCA34	<i>ELOVL4</i>	6q14.1	Elongation of very-long-chain fatty acids protein 4	MM
SCA35	<i>TGM6</i>	20p13	Protein-Glutamin- γ - Glutamyltransferase 6	MM, D
SCA36	<i>NOP56</i>	20p13	Nucleolares Protein 56	GGCCTG-EX
SCA37	<i>DABI</i>	1p32.2	Disabled homolog 1	I ATTTC-EX
SCA38	<i>ELOVL5</i>	6p12.1	Elongation of very-long-chain fatty acids protein 5	MM
SCA39	nicht vergeben			
SCA40	<i>CCDC88C</i>	14q32	Daple (Dvl-associating protein with a high frequency of leucine residues)	MM
SCA41	<i>TRPC3</i>	4q27	Short transient receptor potential channel 3	MM
SCA42	<i>CACNA1G</i>	17q21.33	Spannungsabhängiger Calciumkanal Typ T Untereinheit α -1G	MM
SCA43	<i>MME</i>	3q25.2	Neprilysin	MM
SCA44	<i>GRM1</i>	6q24.3	Metabotroper Glutamatrezeptor 1	MM
SCA45	<i>FAT2</i>	5q33.1	Protocadherin Fat 2	MM
SCA46	<i>PLD3</i>	19q13.2	5'-3' Exonuclease PLD3	MM
SCA47	<i>PUM1</i>	1p35.2	Pumilio Homolog 1	MM
SCA48	<i>STUB1</i>	16p13.3	E3 Ubiquitin-Protein Ligase CHIP	MM, FM
SCA49	<i>SAMD9L</i>	7q21.2	Sterile α motif domain-containing protein 9-like	MM
DRPLA	<i>ATN1</i>	12p13.31	Atrophin-1	CAG-EX

Mit † markierte Angaben sind nicht bestätigt. AV = allelische Variante, D = Deletion, DRPLA = Dentatorubrale-Pallidolysiale Atrophie (engl. *dentatorubral-pallidolysian atrophy*), DU = Duplikation, EX = Expansion, FM = *Frameshift*-Mutation, I = Insertion, IFD = *In-frame*-Deletion, MJD = Machado-Joseph-Krankheit (engl. *Machado-Joseph disease*), MM = *Missense*-Mutation, NM = *Nonsense*-Mutation. Tabelle modifiziert nach Bird, 1998 updated 2019; ergänzt durch Brkanac et al., 2009; Huang et al., 2012; Guo et al., 2014; Storey und Gardner, 2007 updated 2019; UniProt Consortium, 2021; OMIM, 2022; Corral-Juan et al., 2022.

1.3.1 Klinik der spinocerebellären Ataxien

Das klinische Erscheinungsbild der SCA ist durch eine Stand- und Gangataxie gekennzeichnet. Es besteht ein cerebelläres Syndrom, welches eine Störung der cerebellären Okulomotorik beinhaltet. Diese kann sich durch eine sakkadierte Blickfolge, eine Sakkadendysmetrie, einen Blickrichtungsnystagmus und eine gestörte Fixationssuppression des vestibulo-okulären Reflexes zeigen. Außerdem kann es zu Paresen der Augenmuskeln mit Doppelbildern, supranukleären Blickparesen und einer Sakkadenverlangsamung kommen. (Hacke, 2016) Typisch ist ebenfalls eine Dysarthrie (Sullivan et al., 2019). Im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung können Schluckstörungen auftreten. Störungen der Pyramidenbahn, Dystonie und eine Neuropathie, vorwiegend durch Schädigung der sensiblen Fasern, wurden ebenfalls beobachtet. Kognitiv zeigen die Patienten meist eine leichte Form der Beeinträchtigung, vorwiegend der fronto-exekutiven Funktionen. Verschiedene Formen der SCA können mit epileptischen Anfällen einhergehen. (Hacke, 2016) Mit bestimmten SCA-Subtypen assoziierte Symptome sind in Tabelle 2 dargestellt.

In der kranialen Bildgebung von SCA-Patienten mittels MRT zeigt sich eine typische Atrophie des Kleinhirns; das Großhirn, die Basalganglien, der Hirnstamm und das Rückenmark können ebenfalls betroffen sein (Hacke, 2016). Die Degeneration neuronaler Strukturen fällt je nach SCA-Subtyp unterschiedlich aus. In bestimmten Subtypen, z. B. der SCA6, ist die pathologische Veränderung relativ auf das Cerebellum beschränkt (Soong und Morrison, 2018). Durch eine Untersuchung der Nervenleitgeschwindigkeit, der Elektroneurographie, kann meist eine sensible und sensomotorische axonale Neuropathie festgestellt werden. Eine Messung der visuell evozierten Potenziale, der akustisch evozierten Hirnstammpotenziale und der somatosensibel evozierten Potenziale kann meist als pathologisch bewertet werden. (Hacke, 2016)

Tabelle 2: Klinische Symptome der SCA-Subtypen neben einer cerebellären Ataxie

Assoziierte klinische Merkmale	SCA-Subtyp
Periphere Neuropathie	1, 2, 3, 4, 10, 18, 25, 38, 43, 46, 49
Pyramidenbahnzeichen	1, 3, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 15, 17, 20, 34, 35, 40, 42, 43, 49
Dystonie	2, 3, 14, 17, 20, 28, 35, 48
Myoklonie	14, DRPLA
Parkinsonismus	2, 3, 10, 14, 17, 19/22, 21, 28, 43, 48
Tremor	1, 5, 12, 14, 15, 19/22, 20, 21, 23, 26, 27, 29, 35, 40, 42, 48
Chorea	1, 2, 17, 27, 48, DRPLA
Kognitive Beeinträchtigung	1, 2, 8, 10, 12, 13, 14, 15, 17, 19/22, 21, 27, 28, 29, 32, 35, 36, 42, 44, 48, DRPLA
Psychiatrische Symptome	2, 17, 27, 48
Ophthalmoplegie	1, 2, 3, 7, 8, 28, 40
Sehschwäche	7
Faszikulationen des Gesichts/der Zunge	36
Ichthyosiforme Plaques	34
Krampfanfälle	7, 10, 13, 19/22, 48, DRPLA
Hörverlust	31, 36
Dysarthrie	1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 14, 15, 19/22, 20, 21, 23, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 34, 35, 36, 37, 40, 42, 48, 49
Dysphagie	1, 2, 3, 4, 6, 10, 15, 19/22, 21, 38

Tabelle modifiziert nach Sullivan et al., 2019; ergänzt durch Soong und Morrison, 2018; Genis et al., 2018; De Michele et al., 2019; Lieto et al., 2020; Corral-Juan et al., 2022.

Die verschiedenen Subtypen der SCAs können klinisch schwer unterschieden werden, da die häufigste Symptomatik aller SCAs in einer Kombination aus progressiver Gangataxie und Dysarthrie besteht. Aus diesem Grund stellt die molekulargenetische Testung den entscheidenden diagnostischen Schritt zur Unterscheidung der SCAs dar. (Bird, 1998 updated 2019)

1.3.2 Genetik der spinocerebellären Ataxien

Die Gruppe der SCA zeigt unterschiedliche pathologische genetische Mechanismen auf. Die häufigen Typen einer SCA werden durch Repeat-Expansionen von CAG-Triplets oder seltener durch andere Nukleotide verursacht. (Soong und Morrison, 2018) Unter europäischen SCA-Patienten sind fast die Hälfte der Diagnosen auf Repeat-Expansionen zurückzuführen (Sullivan et al., 2019). Diese können in exonischen oder intronischen Bereichen liegen. Im Falle der häufigsten SCA, 1, 2, 3, 6 und 17, handelt es sich um Wiederholungen des Triplets CAG in den exonischen Bereichen des jeweiligen Gens. Der Großteil der SCAs weist genetisch instabile Repeat-Expansionen auf. (Hacke, 2016) SCAs mit CAG-Trinukleotid-Repeats können eine Antizipation aufweisen. Es kommt hierbei zu einem früheren Krankheitsbeginn und einem erhöhten Schweregrad der Erkrankung in der nachfolgenden Generation. Grund ist eine Zunahme der CAG-Triplets bei der Vererbung. (Perlman, 1998 updated 2022) Seltene Typen einer SCA werden durch Einzelnukleotid-Varianten (engl. *single-nucleotide variants*) verursacht (Soong und Morrison, 2018).

1.3.3 Therapie der spinocerebellären Ataxien

Bisher ist keine ursächliche Therapie der spinocerebellären Ataxie etabliert. Zur Verlangsamung der Symptomatik und Verbesserung der motorischen Fähigkeiten werden Physiotherapie und Logopädie empfohlen. Zusätzlich können je nach spezifischer Symptomatik gezielt Symptome behandelt werden. Dazu zählen eine Epilepsie, Spastik, Parkinson-Symptomatik, Dystonie oder ein Restless-Legs-Syndrom. Die Patienten sollen mit Hilfsmitteln versorgt werden. (Hacke, 2016) Beispielsweise können Gehhilfen oder Rollstühle bei einer Gang-Ataxie unterstützend eingesetzt werden. Bei schweren Sprachproblemen können Computerprogramme bei der Kommunikation helfen. (Perlman, 1998 updated 2022)

1.4 Spinocerebelläre Ataxie Typ 48

Die spinocerebelläre Ataxie 48 (SCA48) ist auf verschiedene heterozygote Mutationen im humanen *STIP1 homology and U-box containing protein 1 (STUB1)* Gen zurückzuführen (Genis et al., 2018). Homozygote oder compound-heterozygote Mutationen im selben Gen treten im Rahmen der SCAR16 auf (Shi et al., 2013; Shi et al., 2014).

1.4.1 Klinik der SCA48

Bei der ersten von Genis et al. für eine SCA48 beschriebenen spanischen Familie stellte eine kognitive Beeinträchtigung im Sinne eines cerebellär kognitiv-affektiven Syndroms (engl. *cerebellar cognitive affective syndrome*, CCAS) die früheste und prominenteste klinische Manifestation dar. Jahre nach Beginn des CCAS manifestierte sich eine *late-onset* Ataxie. Im MRT ließ sich durch einen Vergleich von betroffenen Familienmitgliedern in verschiedenen Stadien beobachten, dass sich eine Atrophie progressiv auf das gesamte Cerebellum ausweitete. Der Beginn der cerebellären Atrophie trat vor der Manifestation klinischer Symptome auf. (Genis et al., 2018) Nach der Erstbeschreibung konnte der SCA48-Phänotyp durch weitere Veröffentlichungen anderer Patienten als heterogenes und komplexes neurologisches Krankheitsbild etabliert werden. In einer Übersichtsarbeit lag das mittlere Erkrankungsalter bei ca. $42,3 \pm 8,8$ J. Die Ataxie besteht als häufigstes und oft als erstes Symptom; an zweithäufigster Stelle steht die kognitive Dysfunktion. (Lieto et al., 2020; De Michele et al., 2020) Die kognitive Beeinträchtigung in Form eines demenziellen Prozesses prägt das Krankheitsbild vieler Patienten, ist jedoch nicht bei allen SCA-Patienten beschrieben und kann sowohl als vorausgehendes Symptom auftreten als auch erst nach Jahren bestehen (Mol et al., 2020; Roux et al., 2020; Pakdaman et al., 2021a; Ravel et al., 2021; Umamo et al., 2022). Zudem treten psychiatrische Symptome auf; der Großteil der Patienten zeigt Verhaltensauffälligkeiten (De Michele et al., 2019; De Michele et al., 2020). Weitere neurologische Symptome sind eine Epilepsie, Dystonie, Chorea, Parkinsonismus, Dysarthrie, Augenbewegungsstörungen und ideomotorische Apraxie, die in unterschiedlicher Kombination und Ausprägung vorliegen können (De Michele et al., 2019; Lieto et al., 2020; Palvadeau et al., 2020; Roux et al., 2020; Magri et al., 2022). Ein Hypogonadismus wurde nur vereinzelt beschrieben (Lieto et al., 2020). Die charakteristisch im MRT beschriebene cerebelläre Atrophie konnte bereits in Gehirnautopsien von SCA48-Patienten bestätigt werden. Hierbei wurde ein starker Verlust von Purkinjezellen nachgewiesen. In einzelnen Untersuchungen wurde eine über das Cerebellum hinausgehende neuronale Degeneration festgestellt, beispielsweise kam es zu schweren Neuronenverlusten in Mesencephalon und Medulla oblongata oder einer milden kortikalen Atrophie. (Chen et al., 2020; Mol et al., 2020; Roux et al., 2020)

1.4.2 Demenz als besonderes klinisches Symptom der SCA48

Die vielfach im Rahmen des klinischen Erscheinungsbildes beschriebene demenzielle Symptomatik ist als besonderes Merkmal der SCA48 hervorzuheben. Sie kann sowohl der Ataxie vorausgehen als auch den Phänotyp dominieren. (Genis et al., 2018; De Michele et al., 2019; Palvadeau et al., 2020; Roux et al., 2020) Zur Einordnung der Symptomatik ist die Demenz folgend dargestellt. Sie beschreibt das Auftreten einer Bewusstseinsstörung mit mindestens einer weiteren kognitiven Störung wie Aphasie, Apraxie, Agnosie oder Störungen der Exekutivfunktionen. Die Symptome müssen mindestens sechs Monate lang bestehen, um die klinische Diagnose stellen zu können. Durch die Defizite kommt es zu Beeinträchtigungen im Alltag Betroffener. Die häufigsten Demenzerkrankungen sind die Alzheimer-Demenz, vaskuläre Demenz, Demenz mit Lewy-Körperchen und die frontotemporale Demenz. (Hacke, 2016) Bei einer familiären Vorbelastung von Patienten mit einer früh manifestierenden Alzheimer-Demenz können Mutationen in dem *Präsenilin-1*-Gen (*PSEN1*), *Amyloid-Präkursorprotein*-Gen (*APP*) oder *Präsenilin-2*-Gen (*PSEN2*) gefunden werden (Bird, 1998 updated 2018). Weiterhin gibt es eine Vielzahl an neurodegenerativen Erkrankungen, welche mit einer Demenz einhergehen (Hacke, 2016). Auch bei weiteren spinocerebellären Ataxien kann in seltenen Fällen ein demenzielles Syndrom beobachtet werden, das in der Regel jedoch mild ausgeprägt ist (Bird, 1998 updated 2019).

1.4.3 Das *STUB1*-Gen und seine Transkripte

Das humane *STUB1*-Gen codiert für das *carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein* (CHIP), welches als Chaperon an der korrekten Faltung von Substraten beteiligt ist und eine Ubiquitin-Ligase-Aktivität aufweist (Ballinger et al., 1999; Jiang et al., 2001). Das Gen (Ensembl Gen-ID: ENSG00000103266) ist auf dem Vorwärtsstrang des Chromosoms 16 (Chromosom 16: 680,224-682,870) lokalisiert. Für *STUB1* werden 11 Transkripte angegeben, darunter sechs proteincodierende. In dieser Arbeit wurde das Transkript *STUB1-201* (Transkript-ID: ENST00000219548.9, Lokalisation Chromosom 16: 680,410-682,801) untersucht. Dieses weist eine Transkriptlänge von 1340 Basenpaaren (Bp) und sieben codierende Exone auf. In Datenbanken wie *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) lässt sich das Transkript des *STUB1*-Gens mittels der Referenzsequenz NM_005861.4 (NCBI) aufrufen und das abgeleitete Protein ist in UniProt unter der ID Q9UNE7 zu finden. (Cunningham et al., 2022)

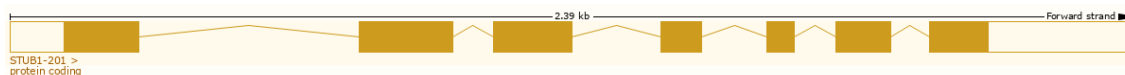


Abbildung 2: Grafik des *STUB1*-Gens, Transkript *STUB1-201*. Die codierenden Exone sind gelb, nicht-codierende Bereiche (Ex1, Ex7) sind weiß dargestellt. Verändert aus Cunningham et al., 2022.

Eine Expression des *STUB1*-Gens lässt sich in diversen humanen Organsystemen und folglich vielen verschiedenen Gewebetypen finden. Im Cerebellum bzw. genauer den Kleinhirnhemisphären lässt sich die höchste Expression darstellen, ebenfalls sehr hoch ist sie im Cortex. Etwas geringer ist die Expression beispielsweise in Arterien, peripherem Nerv, Haut, Colon, Ösophagus, Skelettmuskel, Lunge und subkutanem Fettgewebe. Eine noch geringere Expression ist beispielsweise in Milz, Herz, Niere, Pankreas und Vollblut zu finden. (The GTEx Consortium, 2020; UCSC Genome Browser, 2019 updated 2020; Lee et al., 2022)

1.4.3.1 Mutationen in *STUB1* bei autosomal-rezessivem Erbgang (SCAR16)

Die Rolle des *STUB1*-Gens in Verbindung mit cerebellären Ataxien wurde erstmals durch den Nachweis von homozygot oder compound-heterozygot vorliegenden Mutationen in *STUB1* beschrieben (Shi et al., 2013; Shi et al., 2014). Dieser autosomal-rezessive Ataxie-Subtyp wird SCAR16 genannt. Andere Arbeitsgruppen identifizierten weitere *STUB1*-Mutationen; bis dato (Stand: November 2022) sind ca. 40 SCAR16-Varianten bekannt (Heimdal et al., 2014; Synofzik et al., 2014; Shi et al., 2014; Depondt et al., 2014; Kawarai et al., 2016; Hayer et al., 2017; Sun et al., 2019; Roux et al., 2020; Ravel et al., 2021). Eine Übersicht der bekannten SCAR16-Varianten ist in Tabelle 22 dargestellt (s. Anhang). Ein Teil dieser Varianten ist im heterozygoten Status mit SCA48 assoziiert. SCAR16-Mutationen führen zu unterschiedlich ausgeprägten Ataxie-assoziierten Krankheitsbildern. Auffällig ist ein früher Erkrankungsbeginn mit einem in einer Übersichtsarbeit dargestellten mittleren Erkrankungsalter von $20,4 \pm 13,9$ J. (De Michele et al., 2020). Eine kognitive Dysfunktion, das zweithäufigste Symptom neben einer Ataxie, ist charakteristisch mit einer cerebellären Degeneration assoziiert. Daneben können u. a. ein Hypogonadismus, eine periphere Neuropathie und Spastik auftreten. (Shi et al., 2014; Hayer et al., 2017; De Michele et al., 2020) Es bestehen hiervon abweichende Beschreibungen, welche die Breite des klinischen Phänotyps demonstrieren (Synofzik et al., 2014).

1.4.3.2 Mutationen in *STUB1* bei autosomal-dominantem Erbgang (SCA48)

Genis et al. beschrieben SCA48 erstmals als einen neuen Subtypen der SCA. Die heterozygote Variante c.823_824delCT im *STUB1*-Gen wurde bei einer spanischen Familie identifiziert. (Genis et al., 2018) Weitere bis heute (Stand: November 2022) bekannte pathogene *STUB1*-Varianten sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 3: Bekannte SCA48-Mutationen im *STUB1*-Gen

Variante	AS-Austausch	Exon (Intron)	Erstbeschreibende Publikation
c.3G>T	p.Met1?	1	(Magri et al., 2022)
c.3G>A	p.Met1?	1	(Mengel et al., 2021)
c.88A>G	p.Lys30Glu	1	(Magri et al., 2022)
c.90G>C	p.Lys30Asn	1	(Choi et al., 2022)
c.97G>A	p.Gly33Ser	1	(De Michele et al., 2019)
c.101A>G	p.Asn34Ser	1	(Magri et al., 2022)
c.111C>G	p.Phe37Leu	1	(Chen et al., 2020)
c.125A>G	p.Tyr42Cys	1	(Magri et al., 2022)
c.134C>T	p.Ala45Val	1	(Ravel et al., 2021)
c.136G>C	p.Ala46Pro	1	(Roux et al., 2020)
c.146A>G	p.Tyr49Cys	1	(Roux et al., 2020)
c.152_158delinsCAGC	p.Arg51_Ile53delins ProAla	1	(Pakdaman et al., 2021a)
c.155C>G	p.Ala52Gly	1	(Umano et al., 2022)
c.158T>C	p.Ile53Thr	1	(Chen et al., 2020)
c.159+1G>A	p.?	(1)	(Magri et al., 2022)
c.170C>T	p.Pro57Leu	2	(Lieto et al., 2020)
c.194A>G	p.Asn65Ser	2	(Heimdal et al., 2014) [†] (Roux et al., 2020)
c.197G>C	p.Arg66Pro	2	(Ravel et al., 2021)
c.199G>A	p.Ala67Thr	2	(Lieto et al., 2020)
c.200C>T	p.Ala67Val	2	(Magri et al., 2022)
c.206G>A	p.Cys69Tyr	2	(Roux et al., 2020)
c.221A>C	p.Gln74Pro	2	(Roux et al., 2020)
c.235G>C	p.Ala79Pro	2	(Roux et al., 2020)
c.256G>A	p.Ala86Thr	2	(Magri et al., 2022)
c.274C>T	p.Gln92*	2	(Magri et al., 2022)
c.301G>C	p.Gly101Arg	2	(Roux et al., 2020)
c.338C>A	p.Ala113Asp	2	(Roux et al., 2020)
c.338C>T	p.Ala113Val	2	(Magri et al., 2022)
c.358+2T>C	p.?	(2)	(Roux et al., 2020)
c.393C>G	p.Phe131Leu	3	(Magri et al., 2022)
c.398A>T	p.Asp133Val	3	(Magri et al., 2022)
c.400_402delGAC	p.Asp134del	3	(Magri et al., 2022)
c.426_428del	p.Lys143del	3	(Roux et al., 2020)
c.426_441delinsT	p.Lys143_Trp147del	3	(Pakdaman et al., 2021a)
c.433_435delAAG	p.Lys145del	3	(Magri et al., 2022)
c.433A>C	p.Lys145Gln	3	(Depondt et al., 2014) [†] (Magri et al., 2022)
c.440G>A	p.Trp147*	3	(Roux et al., 2020)
c.460C>T	p.Arg154Cys	3	(Roux et al., 2020)
c.502C>T	p.Leu168Phe	3	(Coutelier et al., 2017) [†] (Roux et al., 2020)
c.524+1G>A	p.?	(3)	(Magri et al., 2022)
c.544C>T	p.Arg182*	4	(Roux et al., 2020)
c.596G>T	p.Cys199Phe	4	(Roux et al., 2020)

c.612+1G>C	p.?	(4)	(Cordoba et al., 2014) [†] (Magri et al., 2022)
c.613-1G>A	p.?	(4)	(Magri et al., 2022)
c.635A>G	p.Asp212Gly	5	(Roux et al., 2020)
c.649C>T	p.Gln217*	5	(Magri et al., 2022)
c.665G>A	p.Arg222Lys	5	(Roux et al., 2020)
c.673C>T	p.Arg225*	6	(Lieto et al., 2020)
c.682C>T	p.Pro228Ser	6	(De Michele et al., 2019)
c.689_692delACCT	p.Tyr230Cysfs*9	6	(Lieto et al., 2020)
c.694 T>G	p.Cys232Gly	6	(Chiu et al., 2020) [†] (Ravel et al., 2021)
c.721C>T	p.Arg241Trp	6	(Lieto et al., 2020)
c.728C>T	p.Pro243Leu	6	(Hayer et al., 2017) [†] (Roux et al., 2020)
c.731_732delGC	p.Cys244Tyrfs*24	6	(Mol et al., 2020)
c.737C>T	p.Thr246Met	6	(Shi et al., 2014) [†] (Magri et al., 2022)
c.746G>T	p.Gly249Val	6	(Pakdaman et al., 2021a)
c.779_786+5del	p.?	6	(Magri et al., 2022)
c.787-2_787del	p.?	(6)/7	(Saft et al., 2021)
c.787-1G>C	p.?	(6)	(Roux et al., 2020)
c.791_792delTG	p.Val264Glyfs*4	7	(Lieto et al., 2020)
c.794G>A	p.Gly265Asp	7	(Roux et al., 2020)
c.805C>A	p.Pro269Thr	7	(Magri et al., 2022)
c.818_819dupGC	p.Pro274Alafs*3	7	(Lieto et al., 2020)
c.823_824delCT	p.Leu275Aspfs*16	7	(Genis et al., 2018)
c.823delC	p.Leu275*	7	(Magri et al., 2022)
c.824delT	p.Leu275Argfs*11	7	(Roux et al., 2020)
c.824T>C	p.Leu275Pro	7	(Magri et al., 2022)
c.832G>T	p.Glu278*	7	(Magri et al., 2022)
c.832delG	p.Glu278Asnfs*9	7	(Chen et al., 2021)
c.849C>G	p.Asn283Lys	7	(Roux et al., 2020)
c.862G>T	p.Glu288*	7	(Magri et al., 2022)
c.866T>G	p.Val289Gly	7	(Magri et al., 2022)

[†]Angabe der Erstbeschreibung bei zuerst rezessiv beschriebenen Varianten. Tabelle zusammengefasst nach Heimdal et al., 2014; Cordoba et al., 2014; Shi et al., 2014; Coutelier et al., 2017; Hayer et al., 2017; Genis et al., 2018; De Michele et al., 2019; Lieto et al., 2020; Roux et al., 2020; Chiu et al., 2020; Chen et al., 2020; Mol et al., 2020; Ravel et al., 2021; Pakdaman et al., 2021a; Mengel et al., 2021; Saft et al., 2021; Chen et al., 2021; Magri et al., 2022; Umamo et al., 2022; Choi et al., 2022.

Die Zuordnung pathogener *STUB1*-Varianten zu SCA48 und bzw. oder SCAR16 ist in einigen Fällen nicht vollständig geklärt. Mehrere Mutationen wurden bereits für beide Vererbungsmuster beschrieben.

1.4.3.3 Einteilung von genetischen Varianten

Um die Auswirkungen identifizierter genetischer Varianten zu beurteilen, erfolgt eine Einteilung in fünf Klassen anhand eines Klassifizierungssystems des *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) (Richards et al., 2015). Diese Klassifizierung wurde auf Varianten in *STUB1* angewendet.

Tabelle 4: Einteilung von genetischen Varianten in fünf Klassen

Klasse 1	<i>benign</i>	Normvariante ohne klinische Relevanz
Klasse 2	<i>likely benign</i>	Wahrscheinliche Normvariante
Klasse 3	<i>variant of uncertain significance (VUS)</i>	Variante unklarer klinischer Relevanz
Klasse 4	<i>likely pathogenic</i>	Wahrscheinlich pathogene Variante
Klasse 5	<i>pathogenic</i>	Pathogene Variante

Tabelle nach Richards et al., 2015.

Das Klassifizierungssystem beinhaltet verschiedene Kriterien (Pathogenität experimentell bestätigt, Häufigkeit, Lokalisation, familiäre Segregation und weitere) für eine Einteilung von Varianten. Diese Kriterien werden unterschiedlich gewichtet und eine definierte Kombination der Kriterien ermöglicht eine Einordnung der Variante in eine der fünf oben genannten Klassen. Beispielsweise kann die Einteilung einer Variante in die fünfte Klasse anhand folgender zwei Kriterien erfolgen: Erstens Null-Variante (z. B. *Nonsense*, *Frameshift*) in einem Gen, in welchem der Funktionsverlust ein bekannter Krankheitsmechanismus ist (PVS1, sehr starkes Kriterium); zweitens gut etablierte funktionelle *in vitro* oder *in vivo* Studien, welche einen schädlichen Effekt auf das Gen oder Genprodukt unterstützen (PS3, starkes Kriterium). Eine Einteilung in die Klasse 1 (*benign*) kann beispielsweise durch das Kriterium der >5 % auftretenden Allelfrequenz in bestimmten Humangenomprojekten (BA1, alleinstehendes Kriterium) erfolgen. (Richards et al., 2015)

1.4.4 Struktur und Funktion des CHIP-Proteins

Das Protein CHIP wurde erstmals von Ballinger et al. aufgrund seiner Tetratricopeptid-Repeat-(TPR-)Domäne identifiziert und nach seiner Bindung an die Carboxyl-Enden der Hitzeschockproteine (Hsp) Hsc70 und Hsp70 benannt (Ballinger et al., 1999). CHIP besteht aus 303 Aminosäuren (AS) (UniProt Consortium, 2021) und ist 35 Kilodalton (kDa) groß (Ballinger et al., 1999). Das Protein stellt eine Verbindung zwischen den zwei Systemen der korrekten Proteinfaltung und des Ubiquitin-vermittelten Proteinabbaus in der Zelle dar (McDonough und Patterson, 2003). Im Vergleich der humanen Aminosäuresequenz von CHIP mit orthologen Sequenzen zeigt sich eine hohe evolutionäre Konservierung insbesondere der TPR-Domäne und des carboxyterminalen Bereichs (Ballinger et al., 1999).

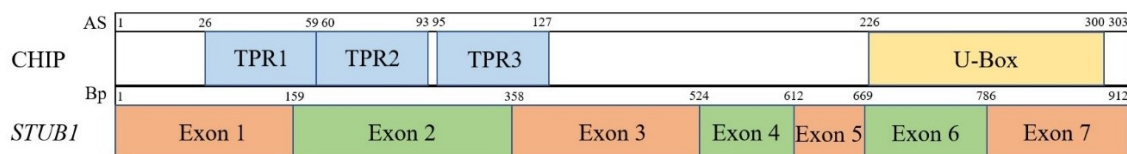


Abbildung 3: Schematische Darstellung von CHIP und seinen funktionellen Domänen sowie der entsprechenden Exone der proteincodierenden Sequenz von *STUB1*. Abbildung nach UniProt Consortium, 2021; Cunningham et al., 2022.

CHIP besteht aus drei Hauptdomänen: einer TPR-Domäne, einer geladenen Domäne und einer U-Box-Domäne (Ballinger et al., 1999). Zhang et al. konnten die Kristallstruktur von CHIP darstellen; anhand der Daten ist eine Zuordnung der *STUB1*-Bp und entsprechenden AS zu den funktionellen Domänen möglich (Zhang et al., 2005). Eine TPR-Domäne besteht aus einem 34-AS-Motiv, welches gewöhnlich in mehrfachen Tandem-Repeats, im Falle von CHIP drei TPR-Domänen, auftritt (Ballinger et al., 1999). Die TPR-Domäne vermittelt die Aufgabe als Chaperon oder Co-Chaperon und die Interaktion mit den Hitzeschockproteinen Hsc70, Hsp70 und Hsp90 (Ballinger et al., 1999; Rosser et al., 2007; Ronnebaum et al., 2014). Hierdurch wird die korrekte Proteinfaltung, Rückfaltung und Aktivität von Substraten gefördert, welche grundlegend für die normale zelluläre Funktion ist (McDonough und Patterson, 2003). Die Dimerisierung und Aktivität des Proteins werden durch die geladene Domäne bestimmt (Nikolay et al., 2004). CHIP formt ein Homodimer zur Bindung an Chaperone (Zhang et al., 2005) und interagiert mittels seiner TPR- und angrenzenden geladenen Domäne mit der Carboxyl-terminalen Domäne von Hsc70 (Ballinger et al., 1999).

Durch die U-Box-Domäne erhält CHIP eine Ubiquitin-(E3)-Ligase-Aktivität (Jiang et al., 2001). Diese ist Teil des Ubiquitin-Proteasom-Stoffwechselwegs, durch welchen die meisten zytosolischen Proteine abgebaut werden. In Zusammenarbeit der Enzyme E1-3 werden Ketten aus Ubiquitin-Molekülen an Zielproteine gehängt, welche dadurch zum Abbau durch das 26S Proteasom markiert sind. E3-Enzyme regulieren die Ubiquitinierung von Proteinen, indem sie zu einer Bindung von Polyubiquitin-Ketten an das abzubauen Zielprotein führen. (Hershko et al., 1983; Parsons et al., 2008; Shi et al., 2014) Es wird angenommen, dass E3-Ligasen die Substratspezifität für die Ubiquitinierung bestimmen (Imai et al., 2002).

Es wird von einer Beteiligung CHIPS an der Regulation, ob ein Protein in Richtung Faltung oder Abbau geleitet wird, ausgegangen. CHIP kann mit Chaperonen agieren und deren Substrate U-Box vermittelt für einen Abbau ubiquitinieren. (Connell et al., 2001; Meacham et al., 2001; Cyr et al., 2002) Zu weiteren Substraten von CHIP zählen

u. a. der Tumorsuppressor p53 und verschiedene mit neurologischen Erkrankungen verbundene Proteine wie phosphoryliertes Tau, α -Synuclein, Leucin-reiche Repeat Kinase 2 (LRRK2), Parkin, Huntingtin und Ataxin-1. CHIP ist in die Abschwächung der Toxizität dieser Proteine eingebunden. (Imai et al., 2002; Shimura et al., 2004; Esser et al., 2005; Shin et al., 2005; Jana et al., 2005; Al-Ramahi et al., 2006; Ko et al., 2009; Ronnebaum et al., 2014) In neurodegenerativen Modellen wie einem *Drosophila*-Modell zeigte sich, dass eine Überexpression von CHIP schützend wirken kann (Al-Ramahi et al., 2006).

1.4.5 Tiermodelle

Bereits vor der Kenntnis über einen Zusammenhang mit hereditären Ataxien wurden verschiedene Mausmodelle zur Untersuchung der CHIP-Funktion etabliert. Eines ist ein Mausmodell von Sahara et al., welches in CHIP-defizienten Mäusen den Zusammenhang zwischen CHIP und der Löslichkeit von Tau untersucht. Hierbei zeigten die Gehirne von sowohl homozygot als auch heterozygot CHIP-defizienten Mäusen erhöhte Level an unlöslichem Tau. Tendenziell ging ein erhöhtes CHIP-Defizit mit einer gesteigerten Menge an unlöslichem Tau einher. Sahara et al. folgerten, dass ein Mangel an CHIP eine Akkumulation von unlöslichem Tau in Mäusen induzieren kann. Eine Expression von CHIP dagegen könnte vor einer abnormalen Aggregation an Tau und der Bildung von neurofibrillären Tangles (NFTs, engl. *neurofibrillary tangles*) schützen. (Sahara et al., 2005)

In einem weiteren Mausmodell von Dai et al. wurden Erkenntnisse über die Rolle von CHIP bei der Reaktion auf zellulären Stress gewonnen. Es wurde gezeigt, dass CHIP zellulär protektiv und antiapoptotisch wirkt. CHIP-defiziente Mäuse, bei welchen die Exone 1-3 aus *STUB1* entfernt wurden, zeigten eine erhöhte perinatale Letalität und eine erhöhte Anzahl an Apoptosen in verschiedenen Organen infolge zellulären Stresses im Vergleich zum Wildtyp. Weiterhin konnte die Arbeitsgruppe in CHIP-überexprimierenden COS7 Zellen zeigen, dass eine Mutation in der TPR-Domäne von CHIP (p.Lys30Ala) zu der Unfähigkeit führte, die im Rahmen der Antwortprozesse auf Stress bedeutende Expression von Hsp70 zu erhöhen. Sowohl der Wildtyp als auch CHIP mit Mutationen im Bereich der U-Box-Domäne (p.Asp253Asn/p.Arg254Gly) dagegen führten zu einer gesteigerten Expression von Hsp70. (Dai et al., 2003)

In einem SCA48-Tiermodell wurde die pathologische *STUB1*-Variante p.Ala52Gly in *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) untersucht. Es konnte eine durch die Variante in

der TPR-Domäne von CHIP ausgelöste Neurodegeneration im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden. (Umano et al., 2022)

1.5 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollen 80 Patientenproben auf genetische Veränderungen im *STUB1*-Gen untersucht werden. Ziel ist, bisher unbekannte pathologische Varianten zu identifizieren, die für eine SCA48 ursächlich sein können. Neben einem klassischen Kollektiv an Ataxie-Patienten (63 Proben) werden zudem ausgewählte Proben eines Demenz-Kollektivs (17 Proben) untersucht. Bei letzterem ließen sich Koordinationsstörungen und/oder Wesensveränderungen vermuten.

