

**Besteht ein kausaler Zusammenhang zwischen Punktmutationen im
ELOVL1-Gen und einer spinocerebellären Ataxie?**

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

vorgelegt von Jendrik John Roelof Mause
aus Bad Arolsen

Gießen 2022

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Institut für Humangenetik

Gutachterin:

Frau Prof. Dr. rer. nat. Dagmar Nolte

Gutachter:

Prof. Dr. Dr. Hagen Huttner

Tag der Disputation:

17.11.2022

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Einführung in Ataxien	1
1.2 Klassifikationen der Ataxien	1
1.3 Ätiologie	2
1.3.1 Erworbene Ataxien	2
1.3.2 Sporadische degenerative Ataxien	2
1.3.3 Hereditäre Ataxien	2
1.4 Spinocerebelläre Ataxien	4
1.4.1 Klinik der spinocerebellären Ataxien	4
1.4.2 Epidemiologie der spinocerebellären Ataxien	5
1.4.3 Repeatexpansionen im codierenden Bereich	5
1.4.4 Repeatexpansionen in nicht-codierenden Bereichen	6
1.4.5 Konventionelle Varianten	7
1.5 Diagnose der hereditären Ataxien	9
1.6 Therapie der spinocerebellären Ataxien	9
1.7 <i>ELOVL</i> -Genfamilie	10
1.7.1 <i>ELOVL4</i> und SCA34	11
1.7.2 <i>ELOVL5</i> und SCA38	12
1.7.3 Möglicher Pathomechanismus der SCA38	14
1.7.4 <i>ELOVL1</i> -Gen	14
1.7.5 Transkriptvarianten von <i>ELOVL1</i>	16
1.7.6 <i>ELOVL1</i> -Protein	16
1.8 Fragestellung	17
2. Material	18
2.1 Chemikalien und Enzyme	18
2.2 RNA-Isolation und cDNA-Synthese: Chemikalien und Kits	18
2.3 Kits	19
2.4 Geräte und Verbrauchsartikel	19
2.5 Sequenzer und Zubehör	21
2.6 DNA-Oligonukleotid-Primer	21
2.7 Nukleotid-Mix	22
2.8 Computerprogramme	22
2.9 RNA-Proben	22

3. Methoden	23
3.1 DNA-Extraktion aus Blut	23
3.1.1 Silikagel basierende Verfahren	23
3.3 Polymerase-Ketten-Reaktion	24
3.3.1 Komponenten und Reagenzien	24
3.3.2 DNA-Polymerase	25
3.3.3 Puffer	25
3.3.4 Oligonukleotid-Primer	25
3.3.5 Desoxyribonukleotide	25
3.3.6 PCR von GC-reichen Abschnitten	26
3.3.7 Schritte der PCR	26
3.3.8 Wahl der Primer	27
3.3.9 Primer-Bindungsstellen und Sequenzen	28
3.3.10 Durchführung der PCR des <i>ELOVL1</i> -Gens auf DNA-Ebene	29
3.4 Gelelektrophorese	30
3.4.1 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren auf Agarosegel	30
3.4.2 Durchführung der Gelelektrophorese	31
3.5 Reinigung der PCR-Produkte	32
3.5.1 Durchführung der Reinigung der PCR-Produkte	33
3.6 Sequenzierung	34
3.6.1 Kapillarelektrophorese mithilfe von Fluoreszenzfarbstoffen	34
3.7 Zweite Aufreinigung	35
3.7.1 Durchführung der zweiten Aufreinigung	35
3.8 Kapillarelektrophorese	36
3.8.1 SeqStudio Genetic Analyzer	36
3.9 RNA-Isolation	36
3.9.1 Grundlagen der RNA-Isolation	36
3.9.2 Durchführung der RNA-Isolation	36
3.10 cDNA-Synthese	38
3.10.2 PCR der cDNA	39
3.10.3 Auftrennen der Banden und DNA Gelextraktion	40

4. Ergebnisse	41
4.1 Patientenkollektiv	41
4.2 Gelelektrophorese	42
4.3 Sequenz-Analyse von <i>ELOVLI</i> (Exons 1-8)	42
4.3.1 Exon 1	43
4.3.2 Exon 2	43
4.3.3 Intron 2	44
4.3.4 Exon 3	45
4.3.5 Exon 4	46
4.3.6 Exon 5	47
4.3.7 Exon 6	47
4.3.8 Exon 7	47
4.3.9 Exon 8 (codierend)	48
4.3.10 Exon 8 (nicht-codierend)	49
4.4 Nachgewiesene Varianten im Kontext der Sequenzen	49
4.5 Transkriptvarianten von <i>ELOVLI</i>	51
4.5.1 Vorgehensweise und Wahl der Primer	51
4.5.2 Auftreten von Nebenbanden	52
4.5.3 Ergebnis der Untersuchung mit den Primern cEx4F und cEx8R	52
4.5.4 Ergebnis der Untersuchung mit den Primern cEx3F und cEx8R	53
4.5.5 Ergebnis