Weiterhin soll untersucht werden, in welchen Gewebetypen *STUB1*-Transkripte nachweisbar sind. Ziel ist es, Rückschlüsse auf die Gewebeverteilung von CHIP zu ziehen, da insbesondere das Cerebellum ein volatiles Areal bei der Ausprägung einer SCA darstellt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Chemikalien:

Agarose Basic	AppliChem GmbH
Big Dye Terminator 5x Sequencing Buffer v1.1, v3.1	AppliedBiosystems
Dimethyl Sulfoxid (DMSO)	Sigma Chemical CO.P.O.
Ethanol (96-100 %)	Merck
FastGene 100bp DNA Ladder H3 RTU	Nippon Genetics Europe GmbH
Hi-Di Formamid	AppliedBiosystems
H ₂ O	Sigma-Aldrich
LIZ Größenstandard 600	AppliedBiosystems/Thermo Fisher Scientific
Midori Green Advance DNA Stain	Nippon Genetics Europe GmbH
Nukleotid Mix (1,25 Millimolar (mM) <i>each</i>)	Promega
Sephadex G50 superfine	GE Healthcare
Tris-Puffer 100 mM (pH 7,4)	Merck
10 mM dNTP Mix	Invitrogen
2-Propanol	Merck

Kits:

BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 Kit	AppliedBiosystems
DyeEx 2.0 Spin Kit (50)	Qiagen
Monarch Total RNA Miniprep Kit	New England Biolabs Inc.
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen
SuperScript III Reverse Transcriptase (200 Units/Mikroliter (U/ μ l))	Invitrogen
<i>Taq</i> DNA Polymerase (5000 U) inklusive CoralLoad PCR Buffer 10x,	Qiagen

Q-Solution 5x	
---------------	--

Enzyme:

ExoSAP-IT	AppliedBiosystems/Thermo Fisher Scientific
RNase out (40 U/ μ l)	Invitrogen

Lösungen:

10x TBE (1 Liter (l)) aus: Trizma Base 108,98 Gramm (g) Borsäure 55,6 g 0,5 M EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) 40 Milliliter (ml)	Sigma Merck Sigma
--	-------------------------

Primer:

Primer	Sequenz (5' \rightarrow 3')	Tm (50 mM NaCl)	
Ex1Fneu	5'-GCCCAGTGTCCCCGTCCAG-3'	66,1 °C	Microsynth AG
Ex1Rneu	5'-CGAAGAGGAGCCAGACCCT-3'	61,6 °C	
Ex2F	5'-GTACTCCACTGTGCACAGATCC-3'	64,2 °C	
Ex3Rneu	5'-GCACTCTTCCAGCTCCCTG-3'	61,6 °C	
Ex4F	5'-ACTCCCGACACAAGCGTTTATC-3'	62,1 °C	
Ex4Fint	5'-AGGGAGCTGGAAGAGTGC-3'	58,4 °C	
Ex6R	5'-TCAAAATGACCCACACGCTGC-3'	61,2 °C	
Ex6Rint	5'-CTGCAGGTGCTCCTCGATG-3'	61,6 °C	
Ex7F	5'-ACATCGAGGAGCACCTGCAGG-3'	65,3 °C	
Ex7R	5'-GGCCCGCAGCTAATCTCTG-3'	61,6 °C	
Ex7Fnc	5'-CTGTTGGACTCTGGACTGTTTC-3'	62,1 °C	
STUB1_cEx1F	5'-A AAG TAC CCG GAG GCG GC-3'	60,8 °C	

STUB1_cEx2F	5'-GCC TTG TGC TAC CTG AAG AT-3'	58,4 °C	
STUB1_cEx7R	5'-C CCA GCC ATT CTC AGA GAT G-3'	60,5 °C	
RPL19_qPCR_F	5'-AGCTCCTGGCGTAAGTTTCT-3'	58,4 °C	
RPL19_qPCR_R	5'-AGTGGGTGCCTCTAAGGGAA-3'	60,5 °C	
SCA17F_FAM6	5'-FAM6_CCTTATGGCACTGGACTGAC-3'	62,2 °C	
SCA17R	5'-GTTCCCTGTGTTGCCTGCTG-3'	65,1 °C	
Random Primers (3 Mikrogramm (µg)/µl)			Invitrogen

RNA:

Gewebetyp	Katalognummer	
Human Brain, Total RNA	636530	Takara Bio Europe
Human Brain, Cerebellum, Total RNA	636535	
Human Skeletal Muscle, Total RNA	636534	
Human Blood, Peripheral Leukocytes, Total RNA	636592	
Tissue, Human Adult Normal, Skin, Total RNA	T5595-7381	BioGenomics

Verbrauchsmaterial:

Röhrchen Cellstar 50 ml	Greiner bio-one
Micro Amp Optical 8-Tube Strip (0,2 ml)	Applied Biosystems by life technologies
MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode	Applied Biosystems by life technologies
Multiply -µStrip Pro 8er Kette	Sarstedt
Multi Screen Filter Plates, 96 Well Plates 0,45 µm Hydrophilic, Low Protein Binding, Durapore Membran	Merck
PCR SingleCap 8er-SoftStrips 0,2 ml, farblos	Biozym Scientific GmbH
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl	Eppendorf

Pipettenspitzen mit Filter	
10 µl	Biozym; nerbe plus
100 µl	Axygen
1000 µl	Axygen
Einmal-Kunststoff-Spatel	Roth
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt
Reaktionsgefäße 1,5 ml Safe-lock	Eppendorf
SeqStudio Septa 8-Strip	AppliedBiosystems/Thermo Fisher Scientific
SeqStudio Septa 96-Well	AppliedBiosystems/Thermo Fisher Scientific

Weiteres Labormaterial:

Fotopapier Modell K65HM-CE/KP65HM-CE	Mitsubishi Electric
Gelelektrophoresekämme 12 Wells	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Gelschlitten	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Glasgefäß Kolben 250 ml	Ilmabor TGI
Messgefäß 50 ml	VITLAB
Schiene für Gelschlitten	PEQLAB Biotechnologie GmbH
MicroAmp 96-Well Tray/Retainer Set	AppliedBiosystems/life technologies

Pipetten:

0,1-2,5 µl	Eppendorf
0,5-10 µl	
10-100 µl	
1000 µl	

Technische Geräte:

Drucker Digital Monochrome Printer P93DW	Mitsubishi Electric
Eismaschine	Manitowoc
Galaxy Mini Centrifuge	VWR
Gelelektrophorese-Kammer	PEQLAB Biotechnologie GmbH
GeneAmp PCR System 9700	AppliedBiosystems
Heraeus Pico 17 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific
Kamera Fotolabor TV 200m Lens S6X11 11,5-69 mm	INTAS
2297 Macrodrives	LKB BROMMA
Mikrowellenherd	SHARP
Multifuge 3 L-R Heraeus	ThermoScientific
NanoPhotometer NP80	Implen
Personal Thermocycler	Biometra
SeqStudio	AppliedBiosystems/Thermo Fisher Scientific
Ultra Flair USB 3.0	San Disk
UV-Licht-Kammer	INTAS
Vortexer	IDL
Waage PG5002-S Delta Range	METTLER TOLEDO
Thermomixer comfort	Eppendorf

Computerprogramme:

GeneMapper v.5.0	AppliedBiosystems
INTAS Gel Doc	INTAS
SeqScape 3.0 Software	AppliedBiosystems
SeqStudio Plate Manager Genetic Analyzer	AppliedBiosystems/Thermo Fisher Scientific

Datenbanken und Online-Auswertungsprogramme:

AlphaFold Protein Structure Database	https://alphafold.ebi.ac.uk/
ClinVar	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/
Ensembl Genome Browser	https://www.ensembl.org
MutationTaster	http://www.mutationtaster.org/
NetGene2	https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetGene2-2.42
OMIM	https://omim.org/
PolyPhen-2	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/
Provean	http://provean.jcvi.org/index.php
Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/
UCSC Genome Browser	http://genome.ucsc.edu/
UniProt	https://www.uniprot.org/

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Extraktion

2.2.1.1 Methode

Die DNA-Extraktion der 80 in dieser Arbeit untersuchten Proben erfolgt aus dem EDTA-Blut der Patienten mittels des QIAamp DNA Blood Mini Kits nach der Anleitung des Herstellers. Die Durchführung wird im Folgenden dargestellt.

Die Isolierung von DNA erfolgt in mehreren Schritten. Gewonnen wird sie aus Leukozyten. Differenzierte Erythrozyten besitzen keinen Zellkern (Buselmaier und Haussig, 2018) und somit keine extrahierbare DNA. Die Membran der Leukozyten wird zerstört, um Zugang zu der DNA zu bekommen. Die Lyse erfolgt bei erhöhten Temperaturen durch die Qiagen Protease in Lysepuffer. Nach Zugabe von Ethanol wird das Lysat auf eine QIAamp Mini-Spinsäule gegeben, an dessen Membran die DNA-Moleküle binden. (Qiagen, 2012) Aufgrund der negativen Ladung bindet die DNA an die positiven Ladungen der Membran (Schmidt, 2017). Durch Zentrifugation des Gefäßes gelangt das Lysat mit Ausnahme der DNA in ein Sammelröhrchen. Anschließend wird die an der Membran gebundene DNA mittels der Waschpuffer 1 (Puffer AW1) und 2 (Puffer AW2) gereinigt. Im letzten Schritt wird die DNA von der Membran mit dem Puffer AE eluiert. (Qiagen, 2012)

2.2.1.2 Durchführung nach dem Spin Protocol von Qiagen

Vorbereitend werden die Proben sowie der Puffer AE auf Raumtemperatur (15-25 °Celsius (C)) gebracht und ein Wasserbad oder Heizblock auf 56 °C erhitzt. Die Puffer AW1, AW2 und die Qiagen-Protease werden nach den Anweisungen des Herstellers vorbereitet.

20 µl der Qiagen Protease werden in ein 1,5 ml Mikrozentrifugen-Röhrchen pipettiert. 200 µl einer EDTA-Blutprobe werden hinzugegeben. 200 µl Puffer AL (Lysepuffer) werden hinzugefügt. Durch Vortexen wird über eine Zeitspanne von 15 Sekunden (s) gemischt. Anschließend erfolgt eine Inkubation bei 56 °C für 10 Minuten (min). Das 1,5 ml Mikrozentrifugen-Röhrchen wird kurz zentrifugiert, um Tropfen von der Innenseite des Deckels zu entfernen. 200 µl Ethanol (96-100 %) werden hinzugefügt. Durch Vortexen wird erneut über eine Zeitspanne von 15 s gemischt. Nach dem Mischen wird das 1,5 ml Mikrozentrifugen-Röhrchen erneut kurz zentrifugiert, um Tropfen von der Innenseite des Deckels zu entfernen. Der Inhalt wird vorsichtig auf die QIAamp Mini-Spinsäule (in einem 2 ml Sammelröhrchen) aufgetragen, ohne den Rand

zu benetzen. Der Deckel wird geschlossen und es erfolgt eine Zentrifugation bei 8000 *rounds per minute* (rpm) für 1 min. Die QIAamp Mini-Spinsäule wird auf ein sauberes 2 ml Sammelröhrchen gesetzt und das Röhrchen mit dem Filtrat verworfen. Eventuell erfolgt eine weitere Zentrifugation bei höherer Geschwindigkeit, falls sich noch Reste des Lysats in der QIAamp Mini-Spinsäule befinden.

Die QIAamp Mini-Spinsäule wird vorsichtig geöffnet und 500 µl Puffer AW1 werden ohne Benetzung des Randes hinzugefügt. Der Deckel wird verschlossen und es erfolgt eine Zentrifugation bei 8000 rpm für 1 min. Die QIAamp Mini-Spinsäule wird in ein sauberes 2 ml Sammelröhrchen gegeben und das Sammelröhrchen mit dem Filtrat entsorgt. Die QIAamp Mini-Spinsäule wird vorsichtig geöffnet und 500 µl Puffer AW2 werden ohne den Rand zu benetzen hinzugefügt. Der Deckel wird geschlossen und es erfolgt eine Zentrifugation bei 14.000 rpm für 3 min. Es wird empfohlen, die QIAamp Mini-Spinsäule in ein neues 2 ml Sammelröhrchen zu geben und das alte Sammelröhrchen mit dem Filtrat zu entsorgen. Es erfolgt eine Zentrifugation bei 14.000 rpm für 1 min, um mögliche Reste des Puffers AW2 zu entfernen. Die QIAamp Mini-Spinsäule wird in ein sauberes 1,5 ml Mikrozentrifugen-Röhrchen gegeben und das Sammelröhrchen mit dem Filtrat verworfen. Die QIAamp Mini-Spinsäule wird vorsichtig geöffnet und 200 µl Puffer AE oder destilliertes Wasser werden hinzugefügt. Das Gefäß wird mindestens 1 bzw. 5 min für eine höhere DNA-Ausbeute bei Raumtemperatur (15-25 °C) inkubiert und danach bei 8000 rpm für 1 min zentrifugiert. Die extrahierte DNA befindet sich in dem 1,5 ml Mikrozentrifugen-Röhrchen. (Qiagen, 2016)

2.2.2 RNA-Extraktion

2.2.2.1 Methode

Die RNA-Extraktion erfolgt nach ähnlichen Prinzipien wie die DNA-Extraktion. RNA ist im Gegensatz zu DNA labiler und wird durch RNasen abgebaut. Nach Gewinnung des EDTA-Blutes sollte die Extraktion zügig erfolgen, um einen zu starken Abbau zu verhindern. Es muss darauf geachtet werden, mit RNase-freien Reagenzien und Materialien zu arbeiten. Es existieren unterschiedliche Verfahren zur Gewinnung von RNA, welche auf der Verwendung einer Vielzahl von Reagenzien beruhen. An dieser Stelle wird die Methode mittels eines Silikagels in einem Kit gewählt. Die Lyse der Zellen erfolgt in einem Puffer, dem Proteinase K zugegeben wurde. Diese hat die Aufgabe, Proteine zu entfernen und deren Störung vorzubeugen. Die RNA bindet an das

Silicagel und wird durch mehrere Waschschrirte gereinigt, in denen andere zelluläre Bestandteile sowie Bestandteile des Puffers entfernt werden. Abschließend wird die RNA von der Matrix gelöst. (Farrell, 2010)

2.2.2.2 Durchführung

Die Durchführung der RNA-Extraktion erfolgt mittels des Monarch Total RNA Miniprep Kits nach dem Protokoll des Herstellers. Ausgangspunkt ist wie bei der DNA-Präparation EDTA-Blut. Durch die folgenden Arbeitsschrirte findet eine Homogenisierung, eine Zellyse, die Entfernung von genomischer DNA, die Reinigung der RNA und dessen Elution statt (Biolabs, 2020).

In ein 1,5 ml Mikrozentrifugen-Röhrchen werden 200 µl EDTA-Blut und 200 µl DNA/RNA Protection Reagent pipettiert, der Inhalt wird kurz gevortext. Es werden 10 µl Proteinkinase K hinzugefügt und der Inhalt erneut gevortext. Anschließend erfolgt eine Inkubation bei Raumtemperatur für 30 min. 400 µl 2-Propanol werden hinzugefügt und das Röhrchen kurz gevortext. Der Inhalt wird in eine dunkelblaue RNA-Extraktions-Säule in einem Sammelröhrchen pipettiert. Es erfolgt eine Zentrifugation für 30 s bei max. 13.300 rpm (Einstellung ebenfalls in weiteren Zentrifugationsschrirten). Der Durchfluss wird verworfen. 500 µl RNA Waschpuffer werden hinzugefügt und das Röhrchen 30 s zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. In einem RNase-freien Mikrozentrifugen-Röhrchen werden 5 µl DNase I und 75 µl DNase I Reaktionspuffer vermischt und anschließend direkt auf die Matrix in der Säule pipettiert. Es erfolgt eine Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur. Anschließend werden 500 µl RNA Priming Puffer hinzugegeben und für 30 s zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Erneut werden 500 µl RNA Waschpuffer hinzugefügt und für 30 s zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Weitere 500 µl RNA Waschpuffer werden hinzugefügt und für 2 min zentrifugiert. Die Säule wird auf ein RNase-freies Mikrozentrifugen-Röhrchen gesetzt. 100 µl Nuklease-freies Wasser werden auf die Säulenmatrix gegeben und für 30 s zentrifugiert, um die RNA von der Matrix zu entfernen. Im Eluat befindet sich die RNA. Die RNA wird bei einer unmittelbaren Weiternutzung sofort auf Eis gelagert. Für eine kurze Lagerung, die weniger als eine Woche beträgt, kann die RNA bei -20 °C und für eine längere Lagerung bei -80 °C aufbewahrt werden. (Biolabs, 2020)

Mittels eines Photometers kann die Konzentration und Reinheit der RNA-Extraktion bestimmt werden.

2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Um das Ergebnis der DNA- oder RNA-Extraktion zu überprüfen, erfolgt eine Messung der Konzentration (Quantifizierung) und eine Bestimmung der Reinheit der Nukleinsäuren.

Da Nukleinsäuren in Lösungen Licht bei einem Absorptionsmaximum von 260 Nanometer (nm) im ultravioletten Bereich absorbieren, wird die Absorption bei dieser Wellenlänge gemessen. Eine Änderung des Lambert-Beerschen Gesetzes beschreibt den Zusammenhang zwischen der Nukleinsäuren-Konzentration und der Absorption. Die Extinktion bei 260 nm (Optische Dichte (OD)₂₆₀) zeigt auf, wieviel Licht absorbiert und durchgelassen wird. Die Berechnung der Konzentration (C) erfolgt nach der Formel: (Implen; Hauk, 2013; Arnemann, 2019)

$$C [\mu\text{g/ml}] = OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Extinktionskoeffizient}$$

Die Nukleinsäuren-Messung erfolgt gegen einen Leerwert, hier den nicht lichtabsorbierenden Puffer AE, in dem die DNA gelöst ist, oder Nuklease-freies Wasser, in welchem die RNA gelöst ist. Die Extinktion des Leerwertes beträgt 0. (Hauk, 2013) Für doppelsträngige DNA (dsDNA) beträgt der spezifische Extinktionskoeffizient 50 (Arnemann, 2019). Er bezieht sich auf die Nukleinsäure-Konzentration 50 µg/ml dsDNA, da der gemessene OD-Wert bei 260 nm für diese Konzentration 1 beträgt (Hauk, 2013).

Für RNA liegt der spezifische Extinktionskoeffizient bei 40 (Arnemann, 2019), da hier der gemessene Extinktions-Wert bei 260 nm für 40 µg/ml RNA 1 beträgt (Hauk, 2013). Proteine haben ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm. Die Absorptionen bei 260 nm und bei 280 nm werden in Relation zueinander gesetzt, um die Reinheit zu berechnen (Hauk, 2013). Falls der Quotient der Werte von 260/280 im Bereich von 1,8-2,0 liegt, handelt es sich um eine DNA bzw. RNA mit hoher Reinheit. Kleinere Werte als 1,8 stehen für eine verunreinigte Nukleinsäure, möglicherweise bedingt durch eine Proteinkontamination. (Arnemann, 2019)

2.2.4 PCR

2.2.4.1 Methode

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) ist eine molekularbiologische *In-vitro*-Methode zur Amplifizierung (Vervielfältigung) gezielter

Abschnitte des Genoms.

Kary Mullis beschrieb 1985 die exponentielle Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte mittels Oligonukleotiden (Primern) und einer DNA-Polymerase (Saiki et al., 1985). Die Methode wird zu unterschiedlichen wissenschaftlichen und diagnostischen Fragestellungen eingesetzt, beispielsweise in der humangenetischen Diagnostik zum Nachweis von Genmutationen (Buselmaier und Haussig, 2018).

Als Ausgangsmaterial ist bereits eine kleine Menge an DNA ausreichend, welche als Matrize dient (Buselmaier und Haussig, 2018). Neben DNA kann ebenfalls aus RNA eine komplementäre DNA (cDNA, engl. *complementary DNA*) hergestellt und vervielfältigt werden (Alberts et al., 2011).

Der zu amplifizierende Bereich der DNA wird als Template bezeichnet (Schmidt, 2017). Die Basenabfolgen der flankierenden DNA-Abschnitte müssen bekannt sein, um zwei spezifische Oligonukleotid-Primer zu designen. Diese binden jeweils an einen der beiden komplementären Stränge der Matrize. Die Verlängerung der Primer erfolgt durch das Enzym *Taq*-Polymerase. Dieses wird aus dem Bakterienstamm *Thermus aquaticus* gewonnen und weist den Vorteil der Hitzestabilität auf. Als Bausteine der entstehenden Stränge dienen die vier Desoxynucleosidtriphosphate (dNTP) Desoxyadenosintriphosphat (dATP), Desoxycytidintriphosphat (dCTP), Desoxyguanosintriphosphat (dGTP) und Desoxythymidintriphosphat (dTTP). Diese werden durch die *Taq*-Polymerase eingebaut, bis ein neuer Zyklus beginnt. (Buselmaier und Haussig, 2018)

Die PCR findet in einem Reaktionsgefäß und in einem Thermocycler statt. Die Vervielfältigung verläuft exponentiell, da jeder neu synthetisierte Strang im nächsten Zyklus ebenfalls als Matrize genutzt wird. In der Regel werden 25-30 Zyklen durchgeführt, um eine ausreichende Menge PCR-Fragment zu erhalten. Bei einer höheren Zyklusanzahl als 30 erhöht sich das Risiko für den falschen Einbau von Nukleotiden und somit von nicht erwünschten PCR-Fragmenten. (Müller und Prange, 2016)

Durch die Spezifität der Oligonukleotid-Primer ist eine selektive DNA-Vermehrung möglich. Um dies zu gewährleisten, werden die Primer nach bestimmten Vorgaben designt. Die Primer sollten eine Länge von 18-25 Bp aufweisen und spezifisch für den zu amplifizierenden Bereich sein. Der Guanin-Cytosin-Gehalt sollte bei einer gleichmäßigen Verteilung der vier Basen Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G) und Thymin (T) zwischen 40 und 60 % liegen. Die Differenz der Schmelztemperatur (T_m)

der beiden Primer sollte nicht mehr als 5 °C sowie der Primer und des Amplifikationsproduktes nicht mehr als 10 °C betragen. (Buselmaier und Haussig, 2018)

Um ein optimales Milieu für die Funktionsweise der *Taq*-Polymerase zu schaffen, wird dem Reaktionsgemisch ein Puffer zugegeben, der Chlorid-(Cl⁻)-Ionen und Magnesium²⁺-(Mg²⁺-)Ionen enthält (Müller und Prange, 2016). GC-reiche Sequenzen des DNA-Stranges können zur Ausbildung von Sekundärstrukturen führen, welche durch ein Springen der DNA-Polymerase möglicherweise nicht abgelesen werden. Folglich kann ein kürzeres PCR-Produkt entstehen. (Viswanathan et al., 1999; Kang et al., 2005) Durch Zugabe von Substanzen wie Betain (entspricht Q-Solution) oder Dimethylsulfoxid (DMSO) kann bei GC-reichen Sequenzen eine Steigerung der Spezifität der PCR ermöglicht werden (Müller und Prange, 2016). Die Additive verändern die Schmelzeigenschaften und die Strangtrennung der DNA (Frackman et al., 1998): Betain löst die Sekundärstruktur auf (Spiess und Ivell, 2002) und DMSO stört die Basenpaarung (Frackman et al., 1998).

Jeder Zyklus durchläuft dieselben drei Schritte:

1. Denaturierung: Durch Erhitzung im Thermocycler auf ca. 95 °C werden die Wasserstoffbrücken der dsDNA getrennt, wodurch zwei komplementäre und gegenläufige Einzelstränge entstehen (Schmidt, 2017).
2. Annealing: Nach Herunterkühlen des Gerätes auf 40-60 °C binden die freien Oligonukleotid-Primer an die komplementären Abschnitte des Templates (Müller und Prange, 2016). Die optimale Bindungstemperatur ist abhängig von der Primerlänge und dem GC-Gehalt sowie der daraus resultierenden mittleren T_m (Schmidt, 2017). Aufgrund einer nicht optimalen Temperatureinstellung können Probleme wie fehlende PCR-Produkte bei einer zu hoch und Fehlpaarungen bei einer zu niedrig eingestellten Temperatur entstehen (Müller und Prange, 2016).
3. Elongation: Die Synthese der komplementären DNA-Stränge erfolgt durch eine Verlängerung der Primer an ihrer freien Hydroxyl-(OH⁻)-Gruppe in 5'-3'-Richtung durch die *Taq*-Polymerase. Die Temperatur beträgt 72 °C, da die *Taq*-Polymerase hier ihr Temperaturoptimum aufweist. (Schmidt, 2017)

Alle weiteren Zyklen beginnen mit einer Denaturierung bei 95 °C, sodass auch neu gebildete DNA-Stränge denaturiert werden. Nach dem letzten Zyklus folgt eine Inkubation für 3-5 min bei 72 °C, um möglicherweise nicht fertig synthetisierte DNA-

Fragmente zu vervollständigen. Dies reduziert die Anzahl von unspezifischen Fragmenten in der folgenden Gelelektrophorese. (Müller und Prange, 2016)

2.2.4.2 PCR des *STUB1*-Gens

Das *STUB1*-Gen umfasst 2646 Basen und das Transkript für das längste Protein besteht aus sieben kodierenden Exonen (Cunningham et al., 2022). Aufgeteilt ergeben diese vier PCR-Produkte: Exon 1 und 7 werden jeweils einzeln untersucht. Exon 2 und 3 werden aufgrund ihrer Nähe im Transkript zusammen amplifiziert. Exon 4-6 lassen sich ebenfalls durch ihre geringere Größe gut gemeinsam vervielfältigen.

Die Herstellung des PCR-Ansatzes erfolgt mit folgenden Substanzen nach Etablierung der wirksamsten Additiva:

Tabelle 5: PCR-Mastermix Zusammensetzung für die PCR von Exon 1, Exon 2-3, Exon 4-6 und Exon 7

	Exon 1	Exon 2-3	Exon 4-6	Exon 7
PCR-Ansatz je Probe		25 µl		
CoralLoad PCR Puffer 10x		2,5 µl		
<i>Primer F</i> (50 pmol/µl)		0,375 µl		
<i>Primer R</i> (50 pmol/µl)		0,375 µl		
Nukleotid Mix (1,25 mM each)		5 µl		
Q-Solution (5x)	-	2,5 µl		
DMSO	2,5 µl	-	-	-
H ₂ O		13,85 µl		
Qiagen- <i>Taq</i> (5 U/µl)		0,4 µl		

Folgende Primer werden verwendet:

Tabelle 6: Oligonukleotid-Primer für die PCR von Exon 1, Exon 2-3, Exon 4-6 und Exon 7

	Exon 1	Exon 2-3	Exon 4-6	Exon 7
<i>Primer Forward (Primer F)</i>	Ex1Fneu	Ex2F	Ex4F	Ex7F
<i>Primer Reverse (Primer R)</i>	Ex1Rneu	Ex3Rneu	Ex6R	Ex7R
Größe des entstehenden PCR-Produktes in Bp	472	817	725	652

Sollen beispielsweise 16 Proben gleichzeitig untersucht werden, wird ein Mastermix hergestellt. Für diesen wird die 17-fache Menge des in Tabelle 5 angegebenen Mastermixes aus Puffer, Primern, Nukleotiden, ggf. DMSO oder Q-Solution, Wasser und *Taq*-Polymerase angesetzt. Anschließend werden in 17 PCR-Gefäße je 25 µl des

PCR-Mixes gegeben und zu 16 der PCR-Gefäße jeweils 1 µl Patienten-DNA addiert. Das letzte Gefäß wird nur mit dem PCR-Mix befüllt und dient als Negativ-Kontrolle zum Ausschluss von Kontaminationen.

Nach Etablierung der optimalen Bedingungen für jedes PCR-Produkt erfolgt die PCR im Thermocycler nach folgendem Schema:

Tabelle 7: Bedingungen des Thermocyclers für die PCR von Exon 1, Exon 2-3, Exon 4-6 und Exon 7

	Exon 1	Exon 2-3	Exon 4-6	Exon 7
Erste Denaturierung	95 °C 3 min			
Denaturierung Zyklus	95 °C 30 s		94 °C 30 s	
Annealing Zyklus	62 °C 30 s	61 °C 30 s	60 °C 30 s	61 °C 30 s
Elongation Zyklus	72 °C 30 s			
Finale Elongation	72 °C 3min			
Anzahl Zyklen	35			

Die 35 Zyklen werden von einer initialen Denaturierung und finalen Elongation flankiert. Bei wenigen Proben konnten zunächst keine eindeutigen PCR-Produkte nachgewiesen werden, weshalb bei diesen Proben 0,2-0,5 µl mehr DNA eingesetzt oder die Anzahl der Zyklen auf 38 erhöht wurde.

2.2.4.3 PCR am SCA17-Locus

Zur Diagnostik der CAG/CAA-Expansionen im *TATA-Box-Bindeprotein (TBP)* Gen erfolgt eine Vervielfältigung der DNA-Proben durch eine PCR mit einem Fluorochrom-markierten Vorwärts- und einem nichtmarkierten Rückwärts-Primer. Die Größe der PCR-Produkte wird über eine Fragmentlängenanalyse bestimmt.

Für die PCR wird ein Mastermix vorbereitet (s. Tabelle 8). Pro zu untersuchende Probe werden je 18 µl des Mastermixes und 1 µl der DNA in ein PCR-Gefäß gegeben. Eine Kontrolle findet durch zwei zusätzliche Proben statt, dies sind SCA864.1 (Negativ-Kontrolle, 38/30 Repeats) und SCA852.1 (Positiv-Kontrolle, 46/34 Repeats). Die Proben werden im Thermocycler nach den Bedingungen in Tabelle 9 bearbeitet.

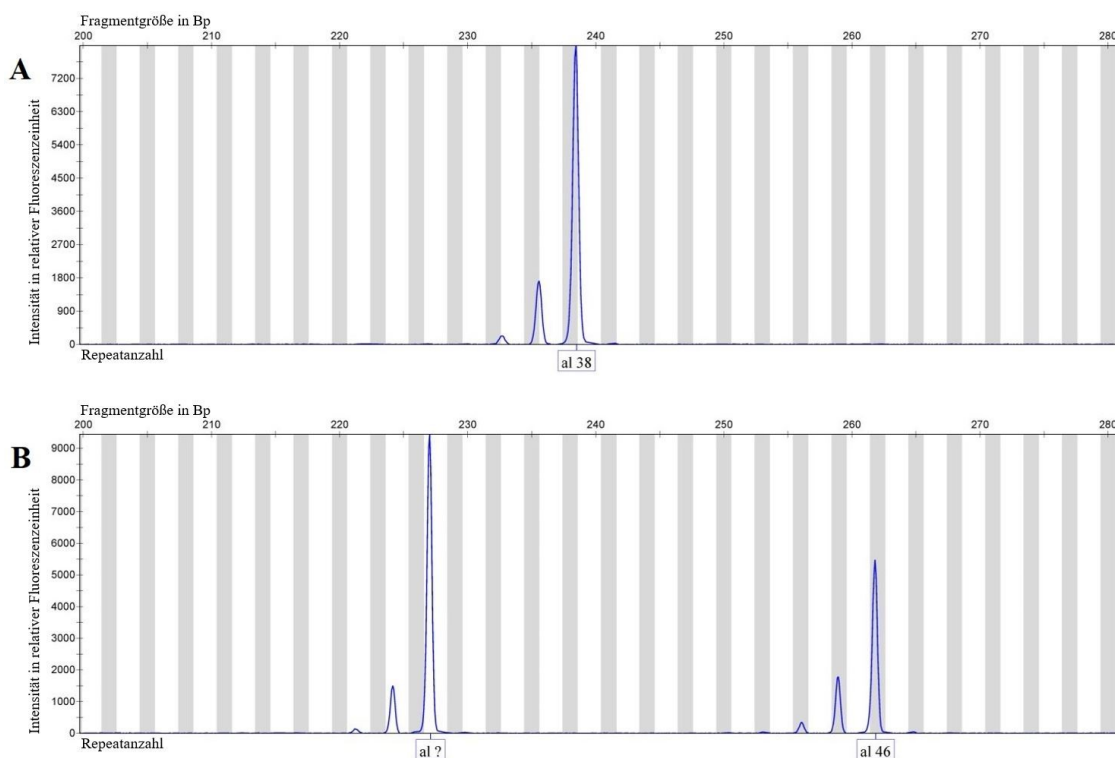
Tabelle 8: PCR-Mastermix Zusammensetzung für die PCR des *TBP*-Gens

PCR-Ansatz für fünf Proben	100 µl
CoralLoad PCR Puffer 10x	10 µl
Primer SCA17F FAM6 (50 pmol/µl)	1 µl
Primer SCA17R (50 pmol/µl)	1 µl
Nukleotid Mix (1,25 mM each)	20 µl
Q-Solution (5x)	20 µl
H ₂ O	47 µl
Qiagen-Taq (5 U/µl)	1 µl

Tabelle 9: Bedingungen für die PCR des *TBP*-Gens

Erste Denaturierung	94 °C	3 min
Denaturierung Zyklus	94 °C	30 s
Annealing Zyklus	60 °C	40 s
Elongation Zyklus	72 °C	40 s
Finale Elongation	72 °C	3min
Anzahl Zyklen	35	

Anschließend werden die PCR-Proben in einem Verhältnis von 1:20 mit Wasser verdünnt. Hiervon werden je Probe 0,5 µl bzw. je 0,6 µl der Kontrollen zusammen mit 12 µl Hi-Di Formamid und 0,5 µl LIZ-600 Größenstandard vermengt. Für 3 min werden die Proben bei 94 °C erhitzt und folgend für 2 min auf Eis gelegt. Die Fragmentlängenbestimmung erfolgt im SeqStudio Kapillar-Sequencer.

Abbildung 4: Darstellung der Fragmentlängenanalyse des *TBP*-Gens.

A: Probe 1124.1, Allele 38/38, B: Probe 852.1 (Positiv-Kontrolle), Allele 46/34

Zur Auswertung der Fragment- und Allelgrößen wird die Software GeneMapper v.5.0 genutzt. Beispielhaft ist dies anhand der Probe 1124.1 in Abbildung 4 demonstriert.

2.2.5 RT-PCR

2.2.5.1 Methode

Die Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) ermöglicht eine Umschreibung von extrahierter RNA in cDNA durch die Reverse Transkriptase, welche anschließend in einer PCR vervielfältigt wird. Auf diese Weise kann die Genexpression in der Zelle untersucht werden. (Schmidt, 2017) Die beiden Arbeitsschritte sind hierbei aneinandergeschlossen. Zuerst synthetisiert das Enzym Reverse Transkriptase an der RNA die einzelsträngige cDNA. Diese wird in der folgenden PCR als Template zur Generierung von doppelsträngiger cDNA genutzt. Für die Umschreibung werden *random*-Primer mit Zufalls-Sequenzen genutzt, um möglichst viele verschiedene Sequenzen der cDNA herzustellen. Bei der PCR werden sequenzspezifische Primer eingesetzt, um das Transkript des Zielgens zu vervielfältigen. (Bachman, 2013)

Für die Umschreibung wird die RNA im Thermocycler erhitzt, um die Stränge zu trennen. Die *random*-Primer lagern sich an die RNA-Einzelstränge an und werden durch die Reverse Transkriptase unter Einbau von dNTPs verlängert. Durch eine anschließende Erhitzung wird das Enzym deaktiviert. (Bachman, 2013)

2.2.5.2 Durchführung der Umschreibung von RNA in cDNA

Die gesamte Umschreibung von RNA in cDNA findet auf Eis statt.

Folgende kommerziell erhältlichen RNA-Proben (1-3, 5 von Takara Bio Europe; 4 von BioGenomics) werden genutzt:

Tabelle 10: Gewebetypen für die Umschreibung von RNA in cDNA

1	Human Brain, Total RNA
2	Human Brain, Cerebellum, Total RNA
3	Human Skeletal Muscle, Total RNA
4	Tissue, Human Adult Normal, Skin, Total RNA
5	Human Blood, Peripheral Leukocytes, Total RNA

Es wird ein Mix mit folgendem Ansatz für 6 Proben vorbereitet:

Tabelle 11: Mix 1 für Umschreibung von RNA in cDNA

	1 Probe	6 Proben
H ₂ O	10 µl	60 µl
dNTPs 10 mM <i>each</i>	1 µl	6 µl
<i>Random Primers</i> (3 µg/µl) verdünnt 1:30	1 µl	6 µl
gesamt	12 µl	72 µl

Nach Durchmischen des Ansatzes werden je 12 μl in 6 *Wells* pipettiert. In 5 *Wells* werden je 1 μg der RNA eines Gewebes gegeben. In das 6. *Well* wird 1 μl H_2O als Negativkontrolle pipettiert. Mit einer Pipette erfolgt eine kurze Durchmischung. Die Proben werden in den Thermocycler geladen. Es erfolgt eine Inkubation bei 65 °C für 5 min. Anschließend werden zu jeder Probe 7 μl des folgenden Ansatzes hinzugegeben:

Tabelle 12: Mix 2 für Umschreibung von RNA in cDNA

	1 Probe	6 Proben
5x Puffer (5x First-Strand Buffer)	4 μl	24 μl
0,1 mM DTT	1 μl	6 μl
RNase out	1 μl	6 μl
SuperScript III Reverse Transcriptase (200 U/ μl)	1 μl	6 μl
gesamt	7 μl	42 μl

Die Proben werden für folgende Schritte erneut in den Thermocycler gesetzt:

Tabelle 13: Bedingungen für die Umschreibung von RNA in cDNA

25 °C	10 min
50 °C	50 min
85 °C	5 min

Die entstandene cDNA wird bei -20 °C gelagert.

2.2.5.3 Durchführung der PCR an cDNA

Die synthetisierte cDNA der fünf verschiedenen Gewebetypen dient als Template zur Vervielfältigung des Abschnittes des umgeschriebenen *STUB1*-Transkripts.

Es werden zwei verschiedene Primerpaare angewendet. Die Länge der Produkte unterscheidet sich nur gering. In einem Ansatz werden Transkripte mit den *STUB1* Exonen 1-7 amplifiziert, im zweiten Ansatz ist der F-Primer in Exon 2 lokalisiert.

Tabelle 14: PCR-Mix für cDNA, Exone 1-7 und 2-7

	Exon 1-7	Exon 2-7
PCR-Ansatz je Probe	25 μl	25 μl
CoralLoad PCR Puffer 10x	2,5 μl	2,5 μl
Primer F (50 pmol/ μl)	0,375 μl	0,375 μl
Primer R (50 pmol/ μl)	0,375 μl	0,375 μl
Nukleotid Mix (1,25 mM each)	5 μl	5 μl
Q-Solution (5x)	5 μl	1,25 μl
H_2O	11,35 μl	15,1 μl
Qiagen-Taq (5 U/ μl)	0,4 μl	0,4 μl

Folgende Primer werden verwendet:

Tabelle 15: Primer für die PCR an cDNA, Vervielfältigung des Abschnittes der umgeschriebenen *STUB1*-Transkripte

	Exon 1-7	Exon 2-7
<i>Primer Forward</i>	cEx1F	cEx2F
<i>Primer Reverse</i>	cEx7R	cEx7R
Größe des entstehenden PCR-Produktes in Bp	779	700

Nach Vorbereitung des Mixes für Exon 2-7 nach Tabelle 14 für eine Anzahl von 7 Proben werden je 25 µl in 7 *Wells* pipettiert. In *Well* 1-5 wird je 1 µl der cDNA aus der RNA der Gewebe gegeben. In *Well* 6 wird 1 µl der Wasserprobe von der RNA-Umschreibung pipettiert. In *Well* 7 wird 1 µl H₂O für die Wasserprobe der PCR pipettiert.

Der Mix für Exon 1-7 wird ebenfalls nach Tabelle 14 angesetzt, hier für 6 Proben. Je 25 µl werden in 6 *Wells* pipettiert. In *Well* 1-5 werden je 1 µl der cDNA aus der RNA der Gewebe und in *Well* 6 1 µl H₂O für die Wasserprobe der PCR pipettiert.

Die PCR wird unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Tabelle 16: Bedingungen für die PCR an cDNA, Vervielfältigung des Abschnittes des umgeschriebenen *STUB1*-Transkripts

	Exon 1-7	Exon 2-7
Erste Denaturierung	95 °C	3 min
Denaturierung Zyklus	94 °C	30 s
Annealing Zyklus	60 °C 30 s	58 °C 30 s
Elongation Zyklus	72 °C 45 s	72 °C 55 s
Finale Elongation	72 °C	3 min
Anzahl Zyklen	35	

Im Anschluss an die PCR erfolgt eine Gelelektrophorese auf einem 1,5 % Agarose-Gel und eine Sequenzierung zur Bestätigung des richtigen Amplifikats.

2.2.5.4 Haushaltsgen *RPL19*

Haushaltsgene (engl. *housekeeping genes*) sind für die grundlegenden Funktionen in einer Zelle und deren Aufrechterhaltung verantwortlich. Deshalb werden sie in der Regel unabhängig des Gewebetyps oder der Differenzierung einer Zelle auf einem gleichbleibenden Level exprimiert. Durch die Beständigkeit in der Expression können Haushaltsgene als Kontrollgene in genomischen Untersuchungen verwendet werden. (Eisenberg und Levanon, 2013)

In dieser Arbeit wurde das Haushaltsgen *RPL19* (codiert für 60S ribosomales Protein L19) (Al-Bader und Al-Sarraf, 2005; UniProt Consortium, 2021) genutzt, um einen Vergleich zum Transkript *STUB1-201* in verschiedenen Gewebetypen herzustellen.

Für die PCR wird ein Mix für 6 Proben nach dem Schema in Tabelle 17 angesetzt. Als Matrize dient die umgeschriebene cDNA der fünf verschiedenen Gewebetypen (s. 2.2.5.2). In 6 *Wells* werden je 25 μl des Ansatzes pipettiert. In 5 *Wells* werden je 1 μl der cDNA der 5 Gewebe und in 1 *Well* 1 μl H₂O hinzugefügt.

Tabelle 17: PCR-Mix für cDNA, Vervielfältigung des *RPL19*-Transkripts

	25 μl	150 μl (6 Proben)
Puffer 10x	2,5 μl	15 μl
Primer RPL19_qPCR_F (50 pmol/ μl)	0,375 μl	2,25 μl
Primer RPL19_qPCR_R (50 pmol/ μl)	0,375 μl	2,25 μl
Nukleotid Mix (1,25 mM <i>each</i>)	5 μl	30 μl
Qiagen- <i>Taq</i>	0,4 μl	2,4 μl
H ₂ O	16,35 μl	98,1 μl

Die PCR erfolgt nach folgendem Schema im Thermocycler:

Tabelle 18: Bedingungen für PCR der cDNA, Vervielfältigung des *RPL19*-Transkripts

Erste Denaturierung	95 °C	3 min
Denaturierung Zyklus	94 °C	30 s
Annealing Zyklus	60 °C	20 s
Elongation Zyklus	72 °C	20 s
Finale Elongation	72 °C	3 min
Anzahl Zyklen	35	

Die Länge des erwarteten Produktes beträgt 152 Bp.

Zur vergleichenden Darstellung werden die PCR-Produkte der Exone 1-7 bzw. 2-7 (s. 2.2.5.3) und des *RPL19*-Transkripts gemeinsam auf ein 1,5 % Agarose-Gel aufgetragen. Hierbei werden jeweils die gleichen Mengen der PCR-Produkte gemischt (Exone 1-7 je 6 μl mit *RPL19*-Produkten je 6 μl ; Exone 2-7 je 5 μl mit *RPL19*-Produkten je 5 μl), und anschließend aufgetragen (Exone 1-7 + *RPL19*-Produkte je 10 μl , Exone 2-7 + *RPL19*-Produkte je 8 μl).

2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese

2.2.6.1 Methode

Zur Überprüfung der entstandenen PCR-Produkte wird das Verfahren der Gelelektrophorese angewendet. Diese zeigt, ob die PCR-Fragmente in der erwünschten Länge entstanden sind. Ein Größenmarker gibt Aufschluss darüber, wie groß das Fragment ist.

In der Elektrophorese-Kammer wird ein elektrisches Feld angelegt. Als Trägersubstanz der Proben wird ein Agarose-Gel eingesetzt, welches eine geordnete Auftrennung der Moleküle ermöglicht. Agarose ist aus Polysaccharid-Ketten aufgebaut. Bausteine der Ketten sind Agarobiose-Monomere. Bei der Herstellung des Gels lagern sich die Polysaccharid-Ketten zu Doppelhelices zusammen, welche Fäden bilden. (Michov, 1996) Diese führen zur Entstehung von Poren im Gel (Lee et al., 2012). Das Agarose-Gel weist im Vergleich zu anderen Substanzen wie Polyacrylamid große Poren auf und kann zur Trennung großer Fragmente im Bereich von 50 bis zu tausenden von Bp verwendet werden. Abhängig von der Konzentration der verwendeten Materialien entstehen unterschiedlich große Poren. (Williams, 2001) So kann die Agarose-Konzentration an die Größe des erwarteten DNA-Fragmentes angepasst werden. Das Agarose-Gel fungiert als Sieb aufgrund seiner netzartigen Struktur und trennt die Fragmente ihrer Länge nach auf. Dafür werden die PCR-Produkte in vorgeformte Taschen pipettiert. Am oberen Rand des Feldes befindet sich die Kathode, am unteren Rand die Anode. Die DNA-Fragmente sind aufgrund ihres Phosphatrestes negativ geladen und wandern im elektrisch geladenen Feld zur positiv geladenen Anode. Kleinere Moleküle wandern schneller und befinden sich somit näher an der Anode. Damit die DNA-Fragmente sichtbar gemacht werden, wird dem Gel bei seiner Herstellung Midori Green Advance zugegeben. Es stellt eine Alternative zum häufig eingesetzten Ethidiumbromid dar und ist weniger schädlich für den Menschen. Die Substanzen wirken als Interkalatoren und werden zwischen die DNA-Basen eingebaut. Unter UV-Licht fluoreszieren sie und ermöglichen eine Darstellung der DNA-Fragmente als Banden. (Müller und Prange, 2016)

2.2.6.2 Durchführung

Zur Herstellung eines 1,5 % Gels werden 0,6 g Agarose abgewogen und in einen 250 ml Erlenmeyerkolben überführt. Anschließend werden 40 ml 1xTBE abgemessen und hinzugegeben. In einer Mikrowelle wird der Inhalt ca. 2 min lang erhitzt, bis sich die

Agarose in der Lösung sichtbar restlos gelöst hat. 1,6 µl Farbstoff Midori Green Advance werden hinzugegeben und der Kolben zum Vermischen kurz geschwenkt. Die Lösung wird in einen vorbereiteten Gelschlitten gegossen und zwei 12-Taschen-Kämme oben und mittig eingesetzt. Nach einer Wartezeit von ca. 15-20 min ist das Gel fest und bereit zur Verwendung. Die Kämme werden entfernt. Zur Lagerung kann das Gel im Kühlschrank aufbewahrt werden. Das Gel wird in eine Gelelektrophorese-Kammer gegeben, welche mit 1xTBE gefüllt wird.

In je eine Tasche werden 5 µl einer Probe des PCR-Produktes gegeben. Pro horizontale Auftragung werden je in eine Tasche 4,6 µl des 100 bp Standard DNA Markers gegeben. Es wird eine elektrische Stromstärke von 100 Milliampere (mA) angelegt.

Im Anschluss an die Elektrophorese wird das Gel zur Dokumentation fotografiert (Abbildung 5a), zur Verstärkung des Kontrastes kann auch eine inverse Darstellung zum Einsatz kommen (Abbildung 5b). Die Banden werden nach ihrer Fragmentgröße in Bezug auf den Standardmarker und nach ihrer Quantität durch ihre Dicke beurteilt (Müller und Prange, 2016).

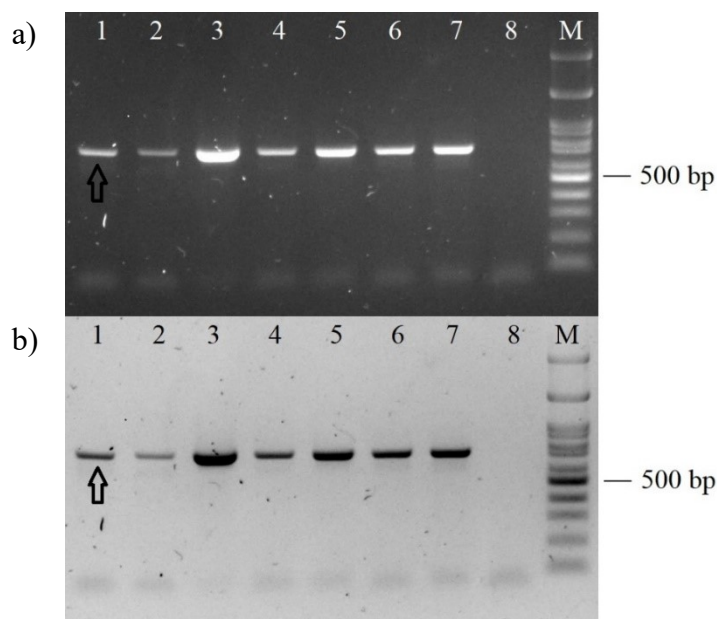


Abbildung 5: a) Gelelektrophoretische Auftrennung der Exon 4-6 PCR am *STUB1*-Gen. 1-7 = Patienten-Proben, mit Pfeil markierte Bande stellt das 725 Bp große PCR-Produkt dar, 8 = Wasserprobe, M = Größenmarker 100 Bp-Leiter

b) Darstellung in der inversen Ansicht

2.2.7 Aufreinigung mittels ExoSAP-IT

2.2.7.1 Methode

Nach der Amplifizierung der genomischen DNA wird diese für die Weiterverwendung zunächst mittels ExoSAP-IT aufgereinigt. Es erfolgt eine Entfernung von nicht

eingebauten dNTPs und Primerresten, welche die nachfolgende Sequenzierungsreaktion stören können. In der ersten Inkubationsphase erfolgt die Aufreinigung. ExoSAP-IT enthält die Enzyme Exonuclease I und Shrimp Alkaline Phosphatase. Die Exonuclease I baut verbliebene einzelsträngige Primer ab. Nicht eingebaute dNTPs werden durch die Shrimp Alkaline Phosphatase dephosphoryliert. Anschließend werden die Enzyme durch eine zweite Inkubationsphase bei 80 °C inaktiviert. (Werle et al., 1994; USB Corporation, 2000)

2.2.7.2 Durchführung

Pro Probe werden ca. 5 µl des PCR-Produktes in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß gegeben. Falls die Bande in der Gelelektrophorese stark ist, wird die Menge entsprechend verringert und die Differenz durch steriles Wasser addiert. Bei einer schwachen Bande kann mehr Volumen des PCR-Produktes eingesetzt werden. Je 0,8 µl ExoSAP-IT werden in die Gefäße pipettiert. Der Inhalt wird kurz mit einer Pipette vermischt. Die Reaktionsgefäße werden in den Thermocycler gegeben. Es erfolgen zwei Inkubationsphasen: 15 min bei 37 °C und 15 min bei 80 °C. Anschließend werden die Reaktionsgefäße kurz zentrifugiert. Die Produkte können direkt zur Sequenzierungsreaktion weiterverwendet werden.

2.2.8 DNA-Sequenzierung

2.2.8.1 Methode

Die Sequenzierung ist ein Verfahren zur Bestimmung der Basenabfolge der DNA. Die DNA-Sequenzierung nach Sanger geht auf Frederick Sanger zurück, welcher 1977 seine Kettenabbruchmethode vorstellte (Sanger et al., 1977). Die verwendete Methode in der vorliegenden Arbeit basiert auf der Sequenzierung nach Sanger.

Die enzymatische Kettenabbruchsynthese (Syn. Didesoxymethode) beruht auf dem Verfahren, mittels einer DNA-Polymerase komplementäre Stränge zu einer DNA zu synthetisieren, welche durch einen Syntheseabbruch unterschiedliche Fragmentlängen aufweisen. Durch eine Anordnung nach Fragmentlänge dient jeweils die letzte Base zum Ablesen der Sequenz. (Schmidt, 2017)

Im Gegensatz zur PCR wird in der Sequenzierung nur ein Primer eingesetzt. Eine DNA-Polymerase synthetisiert an einer Vielzahl von DNA-Molekülen den komplementären Strang. Als Substrate dienen die vier dNTP dATP, dGTP, dCTP und dTTP sowie kleinere Mengen der vier Didesoxynucleosidtriphosphate (ddNTP) Didesoxyadenosintriphosphat (ddATP), Didesoxyguanosintriphosphat (ddGTP),

Didesoxycytidintriphosphat (ddCTP) und Didesoxythymidintriphosphat (ddTTP). Die ddNTPs weisen keine OH-Gruppe an der 3'Position auf, sodass nachfolgend kein weiteres Nukleotid eingebaut werden kann. Es kommt zum Abbruch der Synthese. Durch den zufälligen Einbau der ddNTPs entstehen DNA-Fragmente aller Längen. Jedes der vier ddNTPs enthält einen bestimmten Fluoreszenzfarbstoff zur Detektierung. Nach der Synthese werden die entstandenen DNA-Fragmente durch eine Elektrophorese nach ihrer Größe aufgeteilt. Heutzutage wird das Verfahren der Kapillarelektrophorese in einem Sequenziergerät genutzt. Die markierten ddNTPs fluoreszieren unter Einwirkung eines Lasers. (Schmidt, 2017) Die einzelnen Fluoreszenzen werden in einem Elektropherogramm graphisch dargestellt und bilden die Nukleinsäuresequenz ab (Buselmaier und Haussig, 2018). Diese wird mittels eines Computerprogrammes ausgewertet, beispielhaft ist dies anhand Abbildung 6 demonstriert.

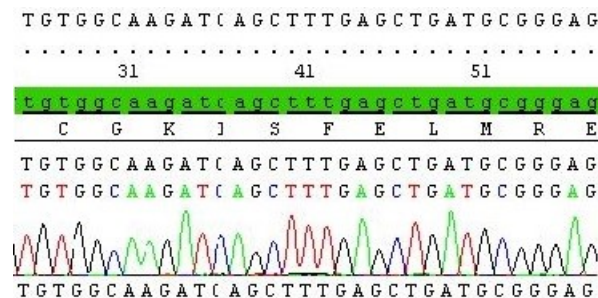


Abbildung 6: Beispielhafte Darstellung eines Elektropherogramms, hier Probe SCA 977.1 in einem Ausschnitt aus Exon 6 des *STUB1*-Gens. Die Peaks der vier Basen sind durch vier unterschiedliche Farben zu unterscheiden. Hierbei steht rot für Thymin, schwarz für Guanin, grün für Adenin und blau für Cytosin

2.2.8.2 Durchführung

2.2.8.2.1 Vorbereitung der Sequenzierung am SeqStudio-Sequencer

Zur Sequenzierung wird das durch ExoSAP-IT gereinigte PCR-Produkt weiterverwendet und zunächst kurz zentrifugiert. Zu jeder Probe werden je 5,2 µl eines Mastermixes mit folgendem Inhalt gegeben: 1 µl Big Dye Terminator 5x Sequencing Buffer, 1,2 µl BD3.1 (Lösung mit Nukleotiden und Polymerase), 1 µl Primer verdünnt auf 10 Pikomol (pmol)/µl und 2 µl Wasser. Für eine gleichmäßige Verteilung wird die Probe mit der Pipette kurz vermischt und anschließend zentrifugiert.

Es erfolgt die Sequenzierung im Thermocycler nach folgendem Standardprotokoll:

Tabelle 19: Bedingungen für die Sequenzierung am SeqStudio-Sequencer

Erste Denaturierung	96 °C	1 min
Denaturierung	96 °C	20 s
Hybridisierung	55 °C	5 s
Elongation	60 °C	4 min
Anzahl Zyklen	25	

Teilweise erfolgt die Sequenzierung mit 27 Zyklen, da die Produktmenge des Ausgangs-Fragments sehr gering war.

Anschließend werden die Reaktionsprodukte aufgereinigt. Je nach Anzahl der Proben gibt es zwei Verfahren. Bei einzelnen Proben empfiehlt sich das DyeEx 2.0 Spin Kit von Qiagen, bei einer größeren Anzahl eine Platte mit Sephadex. Beide Möglichkeiten funktionieren nach dem gleichen Prinzip.

Die Gelfiltrationschromatographie im DyeEx 2.0 Spin Kit trennt Moleküle nach ihrem Molekulargewicht auf. Das Gel-Filtrationsmaterial besteht aus Kugeln mit gleichmäßigen Poren. Eine erste Zentrifugation entfernt den Speicherpuffer von den Säulen. Nach Auftragen der Proben werden die in der Sequenzierungsreaktion nicht eingebauten und mit Farbstoff markierten ddNTPs in die Poren eingeschlossen und verbleiben in dem Gel. Die DNA-Moleküle werden nicht eingeschlossen, sondern im Durchfluss während eines zweiten Zentrifugationsschrittes gewonnen. (Qiagen, 2002) Bei der Aufreinigung mittels Sephadex entsteht ebenfalls durch Zentrifugation eine Matrix, welche während einer zweiten Zentrifugation die DNA aufreinigt.

Für die Aufreinigung mittels DyeEx 2.0 Spin Kit nach dem Protokoll des Herstellers wird für jede Probe ein 2 ml Sammelröhrchen vorbereitet. Die DyeEx 2.0-Spin-Säulen werden an ihrem unteren Ende umgedreht gehalten und leicht gevortext. Der Deckel wird jeweils um eine Viertelumdrehung geöffnet, um ein Vakuum innerhalb der Spin-Säule zu vermeiden. Die Bodenverschlüsse der Säulen werden an der Sollbruchstelle abgebrochen. Die Spin-Säulen werden in die 2 ml Sammelröhrchen gesetzt. Es erfolgt eine Zentrifugation der Röhrchen für 3 min bei 2400 rpm. 1,5 ml Eppendorf-Gefäße werden vorbereitet und nummeriert. Die Deckel der Spin-Säulen und die Sammelröhrchen werden verworfen. Die Spin-Säulen werden in die Eppendorf-Gefäße gesetzt. Jeweils 10 µl der Sequenzierprodukte werden auf die schrägen Oberflächen der Gelbetten mittig und ohne direkten Kontakt gegeben. Es erfolgt erneut eine Zentrifugation für 3 min bei 2400 rpm. (Qiagen, 2002) 0,2 ml speziell lichtdurchlässige

Tubes in Streifen werden vorbereitet und beschriftet. Die gereinigten Sequenzierprodukte werden aus den Eppendorf-Gefäßen mittels einer Pipette in die lichtdurchlässigen *Tubes* überführt. In jedes Gefäß werden 10 µl Hi-Di Formamid zügig pipettiert. Die Gefäße werden in eine Halterung gesetzt und mittels SeqStudio Septa 8-Strips abgedeckt.

Die Aufreinigung größerer Probenzahlen erfolgt in einer Platte mittels Sephadex. In eine MultiScreen Filter Platte werden jeweils 350 µl Sephadex G50 superfine (in Wasser resuspendiert) in die *Wells* unter Schwenken des Sephadex-Behälters gegeben. Die Platte wird gewogen und ein äquivalentes Gegengewicht vorbereitet. Beide werden unter folgenden Bedingungen in einer Multifuge 3 L-R Heraeus zentrifugiert: 720 x g für 2 min bei 20 °C. Der Durchfluss in der unteren Platte wird verworfen. Die obere Platte wird auf eine MicroAmp *Optical 96-Well* Reaktionsplatte gesetzt. Die Sequenzierprodukte werden mittels einer Pipette auf die Oberflächen der Sephadex-Matrix mittig und ohne diese zu berühren aufgetragen. Es erfolgt ein zweiter Zentrifugationsschritt unter den gleichen Bedingungen und mit angepasstem Gegengewicht. Anschließend werden je 10 µl Hi-Di Formamid zügig zugegeben. Die Platte wird mit einem SeqStudio 96-*Well*-Septum abgedeckt und bei Bedarf kurz mit angepasstem Gegengewicht zentrifugiert.

2.2.8.2.2 Bedienung des SeqStudio-Sequencers

Am Computer dient das Programm Plate Manager zur Auswahl der Einstellungen des SeqStudio-Sequencers (AppliedBiosystems). Es werden die Probenamen und die Lauf-Module entsprechend der Länge der DNA-Produkte eingetragen. Nach Auswahl dieser Einstellungen am SeqStudio-Sequencer werden die Proben in das Gerät geladen und die Kapillar-Elektrophorese gestartet. Die Dauer der Läufe ist abhängig von der Anzahl der Proben und der Fragmentlänge der DNA.

2.2.8.2.3 Sequenzierung über externe Anbieter (Microsynth Göttingen)

Der Großteil der Proben wird am SeqStudio-Sequencer sequenziert. Ein Teil der Proben wird zur Sequenzierung an die Firma Microsynth Seqlab (Göttingen) versendet. Auf eine externe Sequenzierung wird bei großen PCR-Fragmenten zurückgegriffen, da auf der kleinen Kapillare des SeqStudio-Sequencers solche Fragmente nicht vollständig sequenziert werden können. Außerdem werden Proben versendet, welche zuvor wiederholt qualitativ nicht auswertbar sind. Da der SeqStudio-Sequencer nur eine Probenanzahl geteilt durch vier erlaubt, werden einzelne Sequenzierungen ebenfalls

verschickt.

Zur Vorbereitung werden die mit ExoSAP-IT gereinigten PCR-Produkte jeweils in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Zugegeben werden je 1 µl des auf 10 pmol/µl verdünnten Primers und 8 µl Wasser (Gesamtvolumen ca. 15 µl). Die Reaktionsgefäße werden jeweils mit einem Barcode versehen und an das externe Labor versendet, wo die Sequenzierung durchgeführt wird.

2.2.9 Auswertung

2.2.9.1 Auswertung der Sequenzierung

Die Auswertung der Sequenzierreaktionen erfolgt mittels des Computerprogrammes SeqScape Software 3.0. Nach Einfügen der Dateien werden diese im Elektropherogramm dargestellt. Eine Sequenzvorlage erlaubt den Vergleich der Patientenproben mit einer Wildtyp-Sequenz.

2.2.9.2 Auswertung der Allel-Frequenzen mittels Online-Datenbanken

Falls eine Auffälligkeit einer Patientensequenz im Vergleich zum Wildtyp gefunden wird, kann diese mittels Online-Datenbanken recherchiert werden. Ensembl (<https://www.ensembl.org>) stellt eine Datenbank dar, in der nach Vorauswahl des Organismus nach dem jeweiligen Gen gesucht werden kann. Bekommt man so das humane *STUB1*-Gen angezeigt, kann über die Auswahl des Transkripts *STUB1-201* (Transkript-ID: ENST00000219548.9) die Basenabfolge eingesehen werden. Markierte Basen weisen bereits bekannte Polymorphismen auf, welche mit einer Nummer (rs-Nummer) versehen sind. (Cunningham et al., 2022)

Weitere Informationen zu der ausgewählten Variante lassen sich unter dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) finden, einer frei zugänglichen Datenbank mit einer stetig wachsenden Sammlung an genomischen Variationen. Die „*Single Nucleotide Polymorphism Database*“ sammelt eingereichte Varianten in Form von einzelnen Nukleotid-Veränderungen, und weiterhin von Deletionen, Insertionen und *Short Tandem-Repeats*. Den Varianten wird jeweils eine spezifische rs-Nummer zugeordnet. Es lassen sich, sofern bekannt, Informationen zur Position, Allelveränderung, Häufigkeit in einer Population und klinischen Bedeutung der Variante finden. (Sherry et al., 2001)

2.2.9.2.1 Referenz-Kollektive für Varianten

Es existieren verschiedene Genomprojekte, deren Häufigkeiten einer Variante als Referenz-Kollektiv genutzt werden können. In dieser Arbeit werden die Allelhäufigkeiten insgesamt drei verschiedener Projekte angegeben. Dabei wird der Bezug jeweils zu dem Referenz-Kollektiv hergestellt, welches die meisten untersuchten Proben für das bestimmte Allel enthält. Nach Eingabe der rs-Nummer in der dbSNP-Datenbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) werden unter „*Frequency*“ vorhandene Genomprojekte mit den bestehenden Häufigkeiten aufgelistet (Sherry et al., 2001). Die verwendeten Referenz-Daten der Gesamtpopulation im Ergebnisteil dieser Arbeit stammen aus dieser Datenbank. Zum Vergleich herangezogene Projekte sind „GnomAD_exome“, „TOPMED“ und „ALFA Project“.

GnomAD_exome: Die *Genome Aggregation Database* (gnomAD) ist das Ergebnis eines Zusammenschlusses vieler Wissenschaftler, welche große Sequenzierungsprojekte in einer Datenbank zusammenfassen. Dabei werden Daten über Genome und Exome gesammelt. Der Datensatz beinhaltet die Daten von 125.748 Exomen und 15.708 Genomen nicht verwandter Probanden, welche innerhalb verschiedener populationsgenetischer und krankheitsspezifischer Projekte sequenziert wurden. Die Individuen stammen aus europäischen, lateinamerikanischen, süd- und ostasiatischen, afrikanischen und afroamerikanischen sowie weiteren Populationen. (Karczewski et al., 2020)

TOPMED: „*Trans-Omics for Precision Medicine*“ (TOPMed) ist ein Programm mit dem Ziel, die Prävention und Therapie von kardialen, pulmonalen und hämatologischen Erkrankungen sowie Schlafstörungen zu verbessern. Es werden Sequenzierungsdaten von gesamten Genomen sowie Werte weiterer biologischer Parameter gesammelt. Bisher wurden über 90.000 Genome sequenziert. (National Heart, Lung, and Blood Institute, 2020)

ALFA Project: Das Barcelona-beta Brain Research Center begann das Projekt ALFA. Ziel ist die prospektive Erfassung von Informationen über initial kognitiv unauffällige Probanden mit meist familiärer Vorbelastung durch Morbus (M.) Alzheimer. Der Schwerpunkt liegt auf der Untersuchung von Parametern in frühen präklinischen Stadien, welche der Erkrankung vorausgehen. Auf diese Weise sollen Erkenntnisse über die Pathophysiologie der Erkrankung gewonnen werden. Das Kollektiv bestand zunächst aus einer ALFA-Elternkohorte mit 2743 spanisch oder katalanisch sprechenden Probanden zwischen 45 und 75 J., welches durch weitere Rekrutierung von

Probanden aus dem ALFA-Register erweitert wird. Außerdem nimmt ein Teil der Probanden im Rahmen der ALFA+ Studie an einer Langzeituntersuchung teil. (Molinuevo et al., 2016)

2.2.9.3 Klassifizierung von Varianten (gutartig bis pathogen) mittels

bioinformatischer Vorhersageprogramme und klinischer Datenbanken

Es existieren verschiedene Online-Auswertungsprogramme zur Vorhersage einer potenziellen klinischen Relevanz genetischer Variationen. Zu beachten gilt, dass die Programme nur eine theoretische Vorhersage darstellen und keine 100 % sichere Aussage treffen können.

MutationTaster2 (neueste Version: MutationTaster2, <http://www.mutationtaster.org/>) bewertet die mögliche Pathogenität von Sequenzänderungen als krankheitsverursachend oder nicht. Es wird eine Aussage über die Folgen von AS-Austauschen, aber auch von Varianten im intronischen Bereich und an intronisch-exonischen Grenzen getroffen. Die evolutionäre Konservierung der Varianten wird eingeschätzt. Das Programm wurde speziell für die Vorhersage von seltenen Varianten entwickelt, welche schwere klinische Konsequenzen haben. (Schwarz et al., 2014)

PolyPhen-2 (neueste Version: 2.2, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) wurde speziell für Einzelnukleotid-Polymorphismen in kodierenden Sequenzen mit Folge einer AS-Substitution in einem Protein entwickelt. Es werden mögliche Änderungen der Struktur und Funktion des veränderten Proteins vorhergesagt. Das Programm prüft mittels der UniProtKB/Swiss-Prot Datenbank, ob in dem untersuchten Protein an der Stelle des AS-Austauschs ein Eintrag zu seiner Struktur und Funktion zu finden ist. Dazu zählen das Vorhandensein einer Bindungsstelle, eines aktiven Zentrums, chemischer Vernetzungen wie Disulfidbrücken oder die Lokalisation in einer Transmembrandomäne. Weiterhin wird durch die Betrachtung des 3D-Modells des Proteins eine Vorhersage getroffen, ob durch die Substitution der hydrophobe Kern des Proteins, Interaktionen mit Liganden oder elektrostatische Wechselwirkungen betroffen sind. Die gesammelten Informationen werden an einen probabilistischen Klassifikator weitergeleitet. Über diesen wird die Wahrscheinlichkeit für die Schädlichkeit der genetischen Variante berechnet. Unter Einbeziehung der geschätzten Falsch-Positiv-Rate wird angegeben, ob die Variante als benigne, möglicherweise schädlich, oder wahrscheinlich schädlich zu betrachten ist. (Adzhubei et al., 2010)

Provean (engl. für *Protein Variation Effect Analyzer*, neueste Version Provean v1.1.3,

http://provean.jcvi.org/seq_submit.php) ist eine Software zur Vorhersage der Auswirkungen einer oder mehrerer AS-Substitutionen, -Insertionen oder -Deletionen auf die Proteinfunktion. Der Score wird ebenfalls bei *In-frame*-Insertionen und -Deletionen angewendet. Es wird ein Sequenzsatz aus homologen Sequenzen zusammengestellt, welcher für die Vorhersage genutzt wird. Betrachtet wird das Protein mit einer Sequenzänderung und im Vergleich dazu ein weiteres homologes Protein. Die Ähnlichkeit dieser beiden Proteine wird zwei Mal gemessen: sowohl mit der unveränderten als auch mit der veränderten Proteinsequenz, das homologe Protein bleibt gleich. Die Annahme ist, dass eine geringere Ähnlichkeit für eine höhere Schädigung durch die AS-Änderung spricht. Die Änderung der Ähnlichkeit wird durch den Provean-Score angegeben. Dieser teilt die Variante mithilfe eines festgelegten Score-Grenzwertes als schädlich oder neutral ein. Eine Korrelation zwischen dem Score und der Schädlichkeit der Variante wurde beobachtet. (Choi, 2012; Choi et al., 2012)

Ein weiteres Online-Vorhersage-Tool ist NetGene2 (neueste Version: 2.42, <https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?NetGene2-2.42>). Es wird genutzt, um intronische Spleißstellen vorherzusagen. Ein Algorithmus berechnet mögliche Spleiß-Donor- oder Spleiß-Akzeptor-Stellen. Für eine Vorhersage von veränderten Spleißstellen infolge einer Mutation kann das Tool zwei Mal verwendet und die Ergebnisse anschließend verglichen werden. Zuerst wird die Wildtyp-Variante und in einer zweiten Anfrage folgend die veränderte Basensequenz eingegeben. Die Ergebnisse können verglichen werden, um Auswirkungen der Änderungen auf Spleißstellen vorherzusagen. (Brunak et al., 1991; Hebsgaard et al., 1996)

ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) stellt eine weitere Quelle dar, um die Pathogenität von Varianten zu bewerten. Es handelt sich um eine Online-Datenbank, in welcher Arbeitsgruppen ihre Ergebnisse zur Bewertung der Pathogenität und Klassifizierung von Varianten beschreiben können. (Landrum et al., 2018)

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

Für die Untersuchung des *STUB1*-Gens wurden zwei Patientenkollektive mit insgesamt 80 Patientenproben ausgewählt. Die Proben aus dem Humangenetischen Institut der Universität Gießen entstammen aus Konsultationen in der hausinternen Beratungsstelle oder wurden deutschlandweit eingeschickt. Alle Patienten waren mit der Untersuchung ihrer Proben zu wissenschaftlichen Zwecken einverstanden und die Ethik-Kommission am Fachbereich Medizin in Gießen erteilte eine Zustimmung vor Beginn dieser Arbeit.

Das Ataxie-Kollektiv besteht aus 63 Patientenproben. Es setzt sich aus 28 weiblichen und 35 männlichen Patienten zusammen. Der Eingang der Proben im Institut erfolgte zwischen 1993 und 2020. Die Altersspanne der Patienten bei Einsendung der Proben betrug 20-79 J., der Durchschnitt lag bei ca. 52 J. Ausgewählt wurden die Patienten nach ihrer Symptomatik und Familienanamnese. Eine progrediente ataktische Gangstörung war das Leitsymptom aller ausgewählten Patienten. Soweit in den Krankenakten einsehbar, lag bei einem Teil der Patienten ein früher Krankheitsbeginn (bei acht Patienten vor dem 30. Lebensjahr) vor. Eine Dysarthrie lag bei sieben Patienten, kognitive Defizite bei sechs Patienten und ein Nystagmus bei vier Patienten vor. Mittels Bildgebung konnte bei sechs Patienten eine Kleinhirnatrophie nachgewiesen werden. Der Großteil der Patienten wies eine positive Familienanamnese im Sinne einer autosomal-dominanten Bewegungsstörung auf. Vor Beginn dieser Arbeit erfolgte ein Ausschluss von Trinukleotid-Expansionen (SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA10, SCA12, SCA17) und bestimmten Punktmutationen (SCA11, SCA13, SCA14, SCA15, SCA16, SCA23, SCA28, SCA34, SCA38, SCA44, SCA46).

Das Demenz-Kollektiv umfasst 17 Proben, darunter 15 weibliche und zwei männliche Patienten. Sie gingen zwischen 2000 und 2015 ein. Die Altersspanne lag bei 46-84 J. mit einem Durchschnitt von ca. 63 J. Alle Patienten wiesen eine demenzielle Symptomatik sowie meist einen Zusammenhang zu einer familiären demenziellen Vorbelastung auf. Außerdem waren bei einem Teil der Patienten Hinweise auf eine nicht näher spezifizierte Bewegungsstörung angegeben. Die Familienanamnese weist auf eine genetische Ursache der Erkrankung hin, welche jedoch durch eine negative Testung typischer Gene, die mit familiären Demenzerkrankungen assoziiert sind, wie *PSEN1*, *APP* und *PSEN2*, bisher nicht bestätigt werden konnte. Der Locus SCA17 war in diesem Kollektiv nicht untersucht worden.

3.2 Expression von *STUB1* in verschiedenen Gewebetypen

Bevor das unter 3.1 erläuterte Gesamt-Kollektiv aus 80 DNA-Proben auf Sequenzvarianten in *STUB1* untersucht wird, soll zunächst analysiert werden, ob und in welchen Geweben *STUB1* exprimiert wird. Ausgewählt wurden kommerziell erhältliche RNA-Proben aus humanem Gehirn, Cerebellum, Skelettmuskulatur, Haut und aus Leukozyten. Dabei liegt ein besonderer Fokus auf der Gehirn- bzw. Kleinhirn-Expression, da Fehlfunktionen oder Atrophien dieser Gewebe mit der Ausprägung einer SCA assoziiert sind.

Die RNA-Proben wurden innerhalb einer RT-PCR zunächst in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurden in einer PCR an dieser cDNA spezifische *STUB1*-Fragmente amplifiziert. Verwendet wurden hierfür zwei Primerpaare, die entweder im Exon 1 oder Exon 2 beginnen und im Exon 7 enden. In einer Gelelektrophorese wurden die PCR-Fragmente aufgetrennt und miteinander verglichen (s. Abbildung 7, Abbildung 8). Als interne Kontrolle wurden die RT-PCR-Produkte des Haushaltsgens *RPL19* aus der jeweiligen Gewebeprobe mit aufgetragen. Eine anschließende Sequenzierung der *STUB1*-Fragmente, die an cDNA aus Gehirn amplifiziert worden waren, diente als Bestätigung der PCR-Amplifikate.

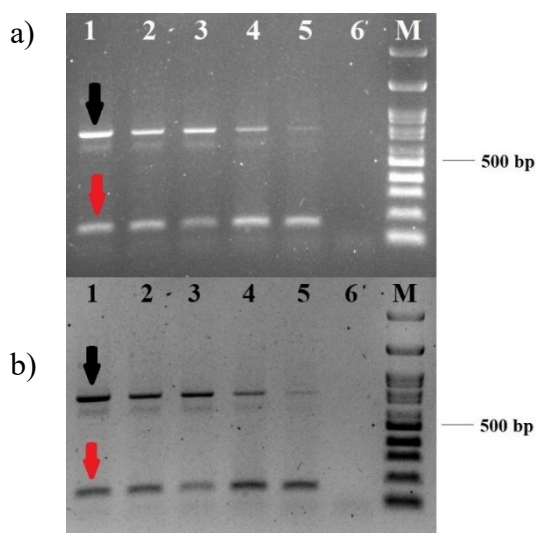


Abbildung 7:

a) Nachweis der Expression von *STUB1* (Exon 1-7) in verschiedenen humanen Gewebetypen

1: Gehirn, 2: Cerebellum, 3: Skelettmuskel, 4: Haut, 5: Blut, periphere Leukozyten, 6: Wasserprobe der PCR, M: Größenmarker, Schwarzer Pfeil: PCR-Produkt *STUB1*-Gen (779 Bp), Roter Pfeil: PCR-Produkt *RPL19*-Gen (152 Bp)

b) Darstellung in der inversen Ansicht

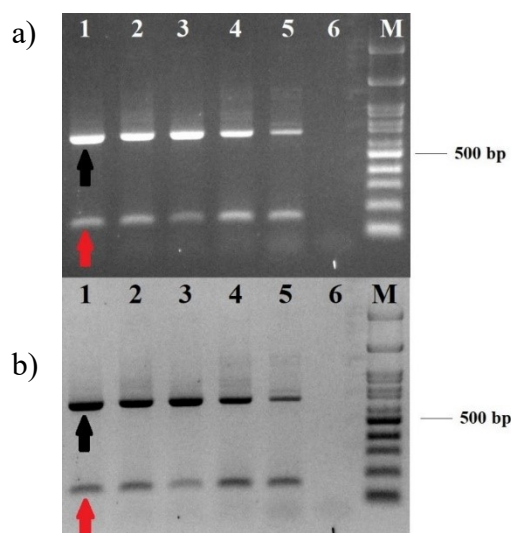


Abbildung 8:

a) Nachweis der Expression von *STUB1* (Exon 2-7) in verschiedenen humanen Gewebetypen

1: Gehirn, 2: Cerebellum, 3: Skelettmuskel, 4: Haut, 5: Blut, periphere Leukozyten, 6: Wasserprobe der PCR, M: Größenmarker, Schwarzer Pfeil: PCR-Produkt *STUB1*-Gen (700 Bp), Roter Pfeil: PCR-Produkt *RPL19*-Gen (152 Bp)

b) Darstellung in der inversen Ansicht

Es konnte gezeigt werden, dass das *STUB1*-Gen in allen untersuchten Gewebetypen exprimiert wird. Dabei sind quantitative Unterschiede sichtbar. Im menschlichen Gehirn, auch speziell im Cerebellum, sowie in der Skelettmuskulatur scheint eine stärkere Expression stattzufinden als in der menschlichen Haut. Noch schwächer ist die *STUB1*-Expression in Leukozyten.

Im Vergleich der Produkte der beiden Gene fällt auf, dass das *STUB1*-Gen teilweise deutlich stärker als das Haushaltsgen *RPL19* exprimiert wird. Dies gilt für die Proben 1-3 (Abbildung 7) bzw. 1-4 (Abbildung 8).

3.3 Varianten im Ataxie-Kollektiv

Die Zuordnung von genetischen Varianten in fünf Klassen (1. Normvariante ohne klinische Relevanz, 2. wahrscheinliche Normvariante, 3. unklare klinische Relevanz, 4. wahrscheinlich pathogen, 5. pathogen) erfolgt anhand der Richtlinien des ACMG-Klassifizierungssystems (Richards et al., 2015) (s. 1.4.3.3). Angaben zur Klassifizierung der klinisch relevanten Varianten finden sich unter der Beschreibung der Varianten (s. 3.3.2, 3.4.2).

Für die Benennung der Veränderungen der identifizierten Varianten auf Gen- oder Proteinebene wurde die *Human Genome Variation Society* (HGVS) Nomenklatur verwendet, welche unter <http://varnomen.hgvs.org/> zu finden ist (den Dunnen et al., 2016).

3.3.1 Varianten vermutlich ohne klinische Relevanz

Im Ataxie-Kollektiv wurden fünf Varianten vermutlich ohne klinische Relevanz identifiziert und entsprechend den ACMG-Richtlinien als Klasse 1 (Normvariante) bzw. Klasse 2 (wahrscheinliche Normvariante) eingestuft. Diese sind nach der Lokalisation im *STUB1*-Gen von der 5' nicht-translatierten Region bis zur 3' nicht-translatierten Region aufgeführt.

3.3.1.1 5'UTR

In der 5' untranslatierten Region (UTR) fand sich eine vorbekannte Variante mit der Nummer rs781251943. An dieser Stelle befindet sich ein heterozygoter Basenaustausch von Cytosin zu Thymin (c.1-165C>T). Zu finden war die Variante bei den Proben 821.1 und 892.1. Global wird die Allelhäufigkeit mit $T = 0,0035$ (435/125568, TOPMED) angegeben. Die berechnete Allelfrequenz im Ataxie-Kollektiv beträgt $T = 0,0159$ und im Gesamtkollektiv $T = 0,0125$.

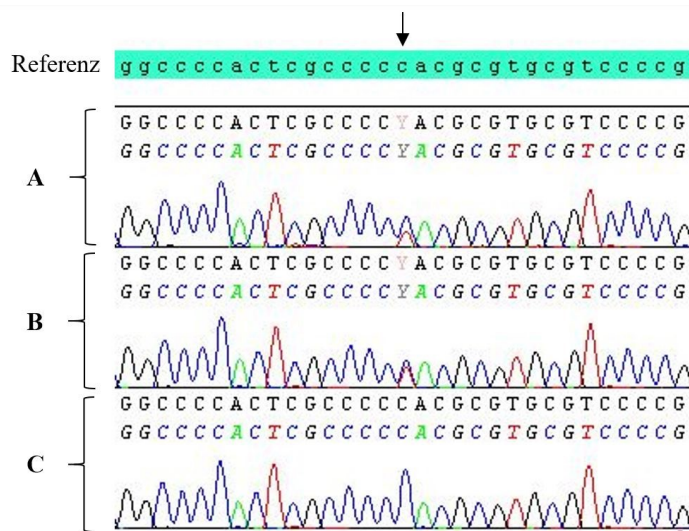


Abbildung 9: Ausschnitt der 5'UTR Sequenz des *STUB1*-Gens, Darstellung der Elektropherogramme. A - B: Sequenzvariante c.1-165C>T heterozygot. A: Probe 821.1, B: Probe 892.1 C: Probe 912.1 Wildtyp homozygot

3.3.1.2 Intron 3

In Intron 3 wurden zwei Varianten nachgewiesen.

Bei einer vorbeschriebenen Variante mit der Kennung rs6597 handelt es sich um eine heterozygote oder homozygote Transversion von Thymin zu Guanin (c.425-68T>G). 23 Proben, darunter 16 des Ataxie-Kollektivs und sieben des Demenz-Kollektivs, wiesen die heterozygote Variante TG, zwei Proben des Ataxie-Kollektivs die homozygote Variante GG und 55 Proben, darunter 45 des Ataxie-Kollektivs und 10 des Demenz-Kollektivs, den homozygoten Wildtyp TT auf. Die Allelhäufigkeit in der Gesamtpopulation wird mit $G = 0,1454$ (18569/127692, ALFA Project) angegeben. Im Gesamtkollektiv beträgt sie $G = 0,1688$.

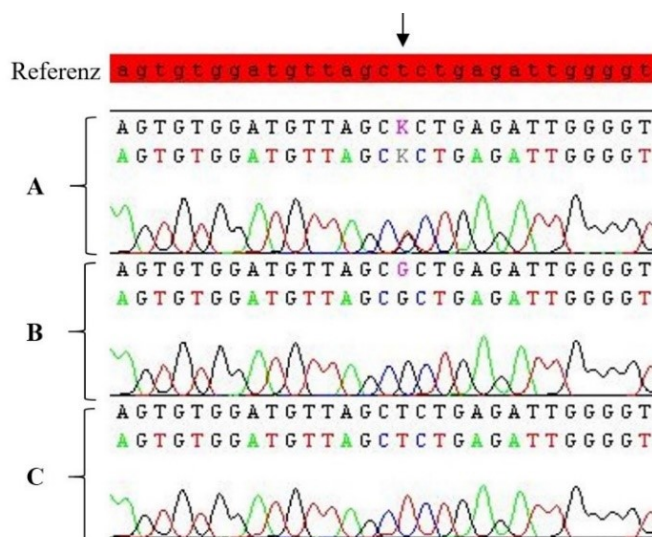


Abbildung 10: Ausschnitt der Intron 3 Sequenz des *STUB1*-Gens, Darstellung der Elektropherogramme. A - B: Sequenzvariante c.425-68T>G. A: Probe 1110.1 heterozygot, B: Probe 1017.1 homozygot
 C: Probe 1130.1 Wildtyp homozygot

Zusätzlich wurde in Intron 3 die bekannte Variante rs1046112 nachgewiesen. Es handelt sich um einen heterozygoten Basenaustausch von Cytosin zu Thymin (c.425-22C>T). Die Variante wurde bei drei Proben identifiziert (797.1, 1010.1, 1143.1). Global wird die Allelhäufigkeit mit $T = 0,0321$ (7425/231024, GnomAD_exome) angegeben. Die berechneten Allelhäufigkeiten betragen $T = 0,0238$ im Ataxie-Kollektiv und $T = 0,0188$ im Gesamtkollektiv.

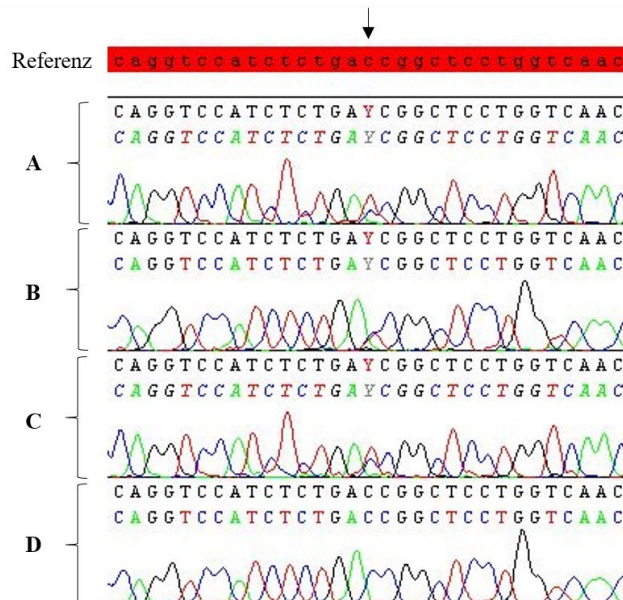


Abbildung 11: Ausschnitt der Intron 3 Sequenz des *STUB1*-Gens, Darstellung der Elektropherogramme. A - C: Sequenzvariante c.425-22C>T heterozygot. A: Probe 797.1, B: Probe 1010.1, C: Probe 1143.1
 D: Probe 1023.1, Wildtyp homozygot

3.3.1.3 Intron 4

In Intron 4 wurde an der Position 53 eine bekannte Variante mit der Kennung rs41292279 nachgewiesen. Diese beschreibt eine heterozygote Transition von Guanin zu Adenin (c.612+53G>A). Identifiziert wurde die Variante bei den drei Proben 983.1, 1002.1 und 1088.1. In der Gesamtpopulation beträgt die Häufigkeit des Allels A = 0,0090 (2241/250094, GnomAD_exome), im Ataxie-Kollektiv A = 0,0238 und im Gesamtkollektiv A = 0,0188.

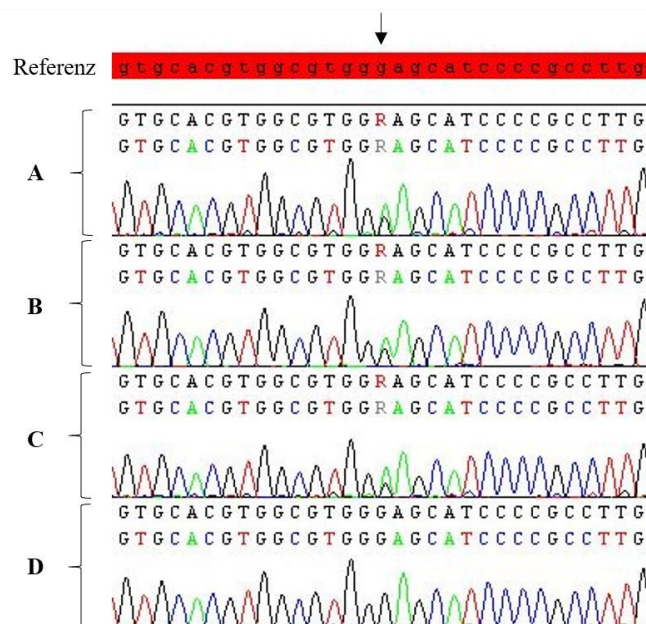


Abbildung 12: Ausschnitt der Intron 4 Sequenz des *STUB1*-Gens, Darstellung der Elektropherogramme. A - C: Sequenzvariante c.612+53G>A heterozygot. A: Probe 983.1, B: Probe 1002.1, C: Probe 1088.1 D: Probe 200.1, Wildtyp homozygot

3.3.1.4 Intron 6

In Intron 6 fand sich die vorbekannte Variante rs3216838 mit einer heterozygoten oder homozygoten Deletion der Base Cytosin an der Position 8 (c.786+8delC). Insgesamt zeigte sich eine heterozygote Deletion CC/C bei 34 Proben, darunter 24 des Ataxie-Kollektivs und 10 des Demenz-Kollektivs. Eine homozygote Deletion C/C trat bei 16 Proben, darunter 14 des Ataxie-Kollektivs und zwei des Demenz-Kollektivs, auf. Der Wildtyp CC/CC konnte bei 30 Proben, darunter 25 des Ataxie-Kollektivs und fünf des Demenz-Kollektivs, identifiziert werden. In Datenbanken (GnomAD) findet sich eine ausgewogene Verteilung der Allele CC und delC. Im hier untersuchten Gesamtkollektiv war die Allel-Frequenz der Deletion geringfügig niedriger. Das Allel wird mit einer Häufigkeit von CC = 0,4890 (122194/249898, GnomAD_exome) in der Gesamtpopulation angegeben. Im Gesamtkollektiv beträgt die Allelhäufigkeit delC = 0,4125.

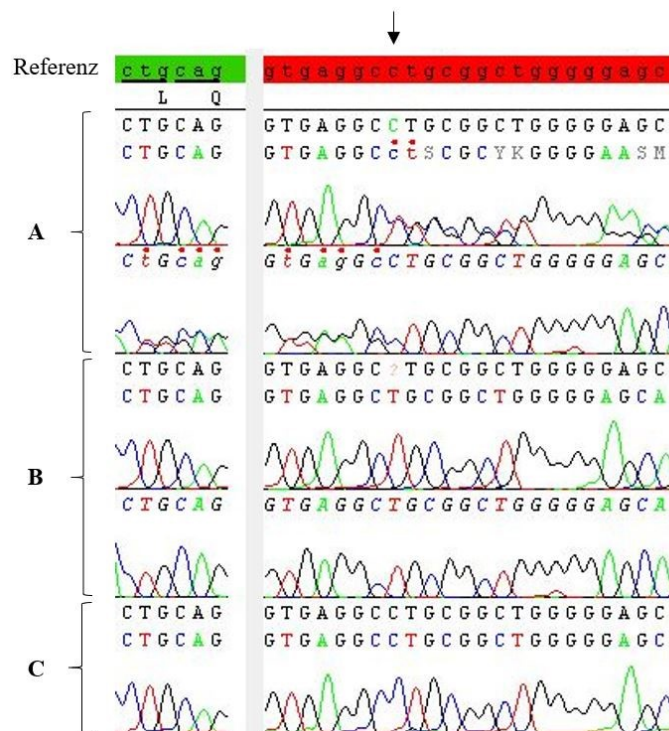


Abbildung 13: Ausschnitt der Exon 6 und Intron 6 Sequenz des *STUB1*-Gens, Darstellung der Elektropherogramme. Grüner Sequenzbereich: Exon 6, roter Sequenzbereich: Intron 6.

A - B: Sequenzvariante c.786+8delC, A: Probe 1115.1, heterozygot, Primer 4F, Primer 7R, B: Probe 339.1, homozygot, Primer 4F, Primer 7R, C: Probe 1113.1, Wildtyp homozygot

Zur Übersicht der vermutlich nicht klinisch relevanten *STUB1*-Varianten im Ataxie-Kollektiv sind diese in der Tabelle 20 zusammengefasst.

Tabelle 20: Überblick über identifizierte Varianten im *STUB1*-Gen im Ataxie-Kollektiv vermutlich ohne klinische Relevanz

Variante/ Lokalisation	rs-Nummer	Basen- austausch	Häufigkeit global	Häufigkeit Gesamtkollektiv/ Teilkollektiv
c.1-165C>T 5'UTR	rs781251943	C>T	T = 0,0035 (435/125568, TOPMED)	T = 0,0125 T = 0,0159
c.425-68T>G Intron 3	rs6597	T>G	G = 0,1454 (18569/127692, ALFA Project)	G = 0,1688
c.425-22C>T Intron 3	rs1046112	C>T	T = 0,0321 (7425/231024, GnomAD_exome)	T = 0,0188 T = 0,0238
c.612+53G>A Intron 4	rs41292279	G>A	A = 0,0090 (2241/250094, GnomAD_exome)	A = 0,0188 A = 0,0238
c.786+8delC Intron 6	rs3216838	delC	CC = 0,4890 (122194/249898, GnomAD_exome)	delC = 0,4125

Diese fünf nachgewiesenen und vorbekannten *STUB1*-Varianten sind vermutlich ohne klinische Relevanz. Keine der oben zusammengestellten Varianten ohne klinische Signifikanz ist in der Datenbank ClinVar (Landrum et al., 2018) gelistet.

3.3.2 Varianten mit vermutlich klinischer Relevanz

Im Folgenden werden fünf Varianten beschrieben, welche durch eine Veränderung in der Nukleotidsequenz zu einem AS-Austausch, oder einer veränderten AS-Abfolge im Protein mit vermutlich klinischer Relevanz führen. Es handelt sich um vier Punktmutationen und um eine Deletion von zwei Basen in der codierenden *STUB1*-Sequenz. Alle Varianten wurden mit mindestens einem neuen PCR-Produkt bestätigt und jeweils mit einer Primer-Kombination sequenziert, um die Ergebnisse zu reproduzieren und zu sichern.

3.3.2.1 Exon 1

c.146A>G	p.Tyr49Cys	MutationTaster: 0,9999 <i>disease causing</i>	PolyPhen-2: 1,000 <i>probably damaging</i>	Provean: -7,252 <i>deleterious</i>
--------------------	------------	--	---	---------------------------------------

In Exon 1 zeigte die Probe 4.1 eine vorbeschriebene Variante mit der Nummer rs757849639 (Roux et al., 2020). An Position c.146 liegt eine heterozygote Transition von Adenin zu Guanin (c.146A>G) vor. Da der Basenaustausch die zweite Position im Codon TAC betrifft, kommt es zu einer Änderung der AS von Tyrosin zu Cystein (p.Tyr49Cys). Der Austausch ist in der TPR-Domäne von CHIP lokalisiert. In der Gesamtbevölkerung wird eine Allelfrequenz von G = 0,000040 (5/125568, TOPMED) angegeben. Die berechnete Allelhäufigkeit beträgt G = 0,0063 im Gesamtkollektiv und G = 0,0079 im Ataxie-Kollektiv.

Mögliche Effekte der Variante wurden durch Verwendung von *in silico* Vorhersageprogrammen untersucht. MutationTaster prognostiziert eine Pathogenität (*disease causing*) mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,9999. Außerdem sagt PolyPhen-2 eine wahrscheinliche Schädlichkeit (*probably damaging*) mit einem Score von 1,000 (HumDiv und HumVar) voraus. Auch Provean gibt eine Schädlichkeit (*deleterious*) mit einem Score von -7,252 bei einem *Cut-Off*-Wert von -2,5 an. Abbildung 15 zeigt die phylogenetische Konservierung des Bereichs um die Variante p.Tyr49Cys. Es besteht eine sehr hohe Konservierung der AS Tyrosin (Y); eine Ausnahme bildet der Haushund

(*Canis lupus familiaris*). Die Variante kann nach ACMG als Klasse 4-Variante eingestuft werden, da sie bereits als pathologisch vorbeschrieben wurde (Roux et al., 2020) (PS1) und sie in einer funktionell wichtigen Domäne lokalisiert ist (PM1).

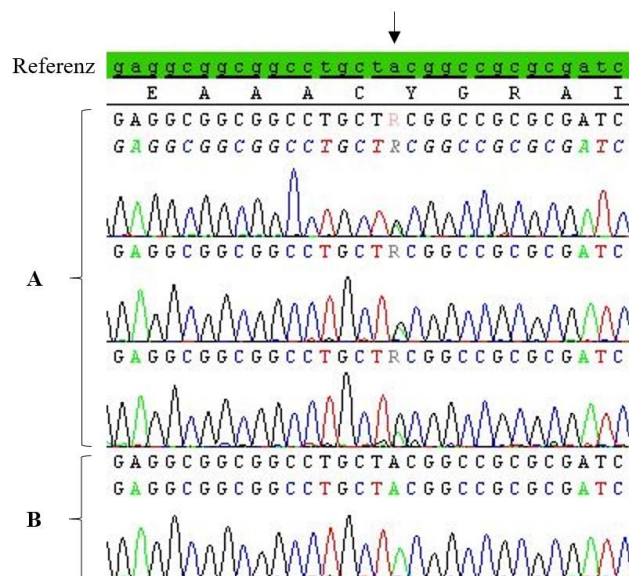


Abbildung 14: Ausschnitt der Exon 1 Sequenz des *STUB1*-Gens, Darstellung der Elektropherogramme. A: Probe 4.1, Sequenzvariante c.146A>G heterozygot, B: Probe 1143.1, Wildtyp homozygot

H. sapiens	NRLFVGRKYPEAAACYG RAI TRNPLVAVYYT	ENSP00000219548
P. troglodytes	NRLFVGRKYPEAAACY G RAI T TRNPLVAVYYT	ENSPTRP00000012898
M. mulatta	NRLFVGRKYPEAAACYG RAI TRNPLVAVYYT	ENSMMP00000043126
M. musculus	NRLFVGRKYPEAAACYG RAI TRNPLVAVYYT	ENSMUSP00000040431
R. norvegicus	NRLFVGRKYPEAAACYG RAI TRNPLVAVYYT	ENSRNOP00000026921
F. catus	NRLFVGRKYPEAAACYG RAI TRNPLVAVYYT	ENSFCAP00000007706
C. lupus familiaris	PR-----Q ATTI T G RA E TRNPLVAVYYT	ENSCAFP00000036229
T. rubripes	NRLF L CRKY Q EAA T CY S KAI N RNPLVAVYYT	ENSTRUP00000037854
D. rerio	NRLF L SRKY Q EAV T CY S KAI N RNP S VAVYYT	ENSDARP00000118937
X. tropicalis	NRLFV A RKY Q EAV S CY S KAI T RN S SI A VYYT	ENSXETP00000062266
D. melanogaster	NCL F AARKY D DA I NCY S KAI I KN P T N ATY F T	FBpp0079617
C. elegans	K KCY M NKRY D DA V D H Y S KAI K V N PL - PKYY Q	T09B4.10.2

Abbildung 15: Konservierung von CHIP an der AS-Position 49 (rot umrandet). Abgebildet sind die humane Sequenz sowie orthologe Alignements. In rot markiert ist eine abweichende AS an der beobachteten Stelle. Weitere nicht konservierte AS im Vergleich zu *Homo sapiens* sind blau markiert. Die zugehörigen Peptid-Nummern sind aufgelistet.

Homo sapiens (Mensch), *Pan troglodytes* (Schimpanse), *Macaca mulatta* (Rhesusaffe), *Mus musculus* (Maus), *Rattus norvegicus* (Ratte), *Felis catus* (Katze), *Canis lupus familiaris* (Hund), *Takifugu rubripes* (engl. Tiger puffer), *Danio rerio* (Zebrafisch), *Xenopus tropicalis* (Tropischer Krallenfrosch), *Drosophila melanogaster* (Fruchtfliege), *Caenorhabditis elegans* (Fadenwurm). Inhalte entstammen aus der Datenbank www.ensembl.org. (Cunningham et al., 2022) Die Bezeichnungen der Lebewesen nach der taxonomischen Klassifikation sind unter www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy zu finden. (NLM, 2022)

3.3.2.1.1 Patientenbericht

Die Index-Patientin 4.1 stellte sich im Alter von 52 J. zunächst bei einem neurologischen Facharzt und anschließend in einer genetischen Beratungsstelle vor. Die Index-Patientin weist eine Bewegungsstörung unklarer Genese auf, die auch bei ihrer Mutter vorlag. Weiterhin gibt sie unspezifische Symptome wie Müdigkeit, ein Erschöpfungsgefühl und Unkonzentriertheit an. Gleichzeitig fühle sie sich subjektiv wohl. Sie berichtet, die Erkrankung der Mutter habe mit 50 Lebensjahren begonnen, die Symptomatik sei ähnlich gewesen. Bis zum Versterben der Mutter im Alter von 59 J. sei bei ihr ein demenzieller Abbauprozess beobachtet worden. Zu dem damaligen Zeitpunkt waren alle drei Kinder der Index-Patientin 4.1 asymptomatisch. Es erfolgte ebenfalls eine genetische Beratung der Kinder, des Partners, eines Bruders, einer Schwester und eines Neffen der Index-Patientin. Diese sind im Stammbaum numerisch markiert. Eine genetische Testung der Familie auf bekannte Loci verschiedener SCA, auch Trinukleotiderkrankungen, zeigte keinen pathologischen Befund.

Die Index-Patientin ist räumlich und zeitlich orientiert. In der körperlichen Untersuchung wurde eine Dysdiadochokinese beidseits, ein deutlich cerebellär anmutender ataktischer Gang und eine cerebelläre Dysarthrie festgestellt. Zudem wurde die Patientin als verlangsamt eingeschätzt. Ein MRT zeigte eine ausgeprägte cerebelläre Atrophie. Die Befunde wiesen auf einen degenerativen Prozess im Bereich des Cerebellums mit einer pontocerebellären Degeneration hin.

3.3.2.1.2 Stammbaum Pat. 4.1

In vier von sieben untersuchten DNA-Proben von Verwandten der Patientin 4.1 konnte die Mutation c.146A>G ebenfalls identifiziert werden. Betroffen sind neben der Index-Patientin die Töchter (4.4, 4.5), der Neffe (4.7) und die Schwester (4.8). In der prädiktiven Testung eines Bruders (4.6) wurde an der betroffenen Stelle das Wildtyp-Allel nachgewiesen.

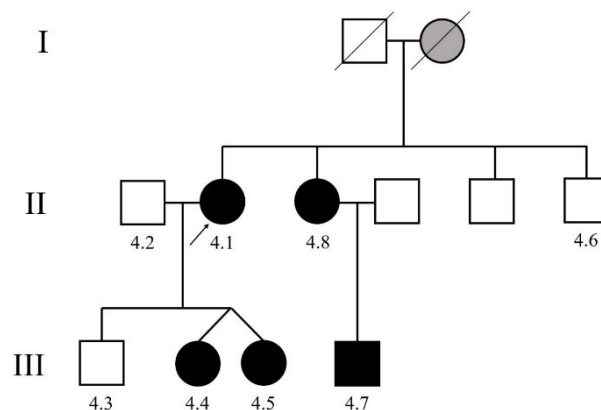


Abbildung 16: Stammbaum der Familie der Patientin 4.1. Kreise kennzeichnen weibliche und Quadrate männliche Personen. Die Index-Patientin ist mit einem Pfeil markiert. Von der Mutation betroffene Personen sind mit einem schwarzen Symbol markiert. Die phänotypisch betroffene Mutter der Index-Patientin wurde molekulargenetisch nicht getestet und ist grau markiert. Verstorbene Familienmitglieder sind mit durchgestrichenen Symbolen dargestellt.

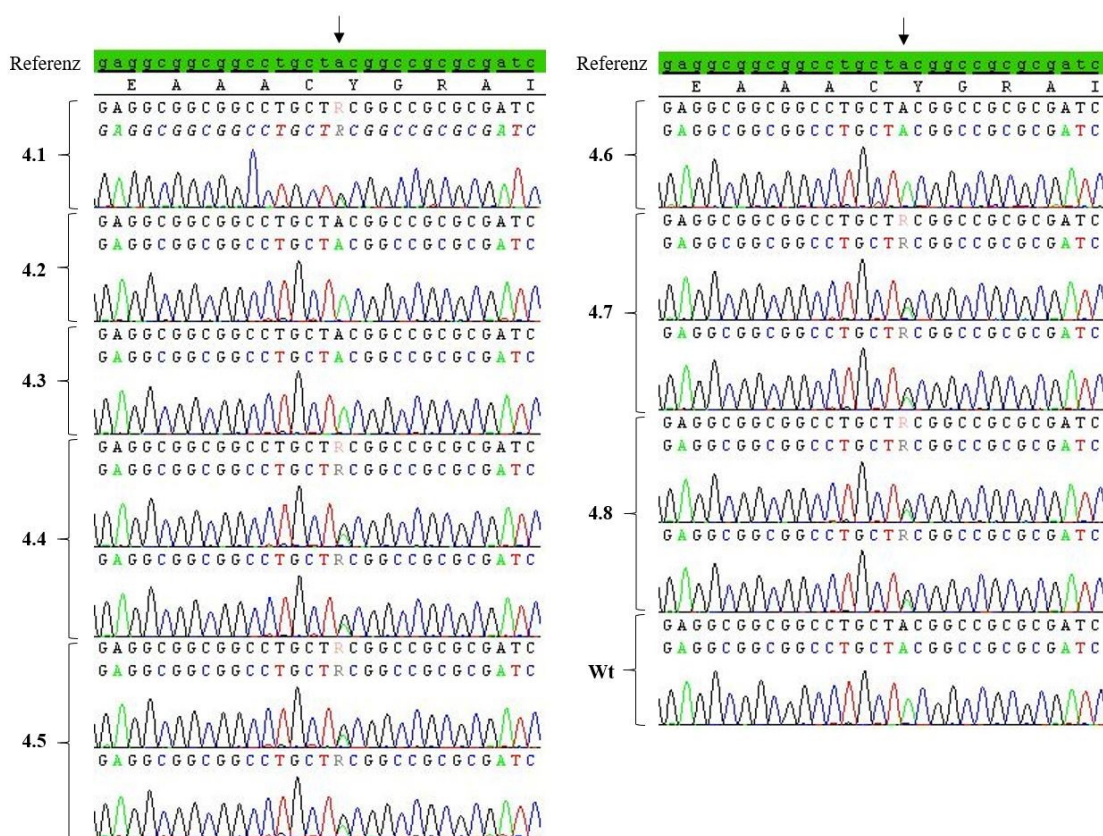


Abbildung 17: Ausschnitt der Exon 1 Sequenz des *STUB1*-Gens, Darstellung der Elektropherogramme. Nachweis der Variante c.146A>G bei Angehörigen der Index-Patientin 4.1. Dargestellt sind die Proben 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8 und 1143.1. Als Vergleichssequenz dient der mit "Wt" beschriftete homozygote Wildtyp der Probe 1143.1.

Die Proben 4.1, 4.4, 4.5, 4.7 und 4.8 weisen die heterozygote Sequenzvariante c.146A>G auf. Die Proben 4.2, 4.3, 4.6, weisen an dieser Stelle den homozygoten Wildtyp auf.

3.3.2.2 Exon 2

c.283A>G	p.Lys95Glu	MutationTaster: 0,9999 <i>disease causing</i>	PolyPhen-2: 1,000 <i>probably damaging</i>	Provean: -3,860 <i>deleterious</i>
--------------------	------------	--	---	---------------------------------------

In Exon 2 zeigte die Probe 1124.1 an der 124. Base einen bisher unbekanntem Austausch. An Position c.283 liegt ein heterozygoter Austausch von Adenin zu Guanin vor (c.283A>G). Dieser betrifft die erste Base im Codon AAG. Folglich kommt es zu einer Substitution von Lysin durch Glutaminsäure (p.Lys95Glu). Die veränderte AS liegt ebenfalls in der TPR-Domäne von CHIP. Die Allelhäufigkeit beträgt $G = 0,0063$ im Gesamtkollektiv und $G = 0,0079$ im Ataxie-Kollektiv.

MutationTaster sagt eine Pathogenität (*disease causing*) von 0,9999 voraus. PolyPhen-2 gibt eine wahrscheinliche Schädlichkeit (*probably damaging*) mit einem Score von 1,000 (HumDiv und HumVar) an. Das Ergebnis der Vorhersage von Provean ist ebenfalls schädlich (*deleterious*) mit einem Score von -3,860 bei einem *Cut-Off*-Wert von -2,5. Das Lysin (K) an AS-Position 95 ist bei den analysierten Spezies durchgängig konserviert (Abbildung 19). Nach ACMG ist c.283A>G als Klasse 4-Variante einzuordnen, da sie in der funktionell wichtigen TPR-Domäne lokalisiert ist (PM1), zudem in Sequenzierungsprojekten bisher nicht aufgetreten ist (PM2), es sich um eine *Missense*-Variante handelt (PP2) und Vorhersagen eine Malignität unterstützen (PP3).

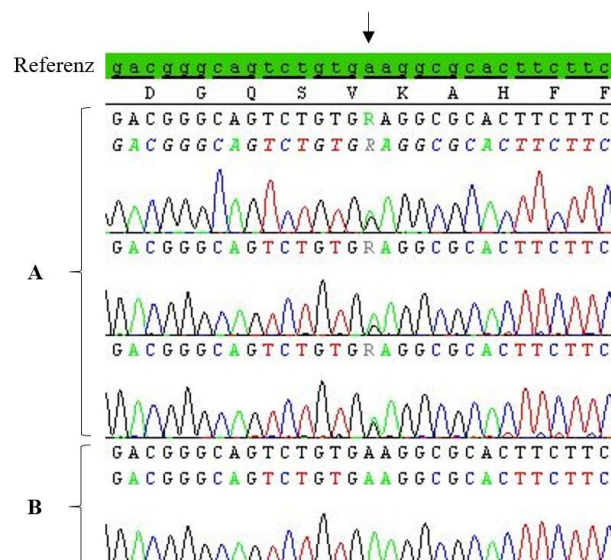


Abbildung 18: Ausschnitt der Exon 2 Sequenz des *STUB1*-Gens, Darstellung der Elektropherogramme. A: Probe 1124.1, Sequenzvariante c.283A>G heterozygot, B: Probe 1130.1, Wildtyp homozygot

H. sapiens	LADCRRALELDGQSVK K AHFFLGGQCQLEMESY	ENSP00000219548
P. troglodytes	LADCRRALELDGQSVK K AHFFLGGQCQLEMESY	ENSPTRP00000012898
M. mulatta	LADCRRALELDGQSVK K AHFFLGGQCQLEMESY	ENSMMP00000043126
M. musculus	LADCRRALELDGQSVK K AHFFLGGQCQLEMESY	ENSMUSP00000040431
R. norvegicus	LADCRRALELDGQSVK K AHFFLGGQCQLEMESY	ENSRNOP00000026921
F. catus	LADCRRALELDGQSVK K AHFFLGGQCQLEMESY	ENSFCAP00000007706
C. lupus familiaris	LADCRRALELDGQSVK K AHFFLGGQCQLEMESY	ENSCAFP00000036229
T. rubripes	LADCKHALELDSQSV K AHFFLGGQC H LELENF	ENSTRUP00000037854
D. rerio	LADCKHALELDSQSV K AHFFLGGQCQLELENY	ENSARP00000118937
X. tropicalis	LADCKHALELDCQSV K AHFFLGGQCQMELENY	ENSXETP00000062266
D. melanogaster	CQDSRRALDIDGNL K GHFFLGGQGLMEIDNF	FBpp0079617
C. elegans	EEDCKRALELSPNEV K PLYFLGNVFLQSKKY	T09B4.10.2

Abbildung 19: Konservierung von CHIP an der AS-Position 95 (rot umrandet). Abgebildet sind die humane Sequenz sowie orthologe Alignements. Nicht konservierte AS im Vergleich zu *Homo sapiens* sind blau markiert. Die zugehörigen Peptid-Nummern sind aufgelistet.

Homo sapiens (Mensch), *Pan troglodytes* (Schimpanse), *Macaca mulatta* (Rhesusaffe), *Mus musculus* (Maus), *Rattus norvegicus* (Ratte), *Felis catus* (Katze), *Canis lupus familiaris* (Hund), *Takifugu rubripes* (engl. Tiger puffer), *Danio rerio* (Zebrafisch), *Xenopus tropicalis* (Tropischer Krallenfrosch), *Drosophila melanogaster* (Fruchtfliege), *Caenorhabditis elegans* (Fadenwurm). Inhalte entstammen aus der Datenbank www.ensembl.org. (Cunningham et al., 2022) Die Bezeichnungen der Lebewesen nach der taxonomischen Klassifikation sind unter www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy zu finden. (NLM, 2022)

3.3.2.2.1 Patientenbericht

Der Patient 1124.1 wurde erstmals im Alter von 41 J. molekulargenetisch auf spinocerebelläre Ataxien untersucht. Die Diagnostik erfolgte aufgrund der Symptomatik einer langsam progredienten cerebellären Ataxie. Familienanamnestisch seien keine Hinweise zu finden, jedoch fehlen Informationen über den Vater sowie die weitere Familie. Im kranialen MRT sei eine cerebelläre Atrophie festgestellt worden.

3.3.2.3 Exon 3

c.433A>C	p.Lys145Gln	MutationTaster: 0,9999	PolyPhen-2: 0,445	Provean: -2,340
		<i>disease causing</i>	<i>benign</i>	<i>neutral</i>

In Exon 3 wurde bei der Probe 1145.1 eine heterozygote Transversion von Adenin zu Cytosin (c.433A>C) nachgewiesen. Die Variante ist bereits bekannt und unter rs146251364 annotiert (Depondt et al., 2014). Durch den Austausch der ersten Base im Triplet AAG kommt es zu einem AS-Austausch von Lysin zu Glutamin (p.Lys145Gln). Die Position der veränderten AS befindet sich im Bereich der helikalen Haarnadel-Region des Proteins. In der Gesamtpopulation beträgt die Allelhäufigkeit C = 0,0006 (148/249012, GnomAD_exome). Die berechneten Allelhäufigkeiten ergeben C = 0,0063 für das Gesamtkollektiv und C = 0,0079 für das Ataxie-Kollektiv.

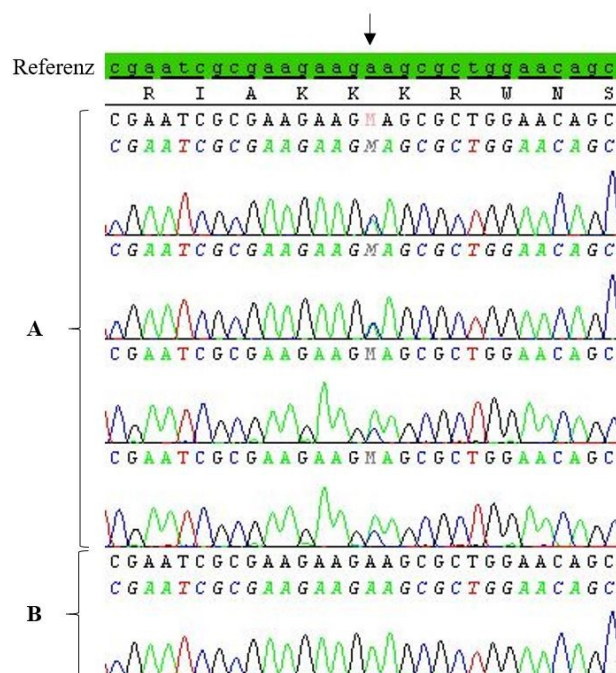


Abbildung 20: Ausschnitt der Exon 3 Sequenz des *STUB1*-Gens, Darstellung der Elektropherogramme. A: Probe 1145.1, Sequenzvariante c.433A>C heterozygot, B: Probe AD25, Wildtyp homozygot

Die Bewertung von MutationTaster für diese Variante ist krankheitsverursachend (*disease causing*) mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,9999. PolyPhen-2 trifft eine benigne Vorhersage (*benign*) mit einem Score von 0,445 (HumDiv). Auch Provean kommt zu der Aussage einer nicht pathogenen Variante (*neutral*) mit einem Score von -2,340 bei einem *Cut-Off*-Wert von -2,5. Vor Beginn dieser Arbeit wurde die

Variante in compound-heterozygoter Form (c.433A>C/c.687-690delCTAC) für die autosomal-rezessive spinocerebelläre Ataxie 16 (SCAR16) beschrieben (Depondt et al., 2014). Das an AS-Position 145 vorkommende Lysin (K) ist phylogenetisch hoch konserviert, lediglich bei *C. elegans* findet sich an der Stelle ein Glutamin (Q, Abbildung 21). Der als pathogen vorbeschriebene AS-Austausch (PS1) sowie die Annahme einer de novo Genese bei leerer Familienanamnese (PM6) führen zu einer Einteilung in eine Klasse 4-Variante nach ACMG.

H. sapiens	NFGDDIP S ALRIAKKKR W NSIEERRIHQ E SE	ENSP00000219548
P. troglodytes	NFGDDIP S ALRIAKKKR W NSIEERRIHQ E SE	ENSPTRP00000012898
M. mulatta	NFGDDIP S ALRIAKKKR W NSIEERRIHQ E SE	ENSMMPUP000000043126
M. musculus	NFGDDIP S ALRIAKKKR W NSIEERRIHQ E SE	ENSMUSP000000040431
R. norvegicus	NFGDDIP S ALRIAKKKR W NSIEERRIHQ E SE	ENSRNOP000000026921
F. catus	NFGDDIP S ALRIAKKKR W NSIEERRIHQ E NE	ENSFCAP00000007706
C. lupus familiaris	NFGDDIP S ALRIAKKKR W NSIEERRIHQ E NE	ENSCAFP000000036229
T. rubripes	NFGDDIP S ALRIAKKKR W NSIE D KRINQ E NE	ENSTRUP000000037854
D. rerio	NFGDDIP S ALRIAKKKR W NSIEEKRI S Q E NE	ENSDARP000000118937
X. tropicalis	NFGDDIP S ALRIAKKKR W NSIEERRINQ E NE	ENSXETP000000062266
D. melanogaster	NFGDDITLQLRLARKKR W NVMEEKRIQQEIE	FBpp0079617
C. elegans	TNAPDIENALKRARHOKYEEEE S KRIVQDVE	T09B4.10.2

Abbildung 21: Konservierung von CHIP an der AS-Position 145 (rot umrandet). Abgebildet sind die humane Sequenz sowie orthologe Alignments. Eine abweichende AS in der Sequenz des Fadenwurms (*Caenorhabditis elegans*) ist rot markiert. Weitere nicht konservierte AS im Vergleich zu *Homo sapiens* sind blau markiert. Die zugehörigen Peptid-Nummern sind aufgelistet.

Homo sapiens (Mensch), *Pan troglodytes* (Schimpanse), *Macaca mulatta* (Rhesusaffe), *Mus musculus* (Maus), *Rattus norvegicus* (Ratte), *Felis catus* (Katze), *Canis lupus familiaris* (Hund), *Takifugu rubripes* (engl. Tiger puffer), *Danio rerio* (Zebrafärbling), *Xenopus tropicalis* (Tropischer Krallenfrosch), *Drosophila melanogaster* (Fruchtfliege), *Caenorhabditis elegans* (Fadenwurm). Inhalte entstammen aus der Datenbank www.ensembl.org. (Cunningham et al., 2022) Die Bezeichnungen der Lebewesen nach der taxonomischen Klassifikation sind unter www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy zu finden. (NLM, 2022)

3.3.2.3.1 Patientenbericht

Der Patient 1145.1 stellt sich im Alter von 50 J. aufgrund einer Ataxie vor. Er berichtet von einem Beginn erster neurologischer Symptome mit ca. 39 Lebensjahren. Die Familienanamnese ist nach Angaben des Patienten leer. Es zeigt sich in der neurologischen Untersuchung eine progrediente Ataxie mit einer Betonung der unteren Extremitäten und diskreter Beeinträchtigung der oberen Extremitäten.

3.3.2.4 Exon 6

c.728C>T	p.Pro243Leu	MutationTaster: 0,9999	PolyPhen-2: 1,000	Provean: -9,203
		<i>disease causing</i>	<i>probably damaging</i>	<i>deleterious</i>

In Exon 6 wurde die bereits vorbeschriebene Variante mit der Kennung rs751656037 bei der Probe 977.1 identifiziert (Hayer et al., 2017; Roux et al., 2020). An Position c.728 liegt eine heterozygote Transition von Cytosin zu Thymin (c.728C>T) vor. Da die zweite Base im Codon CCG betroffen ist, kommt zu einer Änderung der zugehörigen AS von Prolin zu Leucin (p.Pro243Leu). Die AS befindet sich in der U-Box-Domäne des Proteins. In der Gesamtpopulation wird die Allelfrequenz mit T = 0,000004 (1/250246, GnomAD_exome) angegeben. Die Berechnung beträgt T = 0,0063 für das Gesamt- und T = 0,0079 für das Ataxie-Kollektiv.

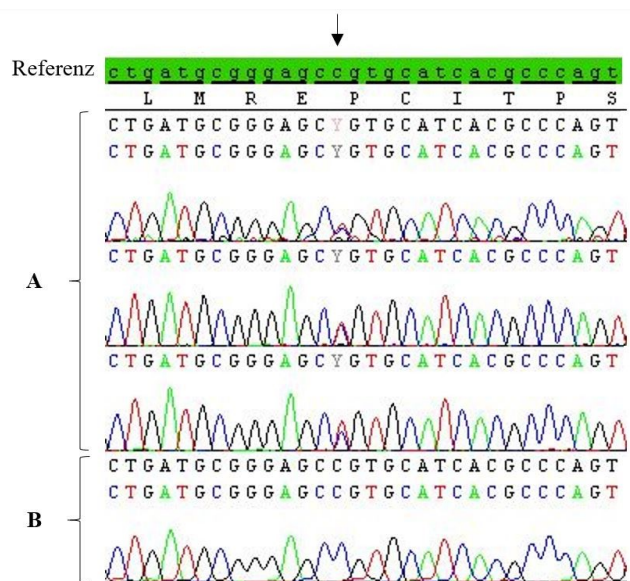


Abbildung 22: Ausschnitt der Exon 6 Sequenz des *STUB1*-Gens, Darstellung der Elektropherogramme. A: Probe 977.1, Sequenzvariante c.728C>T heterozygot, B: Probe AD10, Wildtyp homozygot

Die Prognose des MutationTasters ist pathogen (*disease causing*) mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,9999. Eine Berechnung von PolyPhen-2 sagt eine vermutete Schädlichkeit (*probably damaging*) mit einem Score von 1,000 (HumDiv) voraus. Provean berechnet einen Score von -9,203 (*deleterious*). Die betroffene AS Prolin (P) ist phylogenetisch hoch konserviert (Abbildung 23). Bei bereits vorbeschriebenem pathologischem Austausch der AS (s. Tabelle 3) (PS1), einer erhöhten Prävalenz bei

Betroffenen im Vergleich zu Kontrollen (PS4) und der Lokalisierung in der U-Box-Domäne (PM1) kann c.728C>T als Klasse 5-Variante nach ACMG eingestuft werden.

H. sapiens	PDYLCGKISFELMREPCITPSGITYDRKDIE	ENSP00000219548
P. troglodytes	PDYLCGKISFELMREPCITPSGITYDRKDIE	ENSPTRP00000012898
M. mulatta	PDYLCGKISFELMREPCITPSGITYDRKDIE	ENSMMUP00000043126
M. musculus	PDYLCGKISFELMREPCITPSGITYDRKDIE	ENSMUSP00000040431
R. norvegicus	PDYLCGKISFELMREPCITPSGITYDRKDIE	ENSRNOP00000026921
F. catus	PDYLCGKISFELMREPCITPSGITYDRKDIE	ENSFCAP00000007706
C. lupus familiaris	PDYLCGKISFELMREPCITPSGITYDRKDIE	ENSCAFP00000036229
T. rubripes	PDYLCGKISFELMREPCITPSGITYDRKDIE	ENSTRUP00000037854
D. rerio	PDYLCGKISFELMREPCITPSGITYDRKDIE	ENSDARP00000118937
X. tropicalis	PDYLCGKISFELMREPCITPSGITYDRKDIE	ENSXETP00000062266
D. melanogaster	PDFLCGKISFEILTDPVITPSGITYERKDIE	FBpp0079617
C. elegans	PEMLCGKITLELMKEPVIVPSGITYDREEIV	T09B4.10.2

Abbildung 23: Konservierung von CHIP an der AS-Position 243 (rot umrandet). Abgebildet sind die humane Sequenz sowie orthologe Alignements. Abweichungen der Sequenz im Vergleich zu *Homo sapiens* sind blau markiert. Die zugehörigen Peptid-Nummern sind aufgelistet.

Homo sapiens (Mensch), *Pan troglodytes* (Schimpanse), *Macaca mulatta* (Rhesusaffe), *Mus musculus* (Maus), *Rattus norvegicus* (Ratte), *Felis catus* (Katze), *Canis lupus familiaris* (Hund), *Takifugu rubripes* (engl. Tiger puffer), *Danio rerio* (Zebrafisch), *Xenopus tropicalis* (Tropischer Krallenfrosch), *Drosophila melanogaster* (Fruchtfliege), *Caenorhabditis elegans* (Fadenwurm). Inhalte entstammen aus der Datenbank www.ensembl.org. (Cunningham et al., 2022) Die Bezeichnungen der Lebewesen nach der taxonomischen Klassifikation sind unter www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy zu finden. (NLM, 2022)

3.3.2.4.1 Patientenbericht

Der Patient 977.1 stellte sich im Alter von 62 J. zur neurologischen Untersuchung und Diagnostik aufgrund einer Ataxie vor. Aus dem Einsendungsbogen für die humangenetische Diagnostik geht hervor, dass der Patient von einer langsam progredienten cerebellären Symptomatik betroffen ist. Weitere Unterlagen liegen nicht vor.

3.3.2.5 Exon 7

c.788_789delGT	p.Val264Glyfs*4	MutationTaster: 1	Provean: -5,846
		disease causing	deleterious

In Exon 7 fand sich bei der Probe 551.1 eine bereits beschriebene heterozygote Deletion von zwei Basen (Lieto et al., 2020). Die zweite und dritte Base in Exon 7, Guanin und Thymin, sind auf einem Allel nicht vorhanden. Die Deletion ist an Position c.788-789 lokalisiert (c.788_789delGT; Bezeichnung äquivalent zu von Lieto et al. beschriebener Variante c.791_792delTG). Durch die Deletion kommt es zu einer Verschiebung des Leserahmens (*Frameshift*). Dieses führt zu einer veränderten Aminosäuresequenz. Die

erste AS Arginin bleibt gleich, da die nächsten zwei Basen nach der Deletion ebenfalls Guanin und Thymin sind. Verändert sind die folgenden AS zu Glycin, Serin, Phenylalanin. Das folgende Triplet TGA codiert für ein Stoppcodon. An dieser Stelle kommt es zu einem verfrühten Abbruch der Translation. Dies führt zu einem verkürzten Protein mit einer Länge von 266 AS anstelle der üblichen 303 AS. Die Bezeichnung für diese Variante lautet p.Val264Glyfs*4. Die Deletion liegt im Bereich der U-Box-Domäne. Eine Berechnung ergibt eine Allelhäufigkeit von $\text{delGT} = 0,0063$ für das Gesamtkollektiv und $\text{delGT} = 0,0079$ für das Ataxie-Kollektiv.

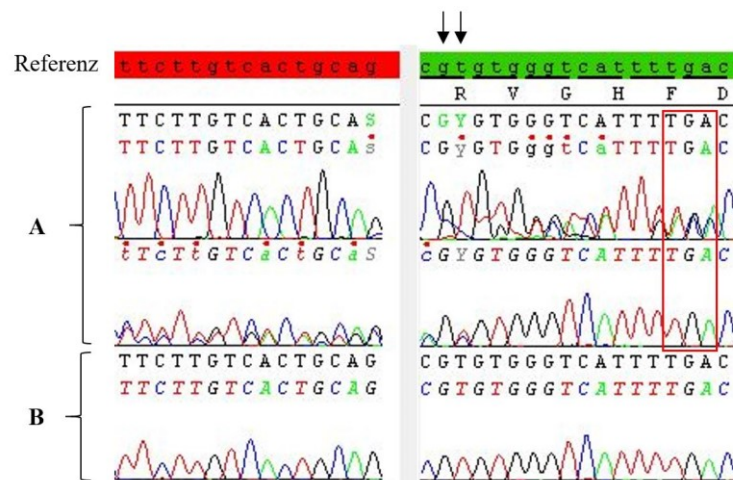


Abbildung 24: Ausschnitt der Intron 6 und Exon 7 Sequenz des *STUB1*-Gens, Darstellung der Elektropherogramme. Roter Sequenzbereich: Intron 6, grüner Sequenzbereich: Exon 7.

A und B: Probe 551.1, Sequenzvariante c.788_789delGT heterozygot, oben Primer 7F, unten Primer 7R
 B: Probe 642.1, Wildtyp homozygot. Rot umrandet ist das Stoppcodon TGA infolge des *Frameshifts*.

MutationTaster trifft die Aussage, dass diese Variante mit einer Wahrscheinlichkeit von 1 pathogen (*disease causing*) ist. Provean berechnet einen Score von -5,846 mit der Folgerung einer Schädlichkeit (*deleterious*) bei einem *Cut-Off*-Wert von -2,5. Nach ACMG erfolgt eine Einteilung als Klasse 5-Variante, da eine *Frameshift*-Mutation vorliegt (PVS1), welche eine wichtige funktionelle Domäne betrifft (PM1) und die Proteinlänge verkürzt (PM4).

3.3.2.5.1 Patientenbericht

Die Patientin 551.1 stellte sich im Alter von 61 J. in einer neurologischen Klinik zur weiteren Diagnostik einer progredienten Gangataxie vor. Ein aufgrund angegebener Schluckbeschwerden durchgeführter Schluckakt-Test blieb unauffällig. Im MRT zeigte sich eine ausgeprägte cerebelläre Atrophie. Eine erhobene Familienanamnese ergibt, dass der Vater und der jüngere Bruder der Patientin ebenfalls an einer Bewegungsstörung erkrankt sind.

Im Alter von 71 J. ist die Patientin zeitlich und räumlich orientiert. Auffällig ist eine kognitive Verlangsamung. Sie ist körperlich stark eingeschränkt und sitzt im Rollstuhl. In der Kommunikation mit medizinischem Personal zeigt sich die Patientin sehr schwankend in ihrer Stimmung und ihren Aussagen. Eventuell ist dies ein Hinweis auf Wesensveränderungen im Rahmen der Symptomatik.

3.3.2.5.2 Stammbaum Pat. 551.1

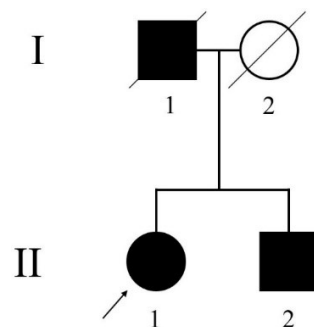


Abbildung 25: Stammbaum der Familie der Patientin 551.1. Kreise kennzeichnen weibliche und Quadrate männliche Personen. Die Index-Patientin ist mit einem Pfeil markiert. Phänotypisch betroffene Personen sind mit einem schwarzen Symbol markiert. Verstorbene Familienmitglieder sind mit durchgestrichenen Symbolen dargestellt.

3.4 Varianten im Demenz-Kollektiv

3.4.1 Variante vermutlich ohne klinische Relevanz

3.4.1.1 3'UTR

Im 3'UTR fand sich eine vorbeschriebene Variante mit der Kennung rs201960394 bei der Probe AD49. An dieser Stelle befindet sich ein heterozygoter Basenaustausch von Guanin zu Adenin (c.912+351G>A). Für die Gesamtpopulation wird eine Allelhäufigkeit von $A = 0,0004$ (111/248048, GnomAD_exome) angegeben. Die berechnete Allelhäufigkeit beträgt $A = 0,0294$ im Demenz- und $A = 0,0063$ im Gesamtkollektiv. Bisher ist die Variante nicht bei ClinVar eingetragen (s. 2.2.9.3).

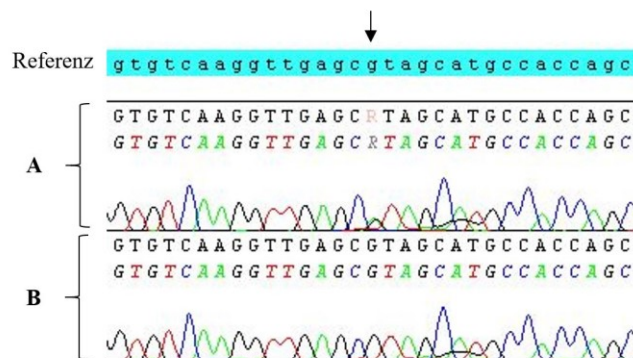


Abbildung 26: Ausschnitt der 3'UTR Sequenz des *STUB1*-Gens, Darstellung der Elektropherogramme. A: Probe AD49, Sequenzvariante c.912+351G>A heterozygot, B: Probe AD50, Wildtyp homozygot

3.4.2 Variante mit klinischer Relevanz

Im Demenz-Kollektiv wurde eine Variante mit vermutlich klinischer Relevanz identifiziert. Diese wurde ebenfalls wie die anderen Varianten (s. 3.3.2) mit einem neuen PCR-Produkt bestätigt.

3.4.2.1 Intron 3

c.524+1G>A	p.?	MutationTaster: 1 <i>disease causing</i>
----------------------	-----	---

An der ersten Base in Intron 3 zeigte sich eine heterozygote Transition von Guanin zu Adenin (c.524+1G>A) bei dem Index-Patienten AD23. Die Variante wurde ebenfalls bei seiner Mutter (AD24) nachgewiesen. Die Variante c.524+1G>A ist bereits als rs1457745122 vorbeschrieben, wurde jedoch erst kürzlich mit einem Krankheitsbild in Verbindung gebracht (Magri et al., 2022). Der Austausch liegt nicht im proteincodierenden Bereich, aber in der konservierten Sequenz der Spleiß-Grenze (Spleiß-Donor). Die Häufigkeit des Allels in der Gesamtbevölkerung wird mit $A = 0,000004$ (1/244920, GnomAD_exome) angegeben. Die berechnete Allelhäufigkeit beträgt $A = 0,0063$ im Gesamt- und $A = 0,0294$ im Demenz-Kollektiv.

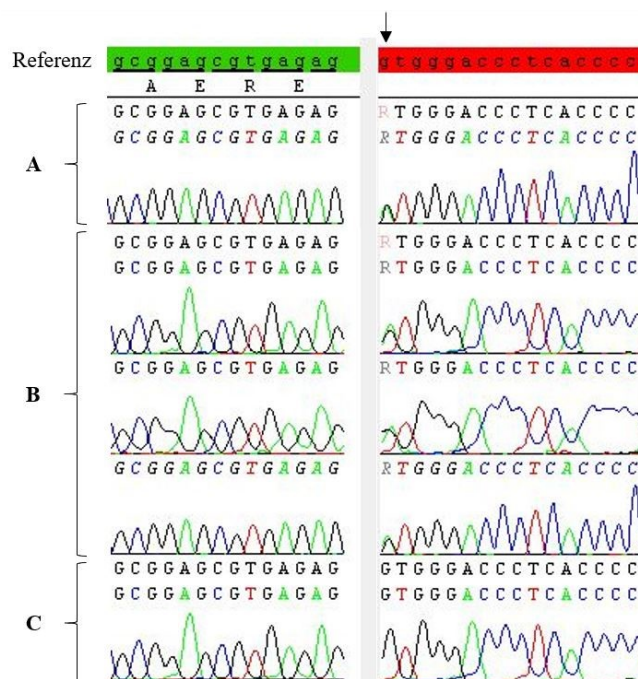


Abbildung 27: Ausschnitt der Exon 3 und Intron 3 Sequenz des *STUB1*-Gens, Darstellung der Elektropherogramme des Index-Patienten und der ebenfalls betroffenen Mutter. Grüner Sequenzbereich: Exon 3, roter Sequenzbereich: Intron 3.

A: Probe AD24, Sequenzvariante c.524+1G>A heterozygot,

B: Probe AD23, Sequenzvariante c.524+1G>A heterozygot, C: Probe AD50, Wildtyp homozygot

Die Prognose des MutationTasters sagt eine Pathogenität (*disease causing*) dieser Variante mit einer Wahrscheinlichkeit von 1 voraus. NetGene2 (s. 2.2.9.3) ist ein Tool, welches Vorhersagen über das Spleißen trifft und zur Analyse der Variante c.524+1G>A eingesetzt wurde. Bei einem Vergleich der vorhergesagten Spleiß-Donoren und -Akzeptoren des Wildtyps und der Variante c.524+1G>A besteht ein einziger Unterschied. Ein Spleiß-Donor an der Position 1195 (entspricht exakt der Position des Basenaustausches, gezählt wurden hier die Basen ab Beginn des Exons 1 *non coding*) wird für den Wildtyp vorhergesagt, aber nicht für die Variante. Es handelt sich um den Spleiß-Donor am Übergang von Exon 3 zu Intron 3. Laut des Vergleichs der Vorhersagen des Wildtyps und der Variante von NetGene2 entfällt folglich der Spleiß-Donor bei der Variante. Nach der Identifizierung der Variante waren drei mögliche Auswirkungen auf den Proteinaufbau denkbar (s. Abbildung 28). Der Spleiß-Donor von Intron 2 könnte genutzt und Exon 2 an Exon 4 gepleißt werden, es käme zu einem Verlust von Exon 3 („*Exon-Skipping*“) und einem *Frameshift* mit verfrühtem Stoppcodon in Exon 6 sowie sehr wahrscheinlich zu einem Verlust der U-Box-Domäne. Zweitens könnte es zu einer Aktivierung kryptischer Spleißstellen kommen. Drittens könnte das Intron 3 im prozessierten Transkript

verbleiben, wobei kein Stoppcodon, sondern 63 zusätzliche translatierte AS entstünden. Nach Abschluss dieser Arbeit folgten weitere experimentelle Analysen dieser Variante in der Arbeitsgruppe (s. 4.2.3).

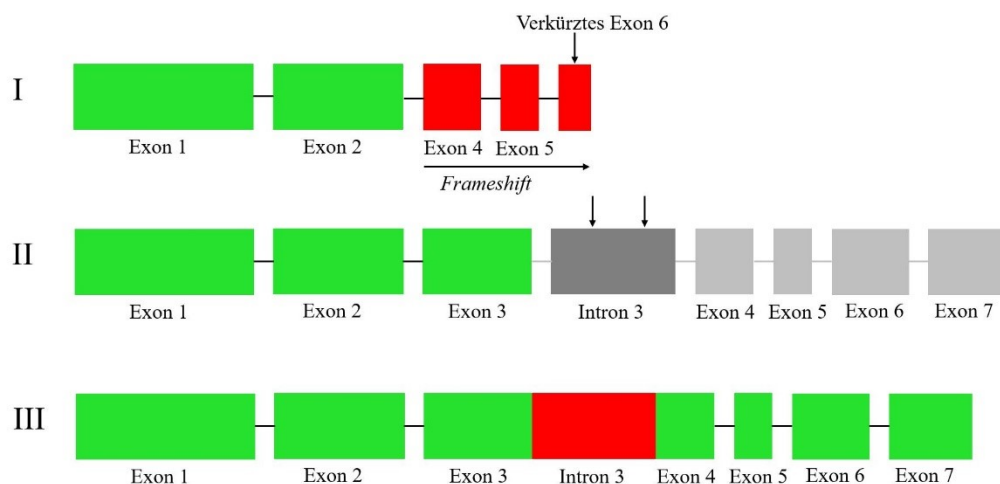


Abbildung 28: Darstellung des Aufbaus möglicher pathologischer Proteinvarianten des Index-Patienten AD23 infolge der Nukleotidsequenzänderung c.524+1G>A im *STUB1*-Gen.

I: Möglichkeit des *Skippings* von Exon 3. Ab Exon 4 kommt es zu einer Verschiebung des Leserahmens (*Frameshift*) mit einem folgenden Stoppcodon in Exon 6. In rot markiert ist der Abschnitt der veränderten entstehenden AS bis zum verfrühten Abbruch der Translation.

II: Möglichkeit der Aktivierung kryptischer Spleißstellen in Intron 3, diese sind durch Pfeile dargestellt. Die folgenden Exone 4-7 sind aufgrund der unbekanntenen Auswirkungen auf den Leserahmen in grau markiert.

III: Möglichkeit der Insertion von Intron 3, der zusätzliche Abschnitt ist in rot markiert (p.Arg175_Glu176ins63).

Nach ACMG ist die Variante c.524+1G>A als Klasse 5-Variante einzustufen, da die Mutation im Bereich der hochkonservierten Spleiß-Region auftritt und zu einem Verlust der Spleiß-Seite führt (PVS1), die eingeschränkte Spleiß-Funktion experimentell bestätigt werden konnte (PS3) (Reis et al., 2022) und mehrere rechnerische Belege für eine schädliche Wirkung sprechen (PP3).

3.4.2.1.1 Patientenbericht

Der Index-Patient und Sohn (AD23) der Patientin AD24 entwickelte mit 34 J. erste neurologische Symptome, darunter Wortfindungsstörungen und eine verminderte Frustrationstoleranz. Im Alter von 37 J. erfolgte eine erste neurologische Vorstellung. Aufgrund eines progredienten und schnellen Verlustes kognitiver Leistung wurde der Patient mit 38 J. frühberentet. In der klinischen Untersuchung zeigten sich eine Verminderung der Aufnahme- und Arbeitsgedächtniskapazität, eine ideomotorische Apraxie und eine psychomotorische Verlangsamung. Eine MRT-Untersuchung wies eine milde cerebelläre Atrophie nach. PET-Untersuchungen, eine Single-Photon-

Emissions-Tomographie-(SPECT-)Untersuchung der Dopamintransporter und eine Liquoruntersuchung blieben unauffällig. Im Rahmen einer molekularen Alzheimer-Diagnostik wurde in *PSEN1* eine vorbeschriebene Variante mit der Kennung rs17125721 gefunden, welche als nicht pathologisch bewertet wurde. Eine Mutation in mit frontotemporaler Lobärdegeneration (FTLD) assoziierten Genen sowie eine Chorea-Neuroakanthozytose, oder Chorea Huntington konnten ausgeschlossen werden. Mit 44 J. zog der Patient aufgrund schwerer Einschränkungen in ein Pflegeheim. Heute (2022), im Alter von 51 J., ist der Patient vollständig pflegebedürftig, zeigt eine Aphasie, enthemmtes Verhalten und generalisierte Spastik.

Die Mutter (AD24) des Index-Patienten wies in ihren frühen Vierzigern Gedächtnis- und Verhaltensprobleme auf. Sie lebte seit ihrem 45. Lebensjahr in einem Pflegeheim. Berichtet wurden eine schnell fortschreitende Demenz, progrediente Wesensveränderung sowie aggressive Wutausbrüche. Den Angehörigen wurde eine Alzheimer-Erkrankung als möglicher Grund für die Symptomatik genannt. Sie zeigte im Verlauf eine Spastik in allen vier Extremitäten. Eine Bettlägerigkeit bestand bereits vor dem 50. Lebensjahr. Die genetische Testung auf familiäre Alzheimer-Loci, die mit einem frühen Erkrankungsbeginn assoziiert sind (*PSEN1*, *PSEN2* und *APP*), ergab keinen pathologischen Befund. Mit 79 J. verstarb die Patientin.

3.4.2.1.2 Stammbaum Pat. AD23

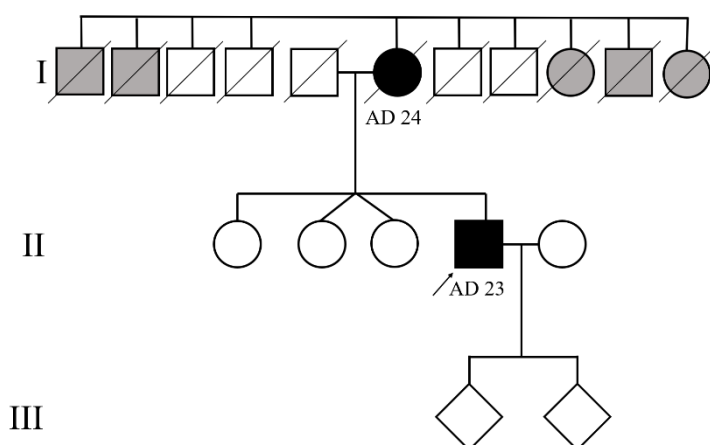


Abbildung 29: Stammbaum der Familie des Index-Patienten AD23. Kreise kennzeichnen weibliche und Quadrate männliche Personen. Der Index-Patient ist mit einem Pfeil markiert. Von der Mutation betroffene Personen sind mit einem schwarzen Symbol markiert. Die phänotypisch betroffenen Geschwister der Patientin AD24 wurden molekulargenetisch nicht getestet und sind grau markiert. Verstorbene Familienmitglieder sind mit durchgestrichenen Symbolen dargestellt.

Bei dem Patienten AD23 wurde wie bei seiner Mutter die Variante c.524+1G>A nachgewiesen. Weitere Familienmitglieder standen für eine genetische Untersuchung nicht zur Verfügung. Die älteste Schwester des Index-Patienten zeigt seit ihren späten Vierzigern Persönlichkeitsveränderungen. Fünf von neun Geschwister der Patientin AD24 wiesen ein nicht näher beschriebenes demenzielles Syndrom auf. Bis heute (Stand: Juni 2022) sind die beiden 27- und 23-jährigen Kinder des Index-Patienten (Generation III) gesund. Eine prädiktive Testung wird aktuell abgelehnt.

3.5 Untersuchung der Repeat-Expansionen im *TBP*-Gen (SCA17-Locus)

Um bei den Patientenproben AD23 und AD24 bei stark ausgeprägter kognitiver Symptomatik eine SCA17-Genese auszuschließen, erfolgte zusätzlich eine Fragmentlängenanalyse im *TBP*-Gen. Beide Proben zeigten Repeat-Expansionen im Bereich der reduzierten Penetranz. Alle weiteren DNA-Proben mit wahrscheinlich pathogenen *STUB1*-Varianten (Ataxie-Kollektiv) wurden nochmals auf Repeat-Expansionen am SCA17-Locus getestet. Es zeigte sich bei den SCA-Proben ausnahmslos eine physiologische Repeatanzahl, die den Allelgrößen der ursprünglich angeforderten SCA17-Diagnostik entsprach (s. Tabelle 21).

3.6 Überblick über die klinisch relevanten Varianten und deren Vorhersagen

In Tabelle 21 sind die identifizierten Varianten mit klinischer Relevanz sowie die zugehörigen Ergebnisse der *in silico* Vorhersageprogramme und der ACMG-Klassifizierung aufgelistet.

Tabelle 21: Überblick über identifizierte Varianten im *STUB1*-Gen mit vermutlich klinischer Relevanz

Variante	c.146A>G	c.283A>G	c.433A>C	c.524+1G>A	c.728C>T	c.788_789delGT
AS-Position	p.Tyr49Cys	p.Lys95Glu	p.Lys145Gln	p.?	p.Pro243Leu	p.Val264Glyfs*4
Lokalisation	Exon 1	Exon 2	Exon 3	Intron 3	Exon 6	Exon 7
rs-Nummer	rs757849639	-	rs146251364	rs1457745122	rs751656037	-
Häufigkeit global	G = 0,000040 (5/125568, TOPMED)	unbekannt	C = 0,0006 (148/249012, GnomAD_exome)	A = 0,000004 (1/244920, GnomAD_exome)	T = 0,000004 (1/250246, GnomAD_exome)	unbekannt
Häufigkeit Gesamtkollektiv/ Teilkollektiv	G = 0,0063 G = 0,0079	G = 0,0063 G = 0,0079	C = 0,0063 C = 0,0079	A = 0,0063 A = 0,0294 [†]	T = 0,0063 T = 0,0079	delGT = 0,0063 delGT = 0,0079
ACMG-Klasse	4	4	4	5	5	5
<u>MutationTaster</u>						
Aussage	<i>disease</i>	<i>disease</i>	<i>disease causing</i>	<i>disease causing</i>	<i>disease causing</i>	<i>disease causing</i>
Wahrscheinlichkeit	<i>causing</i> 0,9999	<i>causing</i> 0,9999	0,9999	1	0,9999	1
<u>PolyPhen-2</u>						
Aussage	<i>probably</i> <i>damaging</i>	<i>probably</i> <i>damaging</i>	<i>benign</i>	-	<i>probably damaging</i> 1,000	-
Score	1,000	1,000	0,445	-	-	-
<u>Provean</u>						
Aussage	<i>deleterious</i>	<i>deleterious</i>	<i>neutral</i>	-	<i>deleterious</i>	<i>deleterious</i>
Score	-7,252	-3,860	-2,340	-	-9,203	-5,846
SCA17-Locus (Repeat- Expansionen)	39/39	38/38	38/36	43/41 (AD23) 43/37 (AD24)	38/38	38/38

[†]: gibt die Häufigkeit der Variante im Demenz-Kollektiv an, die anderen Häufigkeiten beziehen sich auf das untersuchte Ataxie-Kollektiv

Zusammenfassend wurden sechs Varianten in *STUB1* mit klinischer Relevanz in einem Gesamt-Patientenkollektiv von 80 Proben identifiziert. Alle bis auf eine putativ pathogene Variante sind in den proteincodierenden Abschnitten lokalisiert. Eine von sechs der klinisch bedeutsamen Varianten wird in dieser Arbeit erstmals aufgeführt, da sie bisher nicht in Datenbanken zu finden ist. Die Vorhersagen der *in silico* Programme zeigen übereinstimmende Ergebnisse in ihrer Aussage einer wahrscheinlichen Pathogenität der Varianten. Eine Ausnahme ist die Variante c.433A>C (p.Lys145Gln), hier trifft nur eines der drei genutzten Programme eine pathogene Aussage, diese Variante wurde jedoch bereits bei weiteren Patienten in compound-heterozygoter oder heterozygoter Form nachgewiesen (Depondt et al., 2014; Magri et al., 2022).

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurden 80 ausgewählte Patientenproben auf pathogene Veränderungen im *STUB1*-Gen untersucht. Es wurden 63 Patienten mit einer klinisch gesicherten, aber genetisch bisher nicht zugeordneten Ataxie, sowie 17 Patienten mit einer Demenz und einer vermuteten Bewegungsstörung in das Kollektiv eingeschlossen. Pathogene Varianten in *STUB1* gelten als ursächlich für die autosomal-dominant vererbte SCA48 (Genis et al., 2018).

Ziel der hier vorliegenden Arbeit ist es, Mutationen in *STUB1* in den oben genannten Kollektiven nachzuweisen und somit die Diagnose einer SCA48 stellen zu können. Der Nachweis neuer Varianten in *STUB1* kann für eine bessere Beschreibung des mit SCA48 assoziierten Krankheitsbildes genutzt werden. Wie weiter unten diskutiert, erweitern neue pathogene Varianten das Verständnis für den zugrundeliegenden Pathomechanismus.

4.1 Häufigkeit der SCA48

Bei den spinocerebellären Ataxien handelt es sich um seltene Erkrankungen mit einer weltweiten geschätzten Prävalenz von 1-5:100.000 (Bird, 1998 updated 2019; Ruano et al., 2014). Von den bekannten Ataxie-Loci sind insbesondere SCA-Typen, die einem Repeat-Expansionsmechanismus unterliegen, häufig. Im Gegensatz werden SCA-Typen, bei denen Punktmutationen vorliegen, prozentual seltener nachgewiesen. (Hacke, 2016; Soong und Morrison, 2018) Jedoch scheint SCA48 eine Ausnahme darzustellen. Im hier untersuchten Ataxie-Kollektiv konnten fünf wahrscheinlich pathogene Varianten nachgewiesen werden. Das entspricht einer Prävalenz von 7,9 %. Dieser Befund wird durch aktuelle Veröffentlichungen zur Häufigkeit der SCA48 bestätigt. In einer Studie mit 235 an cerebellärer Ataxie erkrankten Patienten wurde eine SCA48-Frequenz von 3,4 % nachgewiesen, 218 der Fälle wurden als sporadisch eingeordnet. Begrenzt man die Anzahl der Patienten auf solche mit einer gesicherten familiären Belastung und einen autosomal-dominanten Erbgang (17 Patienten), so ergibt sich eine Frequenz von 23,5 % für SCA48. (Lieto et al., 2020) Eine weitere Studie mit 440 Ataxie-Patienten, die größtenteils eine dominante Vererbung aufwiesen, identifizierte 28 SCA48-Patienten. Dies ergibt eine Häufigkeit von ca. 6,4 %. (Roux et al., 2020) In einem weiteren Kollektiv aus 292 Patienten mit ungeklärter cerebellärer Ataxie ließen sich 14 Fälle auf heterozygote *STUB1*-Mutationen zurückführen, das entspricht einer Häufigkeit von 4,8 % (Magri et al., 2022). Die in dieser Arbeit

ermittelte Häufigkeit von 7,9 % für SCA48 im Ataxie-Kollektiv ist gering höher als in den weiteren beschriebenen Ataxie-Kollektiven mit 3,4 %, 4,8 % und 6,4 % und bestätigt somit die bisherige Literatur. Die Daten in dieser Arbeit belegen, dass SCA48 unter den SCA-Subtypen mit zugrunde liegenden Punktmutationen häufig nachgewiesen wird und daher im Bereich der SCA-Diagnostik einen wichtigen Stellenwert einnimmt.

4.2 Genetik der SCA48

Zu Beginn dieser Arbeit waren nur wenige Angaben über SCA48 auslösende pathogene Varianten von *STUB1* in der Literatur beschrieben. Aufgrund aktueller Veröffentlichungen sind inzwischen mehr Varianten in *STUB1* bekannt, welche in Tabelle 3 dargestellt sind. Es handelt sich hauptsächlich um *Missense*-Mutationen, welche zu einer veränderten AS im Protein führen. Außerdem wurden Punktmutationen an den konservierten Spleißgrenzen, und in Form von *Nonsense*-Mutationen mit verfrühtem Stoppcodon beschrieben. Ebenfalls wurden Mutationen in Form von kleinen Deletionen oder einer Duplikation von Basen, welche teils ebenfalls zu einem frühzeitigen Stoppcodon führen, genannt.

4.2.1 Identifizierte *STUB1*-Varianten im Ataxie- und Demenz-Kollektiv

Das Ataxie-Kollektiv umfasste 63 DNA-Proben von Index-Patienten. Insgesamt wurden in diesem 10 *STUB1*-Varianten nachgewiesen. Im Demenz-Kollektiv wurden 17 DNA-Proben von Index-Patienten untersucht, es konnten zwei Varianten identifiziert werden.

4.2.1.1 Varianten ohne klinische Signifikanz im Ataxie- und Demenz-Kollektiv

Im Ataxie-Kollektiv wurden fünf vorbekannte Varianten identifiziert, die als gutartig oder wahrscheinlich gutartig eingestuft wurden. Bei diesen handelt es sich um c.1-165C>T, c.425-68T>G, c.425-22C>T, c.612+53G>A und c.786+8delC. Die vorbekannte Variante c.912+351G>A aus dem Demenz-Kollektiv wurde als wahrscheinlich gutartig bewertet.

4.2.1.2 Identifizierung von Varianten mit vermutlich klinischer Relevanz im Ataxie-Kollektiv

Innerhalb des Ataxie-Kollektivs konnten in fünf Proben wahrscheinlich pathogene Varianten nachgewiesen werden. Es handelt sich um die heterozygoten Varianten c.146A>G (p.Tyr49Cys), c.283A>G (p.Lys95Glu), c.433A>C (p.Lys145Gln), c.728C>T (p.Pro243Leu) und c.788_789delGT (p.Val264Glyfs*4) (s. 3.3.2). Zum

Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit war die Variante c.283A>G unbekannt. Die Variante c.433A>C war bereits bei Patienten mit SCAR16 in compound-heterozygoter Form beschrieben (Depondt et al., 2014) und wurde während des Verfassens dieser Arbeit zusätzlich mit SCA48 assoziiert (Magri et al., 2022). Auch c.728C>T war zunächst zusammen mit einer weiteren Variante als Ursache für SCAR16 beschrieben (Hayer et al., 2017) und wurde später ebenfalls bei SCA48-Patienten nachgewiesen (Roux et al., 2020). Eine SCA48-Familie wies c.788_789delGT (c.791_792delTG) auf (Lieto et al., 2020). Die Variante c.146A>G war zu Beginn der Arbeit ohne weitere Angabe von klinischen Korrelaten mit seltener Frequenz in Datenbanken annotiert. Kürzlich wurde diese Variante mit SCA48 in Verbindung gebracht (Roux et al., 2020). Für eine Beurteilung der möglichen Pathogenität wurden bereits im Ergebnisteil verschiedene Aspekte dargestellt (s. 3.3.2). Dazu zählt die Allelhäufigkeit von bereits in Datenbanken vorbeschriebenen Varianten und die evolutionäre Konservierung. Eine für das Protein funktionell wichtige Domäne bzw. AS-Position ist tendenziell hoch konserviert. Dies kann ein Maß dafür sein, wie bedeutsam AS-Reste in Proteinen sind. (Choi et al., 2012) In der ACMG-Klassifizierung wird daher der Austausch konservierter AS berücksichtigt. Weiterhin wurden verschiedene *in silico* Vorhersageprogramme genutzt, welche eine Prognose der Pathogenität erlauben, auch diese fließen in die Beurteilung nach ACMG ein. Diese Klassifizierung der Varianten und die verfügbaren Daten der Allelhäufigkeit, Konservierung und Vorhersageprogramme deuten auf eine Pathogenität der in dieser Arbeit identifizierten *STUB1*-Varianten hin.

Die beiden N-terminalen Varianten c.146A>G (p.Tyr49Cys) und c.283A>G (p.Lys95Glu) sind in der TPR-Domäne lokalisiert. In der geladenen Haarnadel-Region befindet sich c.433A>C (p.Lys145Gln). C-terminal liegen die beiden Varianten c.728C>T (p.Pro243Leu) und c.788_789delGT (p.Val264Glyfs*4) in der U-Box.

4.2.1.2.1 Vergleichende klinische Präsentation von *STUB1*-Varianten im Ataxie-Kollektiv

Die fünf SCA-Patienten mit identifizierter pathologischer *STUB1*-Variante stellten sich vordergründig aufgrund einer ungeklärten Ataxie vor und zeigten daher das häufigste klinische Symptom der SCA48 (De Michele et al., 2020; Lieto et al., 2020; Ravel et al., 2021; Magri et al., 2022). In Bezug auf den Beginn der Symptomatik der fünf SCA-Patienten sind ein Erkrankungsbeginn mit 39 J. (c.433A>C) oder das Alter bei

neurologischer oder humangenetischer Erstvorstellung bekannt, es beträgt 41 J. (c.283A>G), 52 J. (c.146A>G), 61 J. (c.788_789delGT) und 62 J. (c.728C>T). Da bei vier Patienten nur der klinische Erstkontakt dokumentiert wurde, ist jedoch von einem früheren Erkrankungsbeginn auszugehen. In der Literatur sind zahlreiche Angaben zum Erkrankungsalter zu finden. In der Regel handelt es sich wie bei den in dieser Arbeit identifizierten Patienten um eine im adulten Alter einsetzende Symptomatik mit einer Altersvariabilität auch innerhalb von Familien. Beispielhaft sind die mittleren Erkrankungsalter $39,9 \pm 11,1$ J., $41,5 \pm 8,2$ J., $49 \pm 17,3$ J., $65,3 \pm 6,6$ J. aus verschiedenen Studien genannt. (De Michele et al., 2019; Mol et al., 2020; Lieto et al., 2020; Ravel et al., 2021) Über eine beginnende kognitive Dysfunktion wurde bei zwei Patientinnen (c.146A>G; c.788_789delGT) berichtet, bei Ersterer zeigte zudem ihre Mutter eine Demenz. Dies steht im Einklang mit einer häufig demenziell geprägten Klinik anderer SCA48-Patienten (Roux et al., 2020; Mol et al., 2020; Pakdaman et al., 2021a; Magri et al., 2022). Bei den drei restlichen SCA-Patienten ist keine kognitive Störung bekannt, da jedoch nur wenig Daten über ihren Phänotyp vorliegen, kann ein kognitiver Abbau bei diesen Patienten nicht ausgeschlossen werden. Zudem wurden Patienten beschrieben, welche erst mit zeitlicher Latenz nach Beginn der ersten Symptome kognitive Einschränkungen entwickelten (De Michele et al., 2019; Ravel et al., 2021; Mengel et al., 2021). Eine Beurteilung des weiteren Krankheitsverlaufs war bei den hier untersuchten Patienten in der Regel nicht möglich.

Die mit SCA48 assoziierte cerebelläre Atrophie konnte bei drei SCA-Patienten (c.146A>G; c.283A>G; c.788_789delGT) dargestellt werden. Für die Patienten mit den Varianten c.433A>C und c.728C>T liegen keine MRT-Daten vor. In der Literatur wird eine cerebelläre Atrophie in kranialen Aufnahmen bei allen untersuchten Patienten nachgewiesen, es wurde bisher kein klinisch manifester SCA48-Fall mit einem unauffälligen Gehirn-MRT beschrieben (De Michele et al., 2019; Chen et al., 2020; Mol et al., 2020; Lieto et al., 2020; Ravel et al., 2021; Mengel et al., 2021; Umano et al., 2022). Es ist daher zu vermuten, dass auch bei den zwei Patienten ohne durchgeführte Bildgebung eine cerebelläre Atrophie vorliegt. Kontrolluntersuchungen an diesen Patienten wären wünschenswert.

Bei einer Patientin (c.146A>G) traten zudem eine Dysdiadochokinese und Dysarthrie auf. Diese Symptome sind der cerebellären Degeneration zuzuordnen und insbesondere die Dysarthrie wurde bei vielen weiteren Patienten beschrieben (Roux et al., 2020; Mol et al., 2020; Chen et al., 2020; Lieto et al., 2020; Pakdaman et al., 2021a; Umano et al.,

2022). Auch eine weitere Patientin (c.788_789delGT) gab Schluckbeschwerden an, bei ihr kam es zudem zu einer starken motorischen Einschränkung und einer Rollstuhlpflicht. Eine Rollstuhlpflicht ist in einzelnen Fällen bekannt (Genis et al., 2018; Chen et al., 2020; Pakdaman et al., 2021a). Eine Wesensveränderung kann bei einer der fünf SCA-Betroffenen vermutet werden, die eine Variante (c.788_789delGT) in der U-Box trägt. Bei anderen SCA48-Patienten wird selten von einer Wesensänderung berichtet (Chen et al., 2020), jedoch bestehen wie bei dieser SCA-Patientin Hinweise in Form von beispielsweise Verhaltensstörungen (Genis et al., 2018; Mol et al., 2020; Magri et al., 2022). Die Stammbäume von zwei Patientinnen (c.146A>G; c.788_789delGT) zeigen ein autosomal-dominantes Vererbungsmuster auf. Bei den weiteren drei Patienten lagen keine Informationen zur Familienanamnese vor, es ist von einer sporadischen Vererbung auszugehen. Eine leere Familienanamnese kann neben dem Auftreten einer de novo Mutation verschiedene Gründe haben, beispielsweise eine unvollständig erfasste Anamnese, einen frühen Tod, einen späten Erkrankungsbeginn oder eine verminderte Penetranz bei einem Elternteil (Bird, 1998 updated 2019).

Die beiden nachgewiesenen Varianten c.146A>G und c.728C>T wurden zuvor bereits bei anderen SCA48-Patienten beschrieben. Es zeigt sich ein ähnliches klinisches Erscheinungsbild bei allen Patienten mit den genannten Varianten. (Roux et al., 2020; Ravel et al., 2021; Magri et al., 2022; Radziwonik et al., 2022) Patienten mit der Variante c.146A>G weisen ein vergleichbares Erkrankungsalter wie die Patientin in dieser Arbeit auf und zeigen neben einer Ataxie oft eine Dysarthrie, kognitive Dysfunktion und Verhaltensstörung (Roux et al., 2020; Ravel et al., 2021; Radziwonik et al., 2022). Für weitere Patienten mit der Variante c.728C>T ist auffällig, dass das Manifestationsalter ca. 20 J. vor der klinischen Erstvorstellung des in dieser Arbeit beschriebenen Patienten liegt. Bis auf die cerebelläre Symptomatik liegen keine weiteren Daten zu dem Patienten aus dem Ataxie-Kollektiv vor, die weiteren Variantenträger zeigen u. a. neben der Ataxie eine Dysarthrie, Chorea, Dystonie sowie Augenbewegungsstörungen, jedoch nicht immer ein kognitives Defizit. (Roux et al., 2020; Magri et al., 2022)

4.2.1.3 Variante mit vermutlich klinischer Relevanz im Demenz-Kollektiv, Klinik

Die pathogene Variante c.524+1G>A (p.?) konnte bei einer Patientin des Demenz-Kollektivs (AD24) nachgewiesen werden. Die Variante segregiert in der Familie mit

dem klinischen Krankheitsbild, da sie ebenfalls beim Sohn der Patientin (AD23), dem Index-Patienten der Familie, nachgewiesen wurde (s. 3.4.2). Sie ist im Bereich der geladenen Haarnadel-Domäne von CHIP lokalisiert. Zu Beginn dieser Arbeit war kein Zusammenhang zwischen der Variante und einer Ataxie oder Demenz bekannt, während der Fertigstellung publizierten Magri et al. einen Ataxie-Patienten mit dieser heterozygoten Variante (Magri et al., 2022). Die beiden Patienten AD23 und AD24 zeigen einen mit dem von Magri et al. beschriebenen Patienten vereinbaren Phänotyp, alle drei Patienten sind schwer betroffen. Der Patient von Magri et al. wies mit 56 J. eine schwere cerebelläre Ataxie (SARA-Score 40) auf. Zudem wurde ein kognitiver Abbau beschrieben. (Magri et al., 2022) Bei dem Patienten AD23 zeigt sich der stark ausgeprägte Phänotyp (s. 3.4.2.1.1) durch einen im Vergleich zu anderen SCA48-Fällen früh einzuordnenden Erkrankungsbeginn mit 34 J. (Genis et al., 2018; De Michele et al., 2019; Palvadeau et al., 2020; Lieto et al., 2020; De Michele et al., 2020) und einen rasch progredienten Krankheitsverlauf vor allem der kognitiven Beeinträchtigung mit vollständiger Pflegebedürftigkeit bereits im Alter von 44 J. Auch seine Mutter zeigte eine ausgeprägte demenzielle Symptomatik, die zu einer frühen Heimunterbringung führte. Hervorzuheben ist, dass die Symptomatik der AD-Familie klinisch über Jahrzehnte einer Demenz zugeordnet wurde und die motorische Störung aufgrund des schweren Phänotyps nicht als richtungsweisend für die Diagnostik hervortrat. Psychiatrische Symptome, welche häufig bei SCA48-Patienten vorkommen (Lieto et al., 2020; De Michele et al., 2020), sind ebenfalls in dieser Familie zu finden: eine psychomotorische Verlangsamung, verminderte Frustrationstoleranz, Enthemmung, Wesensveränderung und Wutausbrüche. Dies stimmt mit anderen SCA48-Beschreibungen überein, es wurde mehrfach von ähnlichen Verhaltensstörungen berichtet (Chen et al., 2020; Mol et al., 2020; Roux et al., 2020; Ravel et al., 2021).

AD23, AD24 und der von Magri et al. beschriebene Patient wiesen neben derselben Variante in *STUB1* ebenfalls intermediäre Repeat-Expansionen im *TBP*-Gen auf (Magri et al., 2022; Reis et al., 2022). Das Auftreten der zwei moderaten *TBP*-Repeat-Expansionen bei dem stärker betroffenen Sohn AD23 im Vergleich zur heterozygoten Variante bei der Mutter lässt einen Einfluss vermuten. Der Pathomechanismus der Spleiß-Variante c.524+1G>A auf *STUB1*-Transkripte könnte im Zusammenspiel mit einer moderaten *TBP*-Expansion die Wesensveränderungen von AD23 erklären. (Reis et al., 2022) Ein Patient mit einer anderen Splice-Donor-Variante in *STUB1* (c.358+2T>C)

zeigte Parallelen zu AD23. Er war ebenfalls von einem frühen Erkrankungsbeginn (30 J.) betroffen, zeigte kognitive sowie Verhaltensstörungen, entwickelte eine Demenz und einen spastischen Gang bis zu einem Versterben mit 58 J. (Roux et al., 2020)

4.2.2 Lokalisation und funktionelle Relevanz der Varianten im Ataxie-Kollektiv

Die fünf in dieser Arbeit identifizierten Varianten befinden sich in der TPR-Domäne (p.Tyr49Cys; p.Lys95Glu), in der helikalen Haarnadel-Region (p.Lys145Gln) und in der C-terminalen U-Box-Domäne (p.Pro243Leu; p.Val264Glyfs*4) von CHIP.

4.2.2.1 Varianten in der TPR-Domäne

Der Einfluss der am meisten proximal gelegenen Varianten p.Tyr49Cys und p.Lys95Glu wurde bis heute funktionell nicht untersucht, jedoch sind in der TPR-Domäne weitere Varianten in räumlicher Nähe bekannt, welche Hinweise auf einen möglichen Pathomechanismus geben können. Denkbar ist, dass Mutationen in der TPR-Domäne im Sinne eines Funktionsverlusts zu einer gestörten Protein-Protein-Bindung führen könnten, oder ein toxischer Funktionsgewinn auftreten könnte. Ein TPR-Motiv umfasst 34 AS, die AS an den Positionen 4, 7, 8, 11, 20, 24, 27 und 32 sind konserviert, wobei die AS 8, 20 und 27 Schlüsselfunktionen einnehmen (Zeytuni und Zarivach, 2012). Die Variante p.Tyr49Cys ist an der Position 24 des ersten TPR-Motivs von CHIP lokalisiert, dies deutet auf eine hohe Bedeutung der betroffenen AS für die Funktion der Proteindomäne hin. An der Position 27 im TPR-Motiv befindet sich das hoch konservierte Alanin, dieses ist bei der bekannten SCA48-Variante p.Ala52Gly betroffen. Es konnte gezeigt werden, dass der Austausch von Alanin durch Glycin die E3-Ligase-Aktivität nicht beeinträchtigt, jedoch die Interaktion mit Chaperonen durch eine erniedrigte Affinität von CHIP stört und somit die Chaperon-vermittelte Ubiquitinierung des Substrats beeinträchtigt. (Umano et al., 2022) Diese Störung der CHIP-Funktion könnte ebenfalls bei der Variante p.Tyr49Cys auftreten, da sie nur drei AS entfernt in derselben helikalen Struktur lokalisiert und ebenfalls konserviert ist (UniProt Consortium, 2021). Die AS an den Positionen 49 und 52 sind außerdem innerhalb der Helix auf derselben Seite lokalisiert (Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2022). Dies lässt ein enges Zusammenspiel der AS innerhalb der funktionellen Domäne und somit eine Beteiligung an der Chaperon-Bindung vermuten. Anhand der SCA48-Variante p.Arg51_Ile53delinsProAla konnte eine gestörte *in vitro* Ubiquitinierung des Substrats Hsc70 demonstriert werden, jedoch war die Selbstubiquitinierung intakt (Pakdaman et al., 2021a). Eine weitere Variante in der TPR-Domäne (p.Asn65Ser) wies

in vitro ebenfalls eine stark erniedrigte Chaperonbindung sowie eine verminderte Bildung von Ubiquitin-Ketten auf. Dies deutet darauf hin, dass die Chaperonbindung an die TPR-Domäne funktionell wichtig ist, um die E3-Ligase von CHIP zu aktivieren, welche Ubiquitin-Ketten formt. (Kanack et al., 2018) Die Daten weisen auf einen Mechanismus hin, bei welchem im Falle einer Mutation in der TPR-Domäne die E3-Ligase-Aktivität von CHIP grundsätzlich erhalten bleibt, jedoch die Interaktion mit Chaperonen mittels der TPR-Domäne beeinträchtigt und somit die Ubiquitinierung Chaperon-vermittelter Substrate gestört ist. Dieser Mechanismus könnte bei den in der TPR-Domäne identifizierten Varianten p.Tyr49Cys und p.Lys95Glu auftreten. Die Untersuchung weiterer Varianten in dieser Domäne ist nötig, um den Mechanismus zu sichern. Wenn von einer fehlerhaften Funktion von CHIP im Sinne einer *Loss-of-function*-Mutation (Schmidt, 2017) durch einen Verlust der TPR-Domänen-Funktion ausgegangen wird, könnte dies zu fehlerhaften bzw. falsch gefalteten Substraten führen, die ihre physiologische Funktion nicht mehr ausführen können. Alternativ können sich fehlgefaltete Proteine in der Zelle ansammeln und so zu einer toxischen Funktion führen. Letzteres ist ein bekannter Pathomechanismus neurodegenerativer Erkrankungen (Winklhofer et al., 2008). Es existieren Hinweise darauf, dass ein Verlust der CHIP-Expression zu einer erhöhten Akkumulation pathologischer Proteine führt (Williams et al., 2009; Shi et al., 2014). Umamo et al. diskutieren einen *Gain-of-function*, da die Variante p.Ala52Gly die Lebensfähigkeit der Zelle nach Einfluss bestimmter Stressoren reduzierte. (Umamo et al., 2022) Ein toxischer Funktionsgewinn könnte auch bei der Variante p.Arg51_Ile53delinsProAla entstehen. Sie wies *in vitro* im Vergleich zum Wildtyp strukturell starke Unterschiede in Form von Konformationsänderungen auf und bildete vermutlich mehr Proteinaggregate. (Pakdaman et al., 2021a)

4.2.2.2 Variante in der helikalen Haarnadel-Domäne

In den durchgeführten *in silico* Analysen der Variante p.Lys145Gln sagte nur eines der drei genutzten Programmen eine Pathogenität voraus (s. 3.3.2.3). Diese Vorhersageprogramme sind kritisch zu hinterfragen, da sie keine vollständige Verlässlichkeit aufzeigen. Zum Beispiel zeigten Duarri et al., dass eine bereits funktionell als pathogen bewiesene SCA13-Variante *in silico* als benigne prognostiziert wurde (Duarri et al., 2015).

Experimentelle Analysen der Variante p.Lys145Gln zeigen, dass diese *in vitro* in einer

Untersuchung nicht die Ubiquitinierungsaktivität von CHIP beeinflusst (Pakdaman et al., 2017), jedoch in einer weiteren Untersuchung zu einer verminderten Ubiquitinierung von Hsp70 *in vitro* führt (Kanack et al., 2018). Beide Arbeitsgruppen konnten strukturelle Veränderungen bei p.Lys145Gln-CHIP nachweisen. Es kam zu einer geringeren thermischen Stabilität der dimeren Strukturen sowie einem erniedrigten Schmelzpunkt. Außerdem wurden *in vitro* ein Verlust von Sekundärstrukturen durch einen geringeren Anteil an α -Helices und eine reduzierte proteolytische Stabilität beobachtet. In Zellkultur wurde eine reduzierte Stabilität von CHIP beobachtet. (Pakdaman et al., 2017; Kanack et al., 2018)

Eine weitere SCA48-Variante (p.Lys143_Trp147del) mit einer fünf AS-großen Deletion, welche die in dieser Arbeit identifizierte Variante p.Lys145Gln mit einschließt, wurde *in vitro* untersucht. Eine Selbstubiquitinierung war möglich, jedoch zeigte sich eine gestörte Ubiquitinierung des Substrats Hsc70. Strukturelle Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp zeigten sich in einem Verlust von Sekundär- und veränderten Tertiärstrukturen. Vermutlich bildete die Variante mehr Proteinaggregate. Eine Dimerisierung von CHIP war möglich, jedoch reduzierter im Vergleich zum Wildtyp. (Pakdaman et al., 2021a) Dies zeigt, dass die Variante vermutlich Auswirkungen auf die in der Haarnadel-Region lokalisierte Dimerisierungsdomäne zur Bildung des Homodimers hat. Hierbei ist keine AS betroffen, die für die Dimerisierung essenziell ist (Zhang et al., 2005), da noch eine reduzierte Aktivität vorhanden ist. Auch bei dieser Variante könnte ein toxischer Funktionsgewinn aufgrund der Konformationsänderungen bestehen. (Pakdaman et al., 2021a) Es ist denkbar, dass die Variante p.Lys145Gln ähnlich wie p.Lys143_Trp147del eine veränderte Aktivität der Ubiquitinierungs- und Dimerisierungsfunktion aufweisen könnte. Weitergehende Untersuchungen sind nötig, um diesen Aspekt zu untersuchen.

4.2.2.3 Varianten in der U-Box

Die U-Box von CHIP umfasst die AS 226 bis 300 (UniProt Consortium, 2021). In dieser Domäne lokalisierte Varianten könnten zu einem Funktionsverlust der E3-Ligase-Aktivität führen. Frühe Untersuchungen des Proteins CHIP haben bereits gezeigt, dass diese Funktion von der U-Box abhängig ist, da das CHIP-Protein mit Verlust der U-Box *in vitro* keine E3-Ligase Aktivität besaß (Jiang et al., 2001). Die Variante p.Val264Glyfs*4 wurde bisher nicht funktionell untersucht. Sie führt zu einem *Frameshift* und einer veränderten Aminosäuresequenz mit verfrühtem Stoppcodon,

dieses resultiert in einem verkürzten Protein mit einer Länge von 266 AS anstelle von 303 AS. Es liegt nahe, dass die carboxyterminale Trunkierung der U-Box zu einem nicht funktionsfähigen Protein bzw. einer Beeinträchtigung der Ubiquitin-E3-Ligase führen könnte. Der Mechanismus eines *Nonsense-mediated-mRNA-decay*, welcher durch ein frühzeitiges Stoppcodon modifizierte mRNA abbaut und somit die toxische Wirkung des entstehenden Proteins vermindern soll, wird bei dieser Variante aufgrund der Lokalisation im letzten Exon von *STUB1* nicht greifen (Lee et al., 2021). Es ist anzunehmen, dass das trunkierte Protein der in dieser Arbeit beschriebenen Patientin in der Zelle verbleibt, aber eine eingeschränkte oder keine E3-Ligase-Aktivität aufweist. Weiterhin wurde bereits die SCA48-Variante p.Gly249Val in räumlicher Nähe zu p.Pro243Leu untersucht. Sie zeigte *in vitro* eine beeinträchtigte Aktivität der Ubiquitinierung des Substrats Hsc70 und eine reduzierte CHIP-Selbstubiquitinierung. Zudem konnte eine verminderte Dimerisierung und vermutlich eine Bildung von Proteinaggregaten festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass die Dimerisierungsstelle in der U-Box durch p.Gly249Val abgeschaltet wurde. (Pakdaman et al., 2021a) Aufgrund der Nähe könnte p.Pro243Leu ebenfalls Auswirkungen auf die Dimerisierungsfähigkeit haben, hier sind weitere Untersuchungen erforderlich. Die sich ergebenden strukturellen Veränderungen des p.Gly249Val-Proteins könnten zu einem toxischen Funktionsgewinn führen (Pakdaman et al., 2021a). Ein weiterer Aspekt der durch Mutationen in der U-Box bedingten fehlerhaften E3-Ligase-Aktivität könnte die gestörte Rekrutierung von E2-Enzymen sein. Darauf deuten Ergebnisse von Varianten (p.Ser236Thr; p.Met240Thr; p.Thr246Met) hin, bei welchen es *in vitro* vermutlich durch eine gehemmte Interaktion mit E2 zu einer Verhinderung der Ubiquitin-Kettenbildung durch CHIP kam. (Kanack et al., 2018) Dieser Mechanismus könnte ebenfalls bei der Variante p.Pro243Leu auftreten, welche sich in räumlicher Nähe zu den drei beschriebenen Varianten befindet.

4.2.3 Lokalisation und funktionelle Relevanz der Variante im Demenz-Kollektiv

In einer Familie mit ausgeprägten kognitiven Einschränkungen konnte die Variante c.524+1G>A (p.?) nachgewiesen werden. Da der Basenaustausch im konservierten Bereich des Spleiß-Donors von Intron 3 liegt, ist für das Verständnis der Pathologie dieser Variante zu klären, welche Auswirkung dies auf molekularer Ebene hat. In auf dieser Arbeit aufbauenden weiteren Versuchen unserer Forschungsgruppe wurde das Spleiß-Verhalten der Variante c.524+1G>A experimentell untersucht. Zum einen

wurden die gebildeten *STUB1*-Transkripte der Patienten untersucht, zum anderen wurde die Spleißstellen-Variante c.524+1G>A als generiertes Minigen-Konstrukt in Zellkultur analysiert. In beiden Versuchsansätzen konnte eine Retention von Intron 3 nachgewiesen werden, welche zu einer Insertion von 63 AS innerhalb des Leserahmens führte (p.Arg175_Glu176ins63). In geringerem Ausmaß kam es zusätzlich zur Aktivierung kryptischer Spleißstellen im Intron 3. Der experimentell nachgewiesene Spleiß-Donor c.524+86 wurde *in silico* nicht vorhergesagt und hatte eine Verschiebung des Leserahmens mit trunziertem Protein zur Folge (p.Arg175fs*93). Sehr selten wurde der zweite kryptische Spleiß-Donor c.524+99 verwendet, welcher vorhergesagt wurde und zu einer Insertion von 33 AS innerhalb des Leserahmens führte (p.Arg175_Glu176ins33). Ein *Skipping* des Exons 3 konnte ausgeschlossen werden. Nach ACMG erfolgt die Klassifizierung der Spleißstellen-Mutation an +1 in die Klasse 5, diese Zuordnung wird durch die beschriebene experimentelle Untersuchung bestätigt. Die Folge der gestörten nachgewiesenen Spleiß-Aktivität ist einerseits eine Unterbrechung der für die Dimerisierung bedeutsamen geladenen Domäne von CHIP durch die Retention des Introns 3 und Aktivierung des sehr seltenen Spleiß-Donors c.524+99, wodurch es zum Verlust der Domäne kommen könnte. Denkbar ist zudem, dass die Insertion zusätzlicher AS im Leserahmen zu einem Funktionsgewinn führen könnte, was in dieser Form bisher für CHIP nicht beschrieben wurde. Andererseits kann nur die Verwendung des kryptischen Spleiß-Donors c.524+86 zu einem trunzierten Protein und zum Abbau aberranter RNA durch *Nonsense-mediated-decay* führen, dies könnte mit der Aufhebung der Ubiquitin-Ligase-Aktivität einhergehen. (Reis et al., 2022)

4.2.3.1 Digene Einflüsse bei SCA48

Kürzlich wurde von einer Arbeitsgruppe ein möglicher digenischer Hintergrund einer SCA durch Varianten im *TBP*-Gen, welches mit SCA17 assoziiert ist, und pathogenen *STUB1*-Varianten vorgestellt. Hierbei wurde die Verstärkung von *TBP*-Repeat-Expansionen im Bereich reduzierter Penetranz durch *STUB1*-Varianten postuliert (SCA17-DI). (Magri et al., 2022) Bei den Patienten im hier untersuchten Ataxie-Kollektiv war SCA17 zuvor ausgeschlossen worden, eine erneute Überprüfung bestätigte *TBP*-Repeatlängen im physiologischen Bereich. Jedoch zeigten die Proben AD23 und AD24 aus dem Demenz-Kollektiv *TBP*-Repeat-Expansionen im Bereich der reduzierten Penetranz. In Verbindung mit der Variante c.524+1G>A wurde bei AD24

im *TBP*-Gen ein intermediäres Allel mit 43 CAG/CAA-Repeats nachgewiesen. AD23 wies zwei intermediäre Repeat-Expansionen von 41/43 auf (s. Tabelle 21).

Bis heute ist der Mechanismus einer digenischen Vererbung durch *STUB1* und *TBP* nicht geklärt. Eine physiologische, oder pathophysiologische Wechselwirkung der beiden Genprodukte kann nicht ausgeschlossen werden. Jedoch gibt es keinen eindeutigen Hinweis für den Einfluss von *TBP* auf die Entwicklung einer SCA48, wie von Magri et al. postuliert wurde. Die aktuellen Daten unserer und anderer Arbeitsgruppen widerlegen diese These (Barbier et al., 2022). Beispielsweise demonstriert die Untersuchung der fünf Patienten mit pathogenen SCA48-Varianten in dieser Arbeit das Vorkommen pathogener *STUB1*-Varianten in Verbindung mit normwertigen Repeat-Expansionen in *TBP*. Unter diesen fünf *STUB1*-Varianten befinden sich p.Lys145Gln und p.Pro243Leu, die jedoch im Patienten-Kollektiv von Magri et al. zusammen mit intermediären *TBP*-Expansionen auftraten (Magri et al., 2022). Eine französische Arbeitsgruppe konnte kürzlich ebenfalls zeigen, dass nicht alle Patienten mit pathogenen *STUB1*-Varianten in jedem Fall expandierte *TBP*-Allele aufweisen, wie auch Patienten mit intermediärer *TBP*-Expansion nicht zwingend pathogene *STUB1*-Varianten tragen (Barbier et al., 2022). Dennoch ist eine überproportionale Häufung von *STUB1*-Varianten in Kombination mit moderat expandierten *TBP*-Allelen zu beobachten (Roux et al., 2020; Magri et al., 2022; Reis et al., 2022; Barbier et al., 2022). Ein Zusammentreffen der Befunde kann dadurch begründet sein, dass sich intermediäre *TBP*-Allele bei ca. 1-2 % der Allgemeinbevölkerung finden (Gardiner et al., 2019; Mongelli et al., 2020). Somit könnte ein intermediäres *TBP*-Allel gleichzeitig bei SCA48-Patienten zu finden sein, welche selbst ohne ein moderat expandiertes *TBP*-Allel eine klinische SCA48-Symptomatik manifestieren würden. Es lässt sich derzeit nur spekulieren, inwiefern das beeinträchtigte Protein CHIP einen Einfluss auf die moderat expandierten Polyglutaminbereiche von *TBP* hat.

4.2.4 Bedeutung des Vererbungsmodus bei *STUB1*-Varianten

Nach aktuellem Stand der Forschung ist noch unklar, aus welchem Grund sich gewisse Mutationen im *STUB1*-Gen autosomal-dominant und andere -rezessiv auswirken. Die Tatsache, dass sowohl dominant als auch rezessiv vererbte Mutationen in demselben Gen zu einer Ataxie führen können, ist nicht neu und wurde bereits beobachtet. Dazu zählen beispielsweise die Gene *ATPase family gene 3-like 2 (AFG3L2)*, *Metabotroper*

Glutamatrezeptor 1 (GRM1) und *Beta-III-Spectrin (SPTBN2)* (De Michele et al., 2020; OMIM, 2022).

Einige pathogene *STUB1*-Varianten wurden inzwischen sowohl für die SCAR16, wie auch für die SCA48 als ursächlich beschrieben (vgl. Tabelle 3, Tabelle 22). Grundsätzliche Unterschiede im Typ (Punktmutationen, kleine Deletionen, Spleißstellen-Mutationen) und der Lokalisation im *STUB1*-Gen liegen zwischen SCAR16 und SCA48 nicht vor. Pathogene SCA48- und SCAR16-Varianten wiesen in der U-Box *in vitro* eine ähnliche funktionelle Beeinträchtigung auf. Die SCAR16-Variante p.Thr246Met zeigte ähnliche Effekte wie die SCA48-Variante p.Gly249Val: sehr wenig Dimere, mehr Aggregate und eine gestörte Ubiquitinierungsaktivität. (Pakdaman et al., 2017; Pakdaman et al., 2021a) Die Pathogenität heterozygoter SCA48-Varianten könnte sich durch eine Haploinsuffizienz erklären lassen, bei der das Wildtyp-Allel nicht genügend funktionierendes CHIP-Protein produziert, um eine ausreichende Aktivität zu gewährleisten (McLaughlin et al., 2012; De Michele et al., 2020). Außerdem ist ein dominant-negativer Effekt plausibel (Pakdaman et al., 2021a). Der Vergleich des klinischen Erscheinungsbildes von SCAR16 und SCA48 zeigt, dass SCAR16 in einem früheren Alter auftritt und das Erkrankungsbild häufig, jedoch nicht in allen Fällen, komplexer ist (Shi et al., 2013; Shi et al., 2014; Heimdal et al., 2014; Hayer et al., 2017; Roux et al., 2020; De Michele et al., 2020; Pakdaman et al., 2021a). Nach einer Ataxie tritt die kognitive Dysfunktion bei beiden Erkrankungen als zweithäufigstes Symptom auf (De Michele et al., 2020). Der höhere Schweregrad der SCAR16 kann darin begründet sein, dass kein einziges funktionierendes *STUB1*-Allel bei der rezessiven Form mehr erhalten ist (Pakdaman et al., 2021a). In Tiermodellen konnte demonstriert werden, dass *STUB1*^{-/-} Tiere phänotypisch wesentlich stärker betroffen waren (Min et al., 2008; Shi et al., 2014) als heterozygote *STUB1*^{+/-} Tiere (McLaughlin et al., 2012). Weitere funktionelle Untersuchungen von fehlgestaltetem CHIP sind nötig, um die Pathophysiologie weiter zu ergründen.

4.2.5 Neuropathologie

Im Gehirn, insbesondere im Cerebellum, konnte über durchgeführte RT-PCR-Experimente eine starke Expression von *STUB1* nachgewiesen werden (s. 3.2). Weiterhin konnte der Nachweis einer Expression in der Skelettmuskulatur und schwächer in der Haut und in Leukozyten erbracht werden. Diese Daten bestätigen die bisherige Literatur. *STUB1* wird in einer Vielzahl von Geweben exprimiert, die höchste

mediane Expression findet sich in den Kleinhirnhemisphären, gefolgt vom frontalen Cortex. (The GTEx Consortium, 2020; UCSC Genome Browser, 2019 updated 2020; Lee et al., 2022) Diese Daten belegen, dass das Genprodukt von *STUB1* eine wichtige Funktion in den untersuchten Gewebetypen ausübt. Die physiologisch hohe Expression von CHIP im Gehirn bzw. Cerebellum deutet auf eine Schlüsselfunktion von CHIP bei der Entstehung von Bewegungsstörungen hin. Um zu untersuchen, wie *STUB1*-Mutationen die Neuropathologie beeinflussen, wurden bereits Autopsien verstorbener SCA48-Patienten neuropathologisch analysiert. Es handelte sich um Patienten mit *STUB1*-Mutationen in der korrespondierenden TPR-Domäne oder U-Box. Die Gewebeproben zeigten eine starke Atrophie des Cerebellums und einen damit verbundenen Verlust der Purkinjezellen. In den Purkinjezellen konnte in einer Studie eine veränderte Lokalisation von CHIP festgestellt werden. Bei einem Teil der Autopsieproben konnte eine neuronale Degeneration in weiteren Gehirnarealen erfasst werden, welche auf einen diffusen Schaden des Gehirns hinweisen könnte. (Chen et al., 2020; Mol et al., 2020; Roux et al., 2020) Zusammenfassend scheint ein durch *STUB1*-Mutationen verändertes CHIP in den Arealen, in welchen es physiologisch hoch exprimiert wird, zu einem Neuronenschaden zu führen. Weshalb der Zellschaden vor allem im Cerebellum entsteht und andere Organe weniger durch modifiziertes CHIP betroffen sind, ist derzeit ungeklärt. Möglicherweise können kompensatorische Mechanismen im Cerebellum weniger genutzt werden, um die fehlerhafte Funktion von CHIP zu ersetzen (Morishima et al., 2008; Depondt et al., 2014). Die physiologisch neuroprotektive Wirkung von CHIP, indem es die Neurodegeneration unterdrückt (Miller et al., 2005), könnte durch *STUB1*-Mutationen bedingt vermindert sein. Ein Verlust dieser Funktion könnte zu einer SCA48-Pathogenese beitragen.

4.2.6 Tiermodelle

Die in humanen Autopsien erhobenen Befunde (s. 4.2.5) können ähnlich im Tiermodell beobachtet werden. In einem *C. elegans*-Modell führte die in der TPR-Domäne lokalisierte Variante p.Ala52Gly zu einer Neurodegeneration (Umano et al., 2022). CHIP^{-/-} defiziente Mäuse wiesen eine neuronale Degeneration im Cerebellum, vor allem in der Schicht der Purkinjezellen, auf (Shi et al., 2014).

Um die Wirkung von humanen Varianten in der U-Box-Domäne zu verstehen, kann folgendes Tiermodell hinweisend sein. Zebrafische (*Danio rerio*), deren *stub1*-Gen eine hohe Übereinstimmung mit der humanen *STUB1*-Sequenz aufweist, wurden in Hinblick

auf die homozygote Variante p.Thr255Valfs*3 untersucht. Die hierdurch verursachte Trunkierung von CHIP führte zu einer gestörten Ubiquitinierung des Substrates Hsc70 (Pakdaman et al., 2021b). Der trunkierte Bereich der in dieser Arbeit identifizierten Variante p.Val264Glyfs*4 überschneidet sich mit der Trunkierung durch p.Thr255Valfs*3. Daher liegt die Vermutung nahe, dass auch p.Val264Glyfs*4 mit einem Verlust der E3-Ligase-Aktivität einhergehen könnte.

4.2.7 Relevanz von CHIP-Substraten

Da CHIP im Rahmen seiner Funktion in der Proteinfaltung und im Proteinabbau mit diversen Substraten interagiert, stellt sich die Frage, ob diese im Falle einer gestörten CHIP-Funktion einen Einfluss auf die Pathogenese der SCA48 ausüben können. Beispiele für Substrate sind der Tumorsuppressor p53 (Esser et al., 2005), Proteine der Basen-Exzisionsreparatur (BER) (Parsons et al., 2008), α -Synuclein (Shin et al., 2005), phosphoryliertes Tau (Shimura et al., 2004), LRRK2 (Ko et al., 2009), Parkin (Imai et al., 2002), Huntingtin (Jana et al., 2005) und Ataxin-1 (Al-Ramahi et al., 2006). Teilweise sind die Substrate mit neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert. Da CHIP die Substrataggregation verhindern (Miller et al., 2005) und Substrat-Oligomerisierung reduzieren kann (Tetzlaff et al., 2008) ist es denkbar, dass es bei CHIP-Defizienz zu einer Akkumulation der Substrate kommen könnte. Beispielsweise wurden bei CHIP-defizienten Mäusen Mikroaggregate von Ataxin-3 im Gehirn nachgewiesen (Williams et al., 2009). Relevant könnte zudem ein verminderter Abbau des CHIP-Substrates p53 sein, da CHIP eine wichtige Beteiligung an dem Bestehen von niedrigen Leveln an p53 unter physiologischen Bedingungen hat (Esser et al., 2005). Zudem könnte eine durch p.His260Gln-CHIP *in vitro* beobachtete aufgehobene Ubiquitinierung der Substrate der BER zu einer Erhöhung der Mutagenese und genetischen Instabilität führen (Parsons et al., 2008). Ebenfalls ist ein Einfluss auf die Pathogenese durch Parkin möglich, welches durch CHIP positiv in seiner Ubiquitin-Ligase-Aktivität reguliert wird, um den Pael-Rezeptor zu ubiquitinieren. *In vitro* wurde diese CHIP-Funktion durch *Missense*-Varianten in der U-Box und eine Variante mit fehlender U-Box aufgehoben. Da eine Akkumulation des Pael-Rezeptors in dopaminergen Neuronen zu einer Neurodegeneration führt, lässt sich nur spekulieren, ob der Pael-Rezeptor im Rahmen der SCA48 zu einer Neurodegeneration führen könnte. (Imai et al., 2002) Gegen eine Beteiligung der CHIP-Substrate am Pathomechanismus spricht, dass diese beispielsweise im Falle einer U-Box-Mutation durch andere nicht U-Box-vermittelte

Mechanismen abgebaut werden könnten. So konnte in einem *D. rerio*-Tiermodell gezeigt werden, dass trotz einer Trunkierung der U-Box keine signifikanten Veränderungen der Proteinspiegel verschiedener CHIP-Substrate festgestellt wurden. Dabei könnte die noch intakte TPR-Domäne von CHIP zu einer Vermittlung des Abbaus führen. (Pakdaman et al., 2021b) Der Abbau von α -Synuclein durch CHIP konnte entweder durch die TPR-Domäne oder die U-Box vermittelt werden, beide Mechanismen funktionierten unabhängig von der anderen funktionellen Domäne (Shin et al., 2005). In diesem Beispiel könnte das Substrat trotz Mutation in einer funktionellen CHIP-Domäne vermutlich noch durch Vermittlung der anderen intakten Domäne abgebaut werden.

4.3 Molekulargenetische Testung auf SCA48

Bis heute wurden 49 spinocerebelläre Ataxie-Loci beschrieben, deren Unterscheidung bis auf wenige Ausnahmen klinisch nicht möglich ist. Die Testung der SCA-Loci erfolgt nach einem Konzept, welches sich an den Prävalenzen der SCA-Subtypen orientiert. Zunächst wird eine Testung auf Repeat-Expansionen durchgeführt. Nach deren Ausschluss werden in der Regel die verbleibenden, bekannten Ataxie-Loci über eine Panel-Diagnostik abgedeckt. Da SCA48 als Alleinstellungsmerkmal mit Demenz und bzw. oder Wesensveränderungen assoziiert ist, kann bei Vorliegen eines entsprechenden Krankheitsbildes über eine Einzelgen-Diagnostik nach Ausschluss der Repeat-Expansionen nachgedacht werden. Dieses Vorgehen wird durch Daten von Ravel et al. gestützt, die einen kognitiven Abbau bei acht von neun SCA48-Patienten beschrieben (Ravel et al., 2021). Auch bei identifizierten SCA48-Patienten aus dem Kollektiv in dieser Arbeit bestehen Hinweise auf eine Wesensveränderung oder ein kognitives Defizit. Des Weiteren traten in einer Studie mit SCA48-Index-Patienten häufig Bewegungsstörungen wie Dystonie und Chorea auf. Es wird empfohlen, eine differentialdiagnostische Testung auf SCA48 bei Huntington-ähnlichen Erkrankungen durchzuführen. (Lieto et al., 2020; De Michele et al., 2020) Diese Symptome treten neben Chorea Huntington ebenfalls bei SCA17 auf, deren Locus bereits in der ersten Stufe des Screenings untersucht wird. Im Hinblick auf eine mögliche digenische Vererbung sollte das *TBP*-Gen auf intermediäre Allele untersucht werden (Magri et al., 2022; Reis et al., 2022).

Wie in dieser Arbeit durch den Nachweis einer pathogenen *STUB1*-Variante in dem Alzheimer-Kollektiv gezeigt werden konnte, ist es sinnvoll, auch bei einer

vordergründig kognitiven Erkrankung in Verbindung mit einer Bewegungsstörung unklarer Genese eine Testung durchzuführen (Reis et al., 2022). Jedoch scheint eine rein demenzielle Erkrankung ohne Ataxie möglicherweise kein ausschlaggebendes Kriterium für eine Testung auf SCA48 zu sein, wie eine Studie mit 115 untersuchten Patienten mit frontotemporaler Demenz ohne pathologische Variante in *STUB1* schließen lässt (Roux et al., 2020). Hier bleibt zukünftig zu beobachten, ob Patientenkollektive mit einer anders klassifizierten Demenz vermehrt Auffälligkeiten in *STUB1* zeigen. Da bisher nur wenige Gene mit familiärer, früh beginnender Demenz assoziiert sind, ist es dennoch mutmaßlich sinnvoll, *STUB1* in ein Panel bei diesen Patienten mit aufzunehmen.

4.4 Ausblick

Wie an dieser Arbeit und an zahlreichen Publikationen innerhalb der letzten Jahre zu erkennen ist, ist die Prävalenz der SCA48 deutlich höher als bei anderen durch Punktmutationen verursachten SCA-Subtypen. Obwohl bereits einige CHIP-Varianten experimentell untersucht wurden, ist der Pathomechanismus derzeit ungeklärt. Jedoch bestehen, wie in der Diskussion dieser Arbeit dargestellt, bereits verschiedene Erklärungsansätze. Es braucht weitere funktionelle Untersuchungen, um die Auswirkungen der Varianten auf das veränderte CHIP-Protein und letztlich den Phänotyp der Betroffenen zu verstehen. Insbesondere die autosomal-dominante oder -rezessive Vererbung von Varianten im selben Gen ist bis heute nicht zufriedenstellend geklärt.

Derzeit besteht wie auch für andere SCA keine kurative Option. Weitere Untersuchungen zu den molekularen Mechanismen der Erkrankung sind notwendig, um in Zukunft eine Therapie etablieren zu können. Denkbar sind beispielsweise Medikamente, welche Einfluss auf den gestörten Stoffwechsel nehmen, eine spezifische Gentherapie oder eine RNA-basierte Therapie (Sullivan et al., 2019).

5 Zusammenfassung

Die autosomal-dominant vererbte spinocerebelläre Ataxie 48 (SCA48) ist ein Subtyp der SCA, der durch ein komplexes neurologisches Krankheitsbild gekennzeichnet ist, welches eine große Heterogenität aufweist. Es zeigen sich insbesondere motorische Symptome und eine kognitive Degeneration mit demenzieller Ausprägung, u. a. werden zudem psychiatrische Symptome beschrieben. Heterozygote Mutationen im *STIP1 homology and U-box containing protein 1 (STUB1)* Gen sind ursächlich für die Erkrankung. Das zugehörige Protein *carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein (CHIP)* nimmt eine entscheidende Rolle innerhalb der physiologischen Zellfunktion im Rahmen der korrekten Proteinfaltung und des Ubiquitin-vermittelten Proteinabbaus ein. Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch RT-PCR-Untersuchungen gezeigt werden, dass im Gehirn, insbesondere im Cerebellum, eine starke Expression von *STUB1* erfolgt. Es wurden 80 Patientenproben auf pathologische Varianten im *STUB1*-Gen untersucht, 63 Patienten entstammen aus einem Ataxie- und 17 aus einem Demenz-Kollektiv. Die Exone des *STUB1*-Gens wurden mittels PCR vervielfältigt und anschließend sequenziert. Sechs Varianten mit klinischer Relevanz wurden identifiziert. Dies ergibt eine SCA48-Frequenz von 7,9 % für das Ataxie-Kollektiv. Die ermittelte Prävalenz zeigt auf, dass die Erkrankung innerhalb der durch Punktmutationen bedingten SCA-Subtypen häufig auftritt. Bei den klinisch relevanten Varianten handelt es sich um c.146A>G (p.Tyr49Cys), c.283A>G (p.Lys95Glu), c.433A>C (p.Lys145Gln), c.524+1G>A (p.Arg175_Glu176ins63), c.728C>T (p.Pro243Leu) und c.788_789delGT (p.Val264Glyfs*4). Jeweils zwei der Varianten sind in der TPR-Domäne, geladenen Haarnadel-Domäne und U-Box von CHIP lokalisiert. Eine Variante (c.283A>G) wird erstmals beschrieben. Die Variante c.524+1G>A wurde während des Zusammenschreibens dieser Arbeit und der daraus resultierenden Publikation zeitgleich von einer anderen Arbeitsgruppe publiziert. Diese pathogene *STUB1*-Variante aus dem Demenz-Kollektiv betrifft den konservierten Bereich des Spleiß-Donors von Intron 3 und führt zu einer Retention von Intron 3 mit Erhalt des Leserahmens sowie in geringerem Umfang zu einer Aktivierung kryptischer Spleißstellen. Klinisch zeigen die betroffenen Familienmitglieder ein schweres Krankheitsbild mit einem ausgeprägten, die weitere Symptomatik überlagernden Demenzsyndrom. Beide Patienten weisen zudem Repeat-Expansionen im Bereich der reduzierten Penetranz im *TBP*-Gen

(SCA17) auf. Ein digener Vererbungsmodus durch pathogene Varianten in *STUB1* und *TBP* ist aktuell Gegenstand von weiteren Forschungsprojekten.

6 Summary

Autosomal dominant spinocerebellar ataxia 48 (SCA48) is a subtype of SCA. The clinical picture is characterized by a complex neurological clinical presentation that exhibits wide heterogeneity. In particular, motor symptoms and cognitive degeneration with dementia are pronounced. Among others, psychiatric symptoms have also been described. Heterozygous mutations in the *STIP1 homology and U-box containing protein 1 (STUB1)* gene are causative for the disease. The associated carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein (CHIP) has a critical role within physiological cell function in the context of proper protein folding and ubiquitin-mediated protein degradation.

In the context of this work, it was shown by RT-PCR that there is a strong expression of *STUB1* in the brain, especially in the cerebellum. 80 patient samples were analyzed for pathological variants in the *STUB1* gene, 63 patients were from an ataxia and 17 from a dementia collective. The exons of the *STUB1* gene were amplified by PCR and then sequenced. Six variants with clinical relevance have been identified. This results in a SCA48 frequency of 7.9% for the ataxia collective. The determined prevalence indicates that the disease occurs frequently within the SCA subtypes caused by point mutations. The clinically relevant variants are c.146A>G (p.Tyr49Cys), c.283A>G (p.Lys95Glu), c.433A>C (p.Lys145Gln), c.524+1G>A (p.Arg175_Glu176ins63), c.728C>T (p.Pro243Leu) and c.788_789delGT (p.Val264Glyfs*4). Two of the variants are localized in each of the TPR domain, helical hairpin domain and U-box of CHIP. One variant (c.283A>G) is described for the first time. Variant c.524+1G>A was published simultaneously by another group during the preparation of this thesis and the resulting publication. This pathogenic *STUB1* variant from the dementia collective affects the conserved region of the splice donor of intron 3 and leads to retention of intron 3 with preservation of the reading frame, and to a lesser extent to activation of cryptic splice sites. The affected family members showed a severe clinical picture with pronounced dementia symptoms predominating the other symptoms. Both patients also show repeat expansions in the area of reduced penetrance in the *TBP* gene (SCA17). A digenic mode of inheritance through *STUB1* and *TBP* is currently the subject of further research projects.

7 Abkürzungsverzeichnis

°	Grad
%	Prozent
*	Terminationscodon
±	Plusminus
-	bis; minus
>	Austausch zu; größer als
3D	dreidimensional
α	alpha
A	Adenin
ACMG	<i>American College of Medical Genetics and Genomics</i>
ADCA	autosomal-dominante cerebelläre Ataxien, engl. <i>autosomal dominant cerebellar ataxias</i>
<i>AFG3L2</i>	<i>ATPase family gene 3-like 2</i>
AOA	Ataxie mit okulomotorischer Apraxie
APP	Amyloid-Präkursorprotein
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
AVED	Ataxie mit Vitamin E-Mangel, engl. <i>Ataxia with vitamin E deficiency</i>
Bp	Basenpaare
BA	alleinstehendes Kriterium (benigne) nach ACMG
BER	Basen-Exzisionsreparatur
C	Celsius; Cytosin; Konzentration
c.	codierende DNA
CCAS	cerebellär kognitiv-affektives Syndrom, engl. <i>cerebellar cognitive affective syndrome</i>
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Cl	Chlorid
cDNA	komplementäre DNA, engl. <i>complementary DNA</i>
CHIP	<i>Carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein</i>
CTX	Zerebro-tendinöse Xanthomatose, engl. <i>Cerebrotendinous xanthomatosis</i>

dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dbSNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism Database</i>
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxycytidintriphosphat
ddGTP	Didesoxyguanosintriphosphat
ddNTP	Didesoxynucleosidtriphosphat
ddTTP	Didesoxythymidintriphosphat
del	Deletion
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DRPLA	Dentatorubrale-Pallidolysiale Atrophie
dsDNA	doppelsträngige DNA
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dup	Duplikation
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, engl. <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
Ex	Exon
FMR1	<i>Fragile X messenger ribonucleoprotein 1</i>
fs	<i>Frameshift</i>
FTLD	frontotemporale Lobärdegeneration
FXN	Frataxin
FXTAS	Fragiles-X-Tremor-Ataxie-Syndrom
G	Guanin
g	Gramm
gnomAD	<i>Genome Aggregation Database</i>
GRM1	<i>Metabotroper Glutamatrezeptor 1</i>
H ₂ O	Summenformel für Wasser
HGVS	<i>Human Genome Variation Society</i>
Hsc	<i>Heat Shock Cognate Protein</i>
Hsp	Hitzeschockprotein

ID	Identifikationsnummer
ins	Insertion
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
J.	Jahre
kDa	Kilodalton
l	Liter
LRRK2	Leucin-reiche Repeat Kinase 2
M	Molar
M.	Morbus
μ	Mikro
mA	Milliampere
MERRF	Myoklonusepilepsie mit <i>ragged-red-fibers</i>
Mg	Magnesium
μg	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid
NARP-Syndrom	Neuropathie-Ataxie-Retinopathia-pigmentosa-Syndrom
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NFTs	Neurofibrilläre Tangles, engl. <i>neurofibrillary tangles</i>
nm	Nanometer
OH-	Hydroxyl-
OD	Optische Dichte
OD260	Extinktion bei 260 nm
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
p	kurzer Arm des Chromosoms
p.	Protein

PCR	Polymerase-Kettenreaktion, engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PM	moderates Kriterium (pathogen) nach ACMG
pmol	Pikomol
PP	unterstützendes Kriterium (pathogen) nach ACMG
<i>Primer F</i>	Vorwärts-Primer, engl. <i>Primer Forward</i>
<i>Primer R</i>	Rückwärts-Primer, engl. <i>Primer Reverse</i>
PS	starkes Kriterium (pathogen) nach ACMG
PSEN1	Präsenilin-1
PSEN2	Präsenilin-2
Puffer AL	Lysepuffer
Puffer AW1	Waschpuffer 1
Puffer AW2	Waschpuffer 2
PVS1	sehr starkes Kriterium (pathogen) nach ACMG
q	langer Arm des Chromosoms
RNA	Ribonukleinsäure, engl. <i>ribonucleic acid</i>
rpm	engl. <i>rounds per minute</i>
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
S	Svedberg (Einheit Sedimentationskonstante)
s	Sekunde
SARA	<i>Scale for the Assessment and Rating of Ataxia</i>
SCA	Spinocerebelläre Ataxie
SCA48	Spinocerebelläre Ataxie 48
SCAR	autosomal-rezessive spinocerebelläre Ataxie
SPAX	spastische Ataxien, engl. <i>spastic ataxia</i>
<i>SPTBN2</i>	<i>Beta-III-Spectrin</i>
SPECT	Single-Photon-Emissions-Tomographie
<i>STUB1</i>	<i>STIP1 homology and U-box containing protein 1</i>
T	Thymin
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBP	TATA-Box-Bindeprotein
Tm	Schmelztemperatur
TOPMed	<i>Trans-Omics for Precision Medicine</i>
TPR	<i>Tetratricopeptid Repeat</i>

U	Unit
UTR	untranslatierte Region
VUS	Variante unklarer klinischer Relevanz, engl. <i>variant of uncertain significance</i>
x	fach; mal

7.1 Buchstabencode für Aminosäuren nach IUPAC

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

nach der *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC, 2000)
<https://www.bioinformatics.org/sms/iupac.html>

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Weltweite Verteilung der SCA-Subtypen aus Perlman, 1998 updated 2022.....	6
Abbildung 2: Grafik des <i>STUB1</i> -Gens, Transkript <i>STUB1</i> -201; verändert aus Cunningham et al., 2022.....	14
Abbildung 3: Schematische Darstellung von CHIP und seinen funktionellen Domänen sowie der entsprechenden Exone der proteincodierenden Sequenz von <i>STUB1</i> ; nach UniProt Consortium, 2021; Cunningham et al., 2022.....	18
Abbildung 4: Darstellung der Fragmentlängenanalyse des <i>TBP</i> -Gens.....	35
Abbildung 5: a) Gelelektrophoretische Auftrennung der Exon 4-6 PCR am <i>STUB1</i> -Gen. b) Darstellung in der inversen Ansicht.....	41
Abbildung 6: Beispielhafte Darstellung eines Elektropherogramms.....	43
Abbildung 7: a) Nachweis der Expression von <i>STUB1</i> (Exon 1-7) in verschiedenen humanen Gewebetypen b) Darstellung in der inversen Ansicht.....	51
Abbildung 8: a) Nachweis der Expression von <i>STUB1</i> (Exon 2-7) in verschiedenen humanen Gewebetypen b) Darstellung in der inversen Ansicht.....	51
Abbildung 9: Ausschnitt der 5'UTR Sequenz des <i>STUB1</i> -Gens, Darstellung der Elektropherogramme. Sequenzvariante c.1-165C>T.....	53
Abbildung 10: Ausschnitt der Intron 3 Sequenz des <i>STUB1</i> -Gens, Darstellung der Elektropherogramme. Sequenzvariante c.425-68T>G.....	54
Abbildung 11: Ausschnitt der Intron 3 Sequenz des <i>STUB1</i> -Gens, Darstellung der Elektropherogramme. Sequenzvariante c.425-22C>T.....	54
Abbildung 12: Ausschnitt der Intron 4 Sequenz des <i>STUB1</i> -Gens, Darstellung der Elektropherogramme. Sequenzvariante c.612+53G>A.....	55
Abbildung 13: Ausschnitt der Exon 6 und Intron 6 Sequenz des <i>STUB1</i> -Gens, Darstellung der Elektropherogramme. Sequenzvariante c.786+8delC....	56
Abbildung 14: Ausschnitt der Exon 1 Sequenz des <i>STUB1</i> -Gens, Darstellung der Elektropherogramme. Sequenzvariante c.146A>G.....	58
Abbildung 15: Konservierung von CHIP an der AS-Position 49.....	58
Abbildung 16: Stammbaum der Familie der Patientin 4.1.....	60
Abbildung 17: Ausschnitt der Exon 1 Sequenz des <i>STUB1</i> -Gens, Darstellung der Elektropherogramme. Nachweis der Variante c.146A>G bei Angehörigen der Index-Patientin 4.1.....	60
Abbildung 18: Ausschnitt der Exon 2 Sequenz des <i>STUB1</i> -Gens, Darstellung der Elektropherogramme. Sequenzvariante c.283A>G.....	62
Abbildung 19: Konservierung von CHIP an der AS-Position 95.....	62
Abbildung 20: Ausschnitt der Exon 3 Sequenz des <i>STUB1</i> -Gens, Darstellung der Elektropherogramme. Sequenzvariante c.433A>C.....	63
Abbildung 21: Konservierung von CHIP an der AS-Position 145.....	64

Abbildung 22: Ausschnitt der Exon 6 Sequenz des <i>STUB1</i> -Gens, Darstellung der Elektropherogramme. Sequenzvariante c.728C>T.....	65
Abbildung 23: Konservierung von CHIP an der AS-Position 243.....	66
Abbildung 24: Ausschnitt der Intron 6 und Exon 7 Sequenz des <i>STUB1</i> -Gens, Darstellung der Elektropherogramme. Sequenzvariante c.788_789delGT.....	67
Abbildung 25: Stammbaum der Familie der Patientin 551.1.....	68
Abbildung 26: Ausschnitt der 3'UTR Sequenz des <i>STUB1</i> -Gens, Darstellung der Elektropherogramme. Sequenzvariante c.912+351G>A.....	69
Abbildung 27: Ausschnitt der Exon 3 und Intron 3 Sequenz des <i>STUB1</i> -Gens, Darstellung der Elektropherogramme des Index-Patienten und der ebenfalls betroffenen Mutter. Sequenzvariante c.524+1G>A.....	70
Abbildung 28: Darstellung des Aufbaus möglicher pathologischer Proteinvarianten des Index-Patienten AD23 infolge der Nukleotidsequenzänderung c.524+1G>A im <i>STUB1</i> -Gen.....	71
Abbildung 29: Stammbaum der Familie des Index-Patienten AD23.....	72

Eine Genehmigung für die Verwendung der Abbildung 1 aus Perlman, 1998 updated 2022 wurde schriftlich am 31.10.2022 durch die University of Washington erteilt (<http://www.genereviews.org/> © 1993-2022 University of Washington).

Eine Genehmigung für die Verwendung der Abbildung 2 aus Cunningham et al., 2022 ist unter https://www.ensembl.org/info/about/legal/image_reuse.html zu finden.

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Überblick über die Genetik der spinocerebellären Ataxien	7
Tabelle 2: Klinische Symptome der SCA-Subtypen neben einer cerebellären Ataxie ...	10
Tabelle 3: Bekannte SCA48-Mutationen im <i>STUB1</i> -Gen	15
Tabelle 4: Einteilung von genetischen Varianten in fünf Klassen	17
Tabelle 5: PCR-Mastermix Zusammensetzung für die PCR von Exon 1, Exon 2-3, Exon 4-6 und Exon 7	33
Tabelle 6: Oligonukleotid-Primer für die PCR von Exon 1, Exon 2-3, Exon 4-6 und Exon 7	33
Tabelle 7: Bedingungen des Thermocyclers für die PCR von Exon 1, Exon 2-3, Exon 4-6 und Exon 7	34
Tabelle 8: PCR-Mastermix Zusammensetzung für die PCR des <i>TBP</i> -Gens	34
Tabelle 9: Bedingungen für die PCR des <i>TBP</i> -Gens	35
Tabelle 10: Gewebetypen für die Umschreibung von RNA in cDNA	36
Tabelle 11: Mix 1 für Umschreibung von RNA in cDNA	36
Tabelle 12: Mix 2 für Umschreibung von RNA in cDNA	37
Tabelle 13: Bedingungen für die Umschreibung von RNA in cDNA	37
Tabelle 14: PCR-Mix für cDNA, Exone 1-7 und 2-7	37
Tabelle 15: Primer für die PCR an cDNA, Vervielfältigung des Abschnittes der umgeschriebenen <i>STUB1</i> -Transkripte	38
Tabelle 16: Bedingungen für die PCR an cDNA, Vervielfältigung des Abschnittes des umgeschriebenen <i>STUB1</i> -Transkripts	38
Tabelle 17: PCR-Mix für cDNA, Vervielfältigung des <i>RPL19</i> -Transkripts	39
Tabelle 18: Bedingungen für PCR der cDNA, Vervielfältigung des <i>RPL19</i> - Transkripts	39
Tabelle 19: Bedingungen für die Sequenzierung am SeqStudio-Sequencer	44
Tabelle 20: Überblick über identifizierte Varianten im <i>STUB1</i> -Gen im Ataxie- Kollektiv vermutlich ohne klinische Relevanz	56
Tabelle 21: Überblick über identifizierte Varianten im <i>STUB1</i> -Gen mit vermutlich klinischer Relevanz	74
Tabelle 22: Bekannte SCAR16-Mutationen im <i>STUB1</i> -Gen, Stand: November 2022	113

10 Literatur

- Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 7(4): 248–249.
- Al-Bader MD, Al-Sarraf HA (2005). Housekeeping gene expression during fetal brain development in the rat-validation by semi-quantitative RT-PCR. *Developmental Brain Research* 156(1): 38–45.
- Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Nover L, von Koskull-Döring P (Hrsg.) (2005). *Lehrbuch der molekularen Zellbiologie*. 3. Auflage. Wiley-VCH, Weinheim.
- Al-Ramahi I, Lam YC, Chen HK, de Gouyon B, Zhang M, Pérez AM, Branco J, de Haro M, Patterson C, Zoghbi HY et al. (2006). CHIP Protects from the Neurotoxicity of Expanded and Wild-type Ataxin-1 and Promotes Their Ubiquitination and Degradation. *J Biol Chem*. 281(36): 26714–26724.
- Arnemann J (2019). DNA-/RNA-Konzentrationsbestimmung. In: Gressner AM, Arndt T (Hrsg.). *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. 3. Auflage. Springer Berlin, Heidelberg 719.
- Ashizawa T, Xia G (2016). Ataxia. *Continuum*. 4 Movement Disorders: 1208–1226.
- Bachman J. (2013). Chapter Two - Reverse-Transcription PCR (RT-PCR). In: Lorsch J. (Hrsg.). *Methods in Enzymology: Laboratory Methods in Enzymology: RNA*. Academic Press, 67–74.
- Ballinger CA, Connell P, Wu Y, Hu Z, Thompson LJ, Yin LY, Patterson C (1999). Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. *Mol Cell Biol*. 19(6): 4535–4545.
- Barbier M, Davoine CS, Petit E, Sayah S, Porche M, Guillot-Noël L, Neau JP, Deffond D, Guyant-Marechal L, Coarelli G et al. (2022). Relationships between intermediate repeat expansions of *TBP* and spinocerebellar ataxia type 48/*STUB1*: genetic modifier of pure digenic inheritance? [ESHG 2022 Poster EP10.078].
- Bettencourt C, de Yébenes JG, López-Sendón JL, Shomroni O, Zhang X, Qian SB, Bakker IMC, Heetveld S, Ros R, Quintáns B et al. (2015). Clinical and Neuropathological Features of Spastic Ataxia in a Spanish Family with Novel Compound Heterozygous Mutations in *STUB1*. *Cerebellum* 14(3): 378–381.
- Biolabs (2020). Monarch® Total RNA Miniprep Kit. NEB #T2010S, Instruction Manual. New England Biolabs, Inc. [Internet].
Abrufbar unter https://international.neb.com/products/t2010-monarch-total-rna-miniprep-kit#Protocols,%20Manuals%20&%20Usage_Manuals.
- Bird TD (1998 updated 2018). Alzheimer Disease Overview. In: Adam MP, Everman DB, Mirzaa GM et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA). University of Washington, Seattle, 1993-2022.
- Bird TD (1998 updated 2019). Hereditary Ataxia Overview. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA). University of Washington, Seattle, 1993-2022.

- Brkanac Z, Spencer D, Shendure J, Robertson PD, Matsushita M, Vu T, Bird TD, Olson MV, Raskind WH (2009). IFRD1 is a candidate gene for SMNA on chromosome 7q22-q23. *Am J Hum Genet.* 84(5): 692–697.
- Brunak S, Engelbrecht J, Knudsen S (1991). Prediction of human mRNA donor and acceptor sites from the DNA sequence. *J Mol Biol.* 220(1): 49–65.
- Buselmaier W, Haussig J (2018). *Biologie für Mediziner.* 14. Auflage. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Chen DH, Latimer C, Yagi M, Ndugga-Kabuye MK, Heigham E, Jayadev S, Meabon JS, Gomez CM, Keene CD, Cook DG et al. (2020). Heterozygous *STUB1* missense variants cause ataxia, cognitive decline, and *STUB1* mislocalization. *Neurol Genet.* 6(2): 1–13.
- Chen HY, Hsu CL, Lin HY, Lin YF, Tsai SF, Ho YJ, Li YR, Tsai JW, Teng SC, Lin CH (2021). Clinical and functional characterization of a novel *STUB1* frameshift mutation in autosomal dominant spinocerebellar ataxia type 48 (SCA48). *J Biomed Sci.* 28(1): 65.
- Chiu HH, Hsaio CT, Tsai YS, Liao YC, Lee YC, Soong BW (2020). Clinical and Genetic Characterization of Autosomal Recessive Spinocerebellar Ataxia Type 16 (SCAR16) in Taiwan. *Cerebellum* 19(4): 544–549.
- Choi S, Park SR, Jang JH, Ahn JH (2022). Spinocerebellar Ataxia 48 Patient With a Novel De Novo Variant of *STUB1*. *J Clin Neurol.* 18(6): 714–716.
- Choi Y (2012). A fast computation of pairwise sequence alignment scores between a protein and a set of single-locus variants of another protein. In *Proceedings of the ACM Conference on Bioinformatics, Computational Biology and Biomedicine.* Association for Computing Machinery (ACM) 414–417.
- Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP (2012). Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS One.* 7(10): e46688.
- Connell P, Ballinger CA, Jiang J, Wu Y, Thompson LJ, Höhfeld J, Patterson C (2001). The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nat Cell Biol.* 3(1): 93–96.
- Cordoba M, Rodriguez-Quiroga S, Gatto EM, Alurralde A, Kauffman MA (2014). Ataxia plus myoclonus in a 23-year-old patient due to *STUB1* mutations. *Neurology* 83(3): 287–288.
- Corral-Juan M, Casquero P, Giraldo-Restrepo N, Laurie S, Martinez-Piñeiro A, Mateo-Montero RC, Ispierito L, Vilas D, Tolosa E, Volpini V et al. (2022). New spinocerebellar ataxia subtype caused by *SAMD9L* mutation triggering mitochondrial dysregulation (SCA49). *Brain Commun.* 4(2): fcac030.
- Coutelier M, Coarelli G, Monin ML, Konop J, Davoine CS, Tesson C, Valter R, Anheim M, Behin A, Castelnovo G et al. (2017). A panel study on patients with dominant cerebellar ataxia highlights the frequency of channelopathies. *Brain* 140(6): 1579–1594.
- Cunningham F, Allen JE, Allen J, Alvarez-Jarreta J, Amode MR, Armean IM, Austine-Orimoloye O, Azov AG, Barnes I, Bennett R et al. (2022). Ensembl 2022. *Nucleic Acids Res.* 50(D1): D988–D995.

- Cyr DM, Höhfeld J, Patterson C (2002). Protein quality control: U-box-containing E3 ubiquitin ligases join the fold. *Trends Biochem Sci.* 27(7): 368–375.
- Da Pozzo P, Cardaioli E, Malfatti E, Gallus GN, Malandrini A, Gaudiano C, Berti G, Invernizzi F, Zeviani M, Federico A (2009). A novel mutation in the mitochondrial tRNA(Pro) gene associated with late-onset ataxia, retinitis pigmentosa, deafness, leukoencephalopathy and complex I deficiency. *Eur J Hum Genet.* 17(8): 1092–1096.
- Dai Q, Zhang C, Wu Y, McDonough H, Whaley RA, Godfrey V, Li HH, Madamanchi N, Xu W, Neckers L et al. (2003). CHIP activates HSF1 and confers protection against apoptosis and cellular stress. *EMBO J.* 22(20): 5446–5458.
- De Michele G, Galatolo D, Barghigiani M, Dello Iacovo D, Trovato R, Tessa A, Salvatore E, Filla A, De Michele G, Santorelli FM (2020). Spinocerebellar ataxia type 48: last but not least. *Neurol Sci.* 41(9): 2423–2432.
- De Michele G, Lieto M, Galatolo D, Salvatore E, Cocozza S, Barghigiani M, Tessa A, Baldacci J, Pappatà S, Filla A et al. (2019). Spinocerebellar Ataxia 48 Presenting With Ataxia Associated With Cognitive, Psychiatric, and Extrapyrmidal Features: A Report of Two Italian Families. *Parkinsonism Relat Disord.* 65: 91–96.
- den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, Hart RK, Greenblatt MS, McGowan-Jordan J, Roux AF, Smith T, Antonarakis SE, Taschner PEM (2016). HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Hum Mutat.* 37(6): 564–569.
- Depondt C, Donatello S, Simonis N, Rai M, van Heurck R, Abramowicz M, D'Hooghe M, Pandolfo M (2014). Autosomal recessive cerebellar ataxia of adult onset due to STUB1 mutations. *Neurology* 82(19): 1749–1750.
- Duarri A, Nibbeling EAR, Fokkens MR, Meijer M, Boerrigter M, Verschuuren-Bemelmans CC, Kremer BPH, van de Warrenburg BP, Dooijes D, Boddeke E et al. (2015). Functional analysis helps to define KCNC3 mutational spectrum in Dutch ataxia cases. *PLoS One.* 10(3): e0116599.
- Eisenberg E, Levanon EY (2013). Human housekeeping genes, revisited. *Trends Genet.* 29(10): 569–574.
- Storey E, Gardner RJM (2007 updated 2019). Spinocerebellar Ataxia Type 20. In: Adam MP, Everman DB, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, Amemiya A, editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA). University of Washington, Seattle, 1993-2022.
- Esser C, Scheffner M, Höhfeld J (2005). The chaperone-associated ubiquitin ligase CHIP is able to target p53 for proteasomal degradation. *J Biol Chem.* 280(29): 27443–27448.
- Farrell RE (2010). *RNA methodologies. A laboratory guide for isolation and characterization.* Elsevier/Academic Press, Amsterdam.
- Frackman S, Kobs G, Simpson D, Storts D (1998). Betaine and DMSO: Enhancing Agents for PCR. *Promega Notes* 65: 27-29.
- Gardiner SL, Boogaard MW, Trompet S, de Mutsert R, Rosendaal FR, Gussekloo J, Jukema JW, Roos RAC, Aziz NA (2019). Prevalence of Carriers of Intermediate and Pathological Polyglutamine Disease-Associated Alleles Among Large Population-Based Cohorts. *JAMA Neurol.* 76(6): 650–656.

- Gazulla J, Izquierdo-Alvarez S, Sierra-Martínez E, Marta-Moreno ME, Alvarez S (2018). Inaugural cognitive decline, late disease onset and novel STUB1 variants in SCAR16. *Neurol Sci.* 39(12): 2231–2233.
- Genis D, Ortega-Cubero S, San NH, Corral J, Gardenyes J, de Jorge L, López E, Campos B, Lorenzo E, Tonda R et al. (2018). Heterozygous *STUB1* Mutation Causes Familial Ataxia With Cognitive Affective Syndrome (SCA48). *Neurology* 91(21): e1988–1998.
- Guo YC, Lin JJ, Liao YC, Tsai PC, Lee YC, Soong BW (2014). Spinocerebellar ataxia 35: novel mutations in TGM6 with clinical and genetic characterization. *Neurology* 83(17): 1554–1561.
- Hacke, W. (Hrsg.) (2016). *Neurologie*. 14. Auflage. Springer Berlin, Heidelberg.
- Hauk A (2013). Quantifizierung von DNA durch Absorptionsmessung. *Biologie in unserer Zeit* 43(5): 278.
- Hayer SN, Deconinck T, Bender B, Smets K, Züchner S, Reich S, Schöls L, Schüle R, de Jonghe P, Baets J et al. (2017). STUB1/CHIP mutations cause Gordon Holmes syndrome as part of a widespread multisystemic neurodegeneration: evidence from four novel mutations. *Orphanet J Rare Dis.* 12(1): 31.
- Hebsgaard SM, Korning PG, Tolstrup N, Engelbrecht J, Rouzé P, Brunak S (1996). Splice site prediction in *Arabidopsis thaliana* pre-mRNA by combining local and global sequence information. *Nucleic Acids Res.* 24(17): 3439–3452.
- Heimdal K, Sanchez-Guixé M, Aukrust I, Bollerslev J, Bruland O, Jablonski GE, Erichsen AK, Gude E, Koht JA, Erdal S et al. (2014). STUB1 mutations in autosomal recessive ataxias - evidence for mutation-specific clinical heterogeneity. *Orphanet J Rare Dis.* 9: 146.
- Hershko A, Heller H, Elias S, Ciechanover A (1983). Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem.* 258(13): 8206–8214.
- Huang L, Chardon JW, Carter MT, Friend KL, Dudding TE, Schwartzentruber J, Zou R, Schofield PW, Douglas S, Bulman DE et al. (2012). Missense mutations in ITPR1 cause autosomal dominant congenital nonprogressive spinocerebellar ataxia. *Orphanet J Rare Dis.* 7: 67.
- Imai Y, Soda M, Hatakeyama S, Akagi T, Hashikawa T, Nakayama KI, Takahashi R (2002). CHIP Is Associated with Parkin, a Gene Responsible for Familial Parkinson's Disease, and Enhances Its Ubiquitin Ligase Activity. *Mol Cell.* 10(1): 55–67.
- Implen: NanoPhotometer NP80/N60/N50/C40 User Manual. Version 1.1.0. Software Version 1.1.10558 [Internet]. Abrufbar unter https://www.implen.de/wp-content/uploads/2015/08/User-ManualV1.1.0_NP80_N60_N50_C40-15_08_14.pdf.
- IUPAC (2000). IUPAC Codes [Internet]. International Union of Pure and Applied Chemistry. Abrufbar unter <https://www.bioinformatics.org/sms/iupac.html>.
- Jana NR, Dikshit P, Goswami A, Kotliarova S, Murata S, Tanaka K, Nukina N (2005). Co-chaperone CHIP associates with expanded polyglutamine protein and promotes their degradation by proteasomes. *J Biol Chem.* 280(12): 11635–11640.
- Jen JC, Graves TD, Hess EJ, Hanna MG, Griggs RC, Baloh RW (2007). Primary episodic ataxias: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Brain* 130(10): 2484–2493.

- Jiang J, Ballinger CA, Wu Y, Dai Q, Cyr DM, Höhfeld J, Patterson C (2001). CHIP is a U-box-dependent E3 ubiquitin ligase: identification of Hsc70 as a target for ubiquitylation. *J Biol Chem.* 276: 42938–42944.
- Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Žídek A, Potapenko A et al. (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596(7873): 583–589.
- Kanack AJ, Newsom OJ, Scaglione KM (2018). Most mutations that cause spinocerebellar ataxia autosomal recessive type 16 (SCAR16) destabilize the protein quality-control E3 ligase CHIP. *J Biol Chem.* 293(8): 2735–2743.
- Kang J, Lee MS, Gorenstein DG (2005). The enhancement of PCR amplification of a random sequence DNA library by DMSO and betaine: application to in vitro combinatorial selection of aptamers. *J Biochem Biophys Methods.* 64(2): 147–151.
- Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alföldi J, Wang Q, Collins RL, Laricchia KM, Ganna A, Birnbaum DP et al. (2020). The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature* 581(7809): 434–443.
- Kawarai T, Miyamoto R, Shimatani Y, Orlacchio A, Kaji R (2016). Choreoathetosis, Dystonia, and Myoclonus in 3 Siblings With Autosomal Recessive Spinocerebellar Ataxia Type 16. *JAMA Neurol.* 73(7): 888–890.
- Ko HS, Bailey R, Smith WW, Liu Z, Shin JH, Lee YI, Zhang YJ, Jiang H, Ross CA, Moore DJ et al. (2009). CHIP regulates leucine-rich repeat kinase-2 ubiquitination, degradation, and toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(8): 2897–2902.
- Kuo SH (2019). Ataxia. *Continuum (Minneapolis, Minn).* 25(4): 1036–1054.
- Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown GR, Chao C, Chitipiralla S, Gu B, Hart J, Hoffman D, Jang W et al. (2018). ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res.* 46(D1): 1062-1067.
- Lee BT, Barber GP, Benet-Pagès A, Casper J, Clawson H, Diekhans M, Fischer C, Gonzalez JN, Hinrichs AS, Lee CM et al. (2022). The UCSC Genome Browser database: 2022 update. *Nucleic Acids Res.* 50(D1): 1115-1122.
- Lee PJ, Yang S, Sun Y, Guo JU (2021). Regulation of nonsense-mediated mRNA decay in neural development and disease. *J Mol Cell Biol.* 13(4): 269-281.
- Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH (2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp.* 62: 3923.
- Lieto M, Riso V, Galatolo D, De Michele G, Rossi S, Barghigiani M, Coccozza S, Pontillo G, Trovato R, Saccà F et al. (2020). The complex phenotype of spinocerebellar ataxia type 48 in eight unrelated Italian families. *Eur J Neurol.* 27(3): 498–505.
- Luo L, Wang J, Lo RY, Figueroa KP, Pulst SM, Kuo PH, Perlman S, Wilmot G, Gomez CM, Schmahmann J et al. (2017). The Initial Symptom and Motor Progression in Spinocerebellar Ataxias. *Cerebellum* 16(3): 615–622.
- Magri S, Nanetti L, Gellera C, Sarto E, Rizzo E, Mongelli A, Ricci B, Fancellu R, Sambati L, Cortelli P et al. (2022). Digenic inheritance of STUB1 variants and TBP polyglutamine expansions explains the incomplete penetrance of SCA17 and SCA48. *Genet Med.* 24(1): 29–40.

- McDonough H, Patterson C (2003). CHIP: a link between the chaperone and proteasome systems. *Cell Stress Chaperones* 8(4): 303–308.
- McLaughlin B, Buendia MA, Saborido TP, Palubinsky AM, Stankowski JN, Stanwood GD (2012). Haploinsufficiency of the E3 ubiquitin ligase C-terminus of heat shock cognate 70 interacting protein (CHIP) produces specific behavioral impairments. *PLoS One*. 7(5): e36340.
- Meacham GC, Patterson C, Zhang W, Younger JM, Cyr DM (2001). The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nat Cell Biol*. 3(1): 100–105.
- Mengel D, Träschütz A, Reich S, Leyva-Gutiérrez A, Bender F, Hauser S, Haack TB, Synofzik M (2021). A de novo STUB1 variant associated with an early adult-onset multisystemic ataxia phenotype. *J Neurol*. 268(10): 3845–3851.
- Michov B (1996). Elektrophorese. Theorie und Praxis. W. de Gruyter, Berlin.
- Miller VM, Nelson RF, Gouvion CM, Williams A, Rodriguez-Lebron E, Harper SQ, Davidson BL, Rebagliati MR, Paulson HL (2005). CHIP suppresses polyglutamine aggregation and toxicity in vitro and in vivo. *J Neurosci*. 25(40): 9152–9161.
- Min JN, Whaley RA, Sharpless NE, Lockyer P, Portbury AL, Patterson C (2008) CHIP deficiency decreases longevity, with accelerated aging phenotypes accompanied by altered protein quality control. *Mol Cell Biol*. 28(12): 4018–4025.
- Mol MO, van Rooij JGJ, Brusse E, Verkerk AJMH, Melhem S, den Dunnen WFA, Rizzu P, Cupidi C, van Swieten JC, Donker Kaat L (2020). Clinical and pathologic phenotype of a large family with heterozygous *STUB1* mutation. *Neurol Genet*. 6(3): e417.
- Molinuevo JL, Gramunt N, Gispert JD, Fauria K, Esteller M, Minguillon C, Sánchez-Benavides G, Huesa G, Morán S, Dal-Ré R et al. (2016). The ALFA project: A research platform to identify early pathophysiological features of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement (N Y)*. 2(2): 82–92.
- Mongelli A, Magri S, Salvatore E, Rizzo E, de Rosa A, Fico T, Gatti M, Gellera C, Taroni F, Mariotti C et al. (2020). Frequency and distribution of polyQ disease intermediate-length repeat alleles in healthy Italian population. *Neurol Sci*. 41(6): 1475–1482.
- Morishima Y, Wang AM, Yu Z, Pratt WB, Osawa Y, Lieberman AP (2008). CHIP deletion reveals functional redundancy of E3 ligases in promoting degradation of both signaling proteins and expanded glutamine proteins. *Hum Mol Genet*. 17(24): 3942–3952.
- Müller HJ, Prange DR (2016). PCR - Polymerase-Kettenreaktion. 2. Auflage. Springer Berlin, Heidelberg.
- National Heart, Lung, and Blood Institute (2020). Trans-Omics for Precision Medicine (TOPMed) Program NHLBI, NIH [Internet]. Abrufbar unter <https://www.nhlbi.nih.gov/science/trans-omics-precision-medicine-topmed-program>.
- Nikolay R, Wiederkehr T, Rist W, Kramer G, Mayer MP, Bukau B (2004). Dimerization of the human E3 ligase CHIP via a coiled-coil domain is essential for its activity. *J Biol Chem*. 279(4): 2673–2678.

- NLM (2022). Home - Taxonomy - NCBI [Internet]. National Library of Medicine; National Institutes of Health; U.S. Department of Health and Human Services. Abrufbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>.
- Olszewska DA, Kinsella JA (2020). Extending the Phenotypic Spectrum Associated with *STUB1* Mutations: A Case of Dystonia. *Mov Disord Clin Pract*. 7(3): 318–324.
- OMIM (2022). Online Mendelian Inheritance in Man [Internet]. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD). Abrufbar unter <https://omim.org/>.
- Pakdaman Y, Berland S, Bustad HJ, Erdal S, Thompson BA, James PA, Power KN, Ellingsen S, Krooni M, Berge LI et al. (2021a). Genetic Dominant Variants in *STUB1*, Segregating in Families with SCA48, Display In Vitro Functional Impairments Indistinctive from Recessive Variants Associated with SCAR16. *Int J Mol Sci*. 22(11): 5870.
- Pakdaman Y, Denker E, Austad E, Norton WHJ, Rolfsnes HO, Bindoff LA, Tzoulis C, Aukrust I, Knappskog PM, Johansson S et al. (2021b). Chip Protein U-Box Domain Truncation Affects Purkinje Neuron Morphology and Leads to Behavioral Changes in Zebrafish. *Front Mol Neurosci*. 14: 723912.
- Pakdaman Y, Sanchez-Guixé M, Kleppe R, Erdal S, Bustad HJ, Bjørkhaug L, Haugarvoll K, Tzoulis C, Heimdal K, Knappskog PM et al. (2017). *In vitro* characterization of six *STUB1* variants in spinocerebellar ataxia 16 reveals altered structural properties for the encoded CHIP proteins. *Biosci Rep*. 37(2): BSR20170251.
- Palvadeau R, Kaya-Güleç ZE, Şimşir G, Vural A, Öztop-Çakmak Ö, Genç G, Aygün MS, Falay O, Başak AN, Ertan S (2020). Cerebellar cognitive-affective syndrome preceding ataxia associated with complex extrapyramidal features in a Turkish SCA48 family. *Neurogenetics* 21(1): 51–58.
- Parsons JL, Tait PS, Finch D, Dianova II, Allinson SL, Dianov GL (2008). CHIP-mediated degradation and DNA damage-dependent stabilization regulate base excision repair proteins. *Mol Cell*. 29(4): 477–487.
- Perlman S (1998 updated 2022). Hereditary Ataxia Overview. In: Adam MP, Everman DB, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, Amemiya A (Hrsg.). *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA). University of Washington, Seattle, 1993-2022.
- Pfeffer G, Blakely EL, Alston CL, Hassani A, Boggild M, Horvath R, Samuels DC, Taylor RW, Chinnery PF (2012). Adult-onset spinocerebellar ataxia syndromes due to MTATP6 mutations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 83(9): 883–886.
- Qiagen (2016). QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook. For DNA purification from whole blood, plasma, serum, buffy coat, lymphocytes, dried blood spots (QIAamp DNA Mini Kit only), body fluids, cultured cells, swabs, and tissue (QIAamp DNA Mini Kit only) [Internet]. Qiagen GmbH. Abrufbar unter <https://www.qiagen.com/jp/resources/download.aspx?id=62a200d6-faf4-469b-b50f-2b59cf738962&lang=en>.
- Qiagen (2012). QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit Handbuch. Version 2 [Internet]. Qiagen GmbH.

- Abrufbar unter <https://www.qiagen.com/au/resources/download.aspx?id=930d068d-3bd0-40d4-b761-2fadd4a5c0bc&lang=de-DE>.
- Qiagen (2002). DyeEx™ Handbook. For DyeEx 2.0 Spin Kit DyeEx 96 Kit [Internet]. Qiagen GmbH. Abrufbar unter <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=c1992325-e41f-4a78-8b5a-248cc91d2c2e&lang=en>.
- Radziwonik W, Elert-Dobkowska E, Klimkowicz-Mrowiec A, Ziora-Jakutowicz K, Stepniak I, Zaremba J, Sulek A (2022). Application of a custom NGS gene panel revealed a high diagnostic utility for molecular testing of hereditary ataxias. *J Appl Genet.* 63(3): 513–525.
- Ravel JM, Benkirane M, Calmels N, Marelli C, Ory-Magne F, Ewencyk C, Halleb Y, Tison F, Lecocq C, Pische G et al. (2021). Expanding the clinical spectrum of STIP1 homology and U-box containing protein 1-associated ataxia. *J Neurol.* 268(5): 1927–1937.
- Reis MC, Patrun J, Ackl N, Winter P, Scheifele M, Danek A, Nolte D (2022). A Severe Dementia Syndrome Caused by Intron Retention and Cryptic Splice Site Activation in *STUB1* and Exacerbated by *TBP* Repeat Expansions. *Front Mol Neurosci.* 15: 878236.
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E et al. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 17(5): 405–424.
- Ronnebaum SM, Patterson C, Schisler JC (2014). Emerging evidence of coding mutations in the ubiquitin-proteasome system associated with cerebellar ataxias. *Hum Genome Var.* 1: 14018.
- Rosser MFN, Washburn E, Muchowski PJ, Patterson C, Cyr DM (2007). Chaperone functions of the E3 ubiquitin ligase CHIP. *J Biol Chem.* 282(31): 22267–22277.
- Roux T, Barbier M, Papin M, Davoine CS, Sayah S, Coarelli G, Charles P, Marelli C, Parodi L, Tranchant C et al. (2020). Clinical, neuropathological, and genetic characterization of *STUB1* variants in cerebellar ataxias: a frequent cause of predominant cognitive impairment. *Genet Med.* 22(11): 1851–1862.
- Ruano L, Melo C, Silva MC, Coutinho P (2014). The global epidemiology of hereditary ataxia and spastic paraplegia: a systematic review of prevalence studies. *Neuroepidemiology* 42(3): 174–183.
- Saft C, Skodda S, Nguyen HP, Park J, Haack TB (2021). Teaching Video NeuroImage: New *STUB1* Variant Causes Chorea, Tremor, Dystonia, Myoclonus, Ataxia, Depression, Cognitive Impairment, Epilepsy, and Superficial Siderosis. *Neurology* 97(17): e1749-e1750.
- Sahara N, Murayama M, Mizoroki T, Urushitani M, Imai Y, Takahashi R, Murata S, Tanaka K, Takashima A (2005). In vivo evidence of CHIP up-regulation attenuating tau aggregation. *J Neurochem.* 94(5): 1254–1263.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985). Enzymatic Amplification of Beta-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. *Science* 230(4732): 1350-1354.

- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 74(12): 5463–5467.
- Schmidt O (2017). *Genetik und Molekularbiologie*. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg.
- Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D (2014). MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods*. 11(4): 361–362.
- Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, Sirotkin K (2001). dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res*. 29(1): 308–311.
- Shi CH, Schisler JC, Rubel CE, Tan S, Song B, McDonough H, Xu L, Portbury AL, Mao CY, True C et al. (2014). Ataxia and hypogonadism caused by the loss of ubiquitin ligase activity of the U box protein CHIP. *Hum Mol Genet*. 23(4): 1013–1024.
- Shi Y, Wang J, Li JD, Ren H, Guan W, He M, Yan W, Zhou Y, Hu Z, Zhang J et al. (2013). Identification of CHIP as a novel causative gene for autosomal recessive cerebellar ataxia. *PLoS One*. 8(12): e81884.
- Shimura H, Schwartz D, Gygi SP, Kosik KS (2004). CHIP-Hsc70 complex ubiquitinates phosphorylated tau and enhances cell survival. *J Biol Chem*. 279(6): 4869–4876.
- Shin Y, Klucken J, Patterson C, Hyman BT, McLean PJ (2005). The co-chaperone carboxyl terminus of Hsp70-interacting protein (CHIP) mediates alpha-synuclein degradation decisions between proteasomal and lysosomal pathways. *J Biol Chem*. 280(25): 23727–23734.
- Soong BW, Morrison PJ (2018). Spinocerebellar ataxias. *Handb Clin Neurol*. 155: 143–174.
- Spieß AN, Ivell R (2002). A highly efficient method for long-chain cDNA synthesis using trehalose and betaine. *Anal Biochem*. 301(2): 168–174.
- Subramony SH (2007). SARA--a new clinical scale for the assessment and rating of ataxia. *Nat Clin Pract Neurol*. 3(3): 136–137.
- Sullivan R, Yau WY, O'Connor E, Houlden H (2019). Spinocerebellar ataxia: an update. *J Neurol*. 266(2): 533–544.
- Sun M, Johnson AK, Nelakuditi V, Guidugli L, Fischer D, Arndt K, Ma L, Sandford E, Shakkottai V, Boycott K et al. (2019). Targeted exome analysis identifies the genetic basis of disease in over 50% of patients with a wide range of ataxia-related phenotypes. *Genet Med*. 21(1): 195–206.
- Synofzik M, Schüle R, Schulze M, Gburek-Augustat J, Schweizer R, Schirmacher A, Krägeloh-Mann I, Gonzalez M, Young P, Züchner S et al. (2014). Phenotype and frequency of STUB1 mutations: next-generation screenings in Caucasian ataxia and spastic paraplegia cohorts. *Orphanet J Rare Dis*. 9: 57.
- Tetzlaff JE, Putcha P, Outeiro TF, Ivanov A, Berezovska O, Hyman BT, McLean PJ (2008). CHIP targets toxic alpha-Synuclein oligomers for degradation. *J Biol Chem*. 283(26): 17962–17968.
- The GTEx Consortium (2020). The GTEx Consortium atlas of genetic regulatory effects across human tissues. *Science* 369(6509): 1318–1330.

- UniProt Consortium (2021). UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res.* 49(D1): D480-D489.
- Turkgenç B, Sanlidag B, Eker A, Giray A, Kutuk O, Yakicier C, Tolun A, Temel SG (2018). STUB1 polyadenylation signal variant AACAAA does not affect polyadenylation but decreases STUB1 translation causing SCAR16. *Hum Mutat.* 39(10): 1344–1348.
- UCSC Genome Browser (2019 updated 2020). Gene Expression in 54 tissues from GTEx RNA-seq of 17382 samples, 948 donors (STUB1) [Internet]. V8, Aug 2019, updated 28.04.2020. Abrufbar unter https://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgc?hgsid=289987653_kqGBaipEv0em3JNiSYvVPY0ADZLA&db=hg38&c=chr16&l=680409&r=682801&o=680223&t=681603&g=gtxGeneV8&i=STUB1.
- Umano A, Fang K, Qu Z, Scaglione JB, Altinok S, Treadway CJ, Wick ET, Paulakonis E, Karunanayake C, Chou S et al. (2022). The molecular basis of spinocerebellar ataxia type 48 caused by a de novo mutation in the ubiquitin ligase CHIP. *J Biol Chem.* 298(5): 101899.
- USB Corporation (2000). ExoSAP-IT [Internet]. Abrufbar unter https://www.fimm.fi/sites/default/files/SeqLab_Exosap_USB.pdf.
- Varadi M, Anyango S, Deshpande M, Nair S, Natassia C, Yordanova G, Yuan D, Stroe O, Wood G, Laydon A et al. (2022). AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res.* 50(D1): D439-D444.
- Viswanathan VK, Krcmarik K, Cianciotto NP (1999). Template secondary structure promotes polymerase jumping during PCR amplification. *Biotechniques.* 27(3): 508–511.
- Werle E, Schneider C, Renner M, Völker M, Fiehn W (1994). Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing. *Nucleic Acids Res.* 22(20): 4354–4355.
- Williams AJ, Knutson TM, Colomer Gould VF, Paulson HL (2009). In vivo suppression of polyglutamine neurotoxicity by C-terminus of Hsp70-interacting protein (CHIP) supports an aggregation model of pathogenesis. *Neurobiol Dis.* 33(3): 342–353.
- Williams LR (2001). Staining nucleic acids and proteins in electrophoresis gels. *Biotech Histochem.* 76(3): 127–132.
- Winklhofer KF, Tatzelt J, Haass C (2008). The two faces of protein misfolding: gain- and loss-of-function in neurodegenerative diseases. *EMBO J.* 27(2): 336–349.
- Zeytuni N, Zarivach R (2012). Structural and functional discussion of the tetra-trico-peptide repeat, a protein interaction module. *Structure* 20(3): 397–405.
- Zhang M, Windheim M, Roe SM, Peggie M, Cohen P, Prodromou C, Pearl LH (2005). Chaperoned ubiquitylation - crystal structures of the CHIP U box E3 ubiquitin ligase and a CHIP-Ubc13-Uev1a complex. *Mol Cell.* 20(4): 525–538.

11 Anhang

Tabelle 22: Bekannte SCAR16-Mutationen im *STUB1*-Gen, Stand: November 2022

Variante	AS-Austausch	Homozygot/ch	Exon (Intron)	Erstbeschreibende Publikation
c.82G>A	p.Glu28Lys	ch mit c.430A>T	1	(Heimdal et al., 2014)
c.103C>A	p.Arg35Ser	ch mit c.678 679del	1	(Gazulla et al., 2018)
c.194A>G	p.Asn65Ser	homozygot	2	(Heimdal et al., 2014)
c.235G>A	p.Ala79Thr	ch mit c.236C>A	2	(Synofzik et al., 2014)
c.236C>A	p.Ala79Asp	ch mit c.235G>A	2	(Synofzik et al., 2014)
c.355C>T	p.Arg119*	ch mit c.880A>T	2	(Hayer et al., 2017)
c.358+1G>A	p.?	ch mit c.566A>C	(2)	(Olszewska und Kinsella, 2020)
c.359C>T	p.Ala120Val	ch mit c.632T>C	3	(Roux et al., 2020)
c.367C>G	p.Leu123Val	homozygot	3	(Synofzik et al., 2014)
c.389A>T	p.Asn130Ile	ch mit c.441G>T	3	(Shi et al., 2013)
c.430A>T	p.Lys144*	ch mit c.82G>A	3	(Heimdal et al., 2014)
c.433A>C	p.Lys145Gln	ch mit c.687-690delCTAC	3	(Depondt et al., 2014)
c.441G>T	p.Trp147Cys	ch mit c.389A>T	3	(Shi et al., 2013)
c.493C>T	p.Leu165Phe	homozygot	3	(Shi et al., 2013)
c.502C>T	p.Leu168Phe	ch mit c.433A>C	3	(Coutelier et al., 2017)
c.518G>A	p.Arg173His	ch mit c.433A>C	3	(Ravel et al., 2021)
c.566A>C	p.Asp189Ala	ch mit c.358+1G>A	4	(Olszewska und Kinsella, 2020)
c.612+1G>C	p.?	ch mit c.823C>G	(4)	(Cordoba et al., 2014)
c.621C>G	p.Tyr207*	ch mit c.707G>C	5	(Shi et al., 2013)
c.632T>C	p.Met211Thr	ch mit c.359C>T	5	(Roux et al., 2020)
c.633G>A	p.Met211Ile	ch mit c.712G>T	5	(Bettencourt et al., 2015)
c.646dup	p.Ser216Phefs*5	ch mit c.433A>C	5	(Sun et al., 2019)
c.678 679del	p.Ile227Profs*11	ch mit c.103C>A	6	(Gazulla et al., 2018)
c.687-690delCTAC	p.Tyr230Cysfs*8	ch mit c.433A>C	6	(Depondt et al., 2014)
c.691C>G	p.Leu231Val	homozygot	6	(Roux et al., 2020)
c.694T>G	p.Cys232Gly	ch mit c.433A>C	6	(Chiu et al., 2020)
c.694_699del	p.Cys232_Gly233del	ch mit c.721C>G	6	(Sun et al., 2019)
c.707G>C	p.Ser236Thr	ch mit c.621C>G	6	(Shi et al., 2013)
c.712G>T	p.Glu238*	ch mit c.633G>A	6	(Bettencourt et al., 2015)
c.719T>C	p.Met240Thr	homozygot	6	(Synofzik et al., 2014)
c.721C>T	p.Arg241Trp	ch mit c.433A>C	6	(Chiu et al., 2020)
c.721C>G	p.Arg241Gly	ch mit c.694 699del	6	(Sun et al., 2019)
c.724G>A	p.Glu242Lys	homozygot	6	(Kawarai et al., 2016)
c.728C>T	p.Pro243Leu	ch mit c.433A>C	6	(Hayer et al., 2017)
c.737C>T	p.Thr246Met	homozygot	6	(Shi et al., 2014)
c.814C>T	p.Arg272Trp	ch mit c.863 865delAGG	7	(Ravel et al., 2021)
c.823C>G	p.Leu275Val	ch mit c.612+1G>C	7	(Cordoba et al., 2014)
c.863_865delAGG	p.Glu288del	ch mit c.814C>T	7	(Ravel et al., 2021)
c.880A>T	p.Ile294Phe	ch mit c.355C>T	7	(Hayer et al., 2017)
c.*240T>C	-	homozygot	3'UTR	(Turkgenc et al., 2018)

Tabelle zusammengefasst nach Shi et al., 2013; Heimdal et al., 2014; Synofzik et al., 2014; Cordoba et al., 2014; Shi et al., 2014; Depondt et al., 2014; Bettencourt et al., 2015; Kawarai et al., 2016; Hayer et al., 2017; Coutelier et al., 2017; Gazulla et al., 2018; Turkgenc et al., 2018; Sun et al., 2019; Chiu et al., 2020; Olszewska und Kinsella, 2020; Roux et al., 2020; UniProt Consortium, 2021; Ravel et al., 2021; Cunningham et al., 2022; Magri et al., 2022. ch = compound-heterozygot.

12 Publikationsverzeichnis

Reis MC*, Patrun J*, Ackl N, Winter P, Scheifele M, Danek A, Nolte D (2022). A Severe Dementia Syndrome Caused by Intron Retention and Cryptic Splice Site Activation in *STUB1* and Exacerbated by *TBP* Repeat Expansions. *Frontiers in molecular neuroscience* 15: 878236.

**geteilte Erstautorschaft*

Patrun J, Winter P, Reis MC, Nolte D (2021). Demenz als mögliches Leitsymptom bei SCA48-Patienten. Poster am Science Day 2021 der Justus-Liebig-Universität Gießen.

13 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort/Datum

Unterschrift

14 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. rer. nat. Dagmar Nolte für die Möglichkeit der Durchführung dieser Dissertation am Institut für Humangenetik der Justus-Liebig-Universität Gießen. Ich danke ihr für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im Labor, die Vergabe des Themas und die hervorragende fachliche Betreuung. Die Hilfestellung beim Verfassen des Manuskripts war sehr wertvoll.

Mein weiterer Dank geht an alle Mitarbeiter des humangenetischen Instituts für ihre Hilfsbereitschaft und die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre. Ganz besonders danke ich Pia Winter für die ausführliche Einarbeitung in die Methoden, technische Unterstützung und guten Ratschläge. Außerdem möchte ich Marlen Reis für den herzlichen Austausch danken.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für das Interesse an der Arbeit, insbesondere meinen Eltern für den stetigen Rückhalt. Mein Dank gilt Adrian für die Ermutigungen und große Unterstützung. Ich danke meiner Mutter, Tanja und Lena für das aufmerksame Korrekturlesen.

15 Tabellarischer Lebenslauf

In der Datei der Drucklegung wurde der Lebenslauf entfernt.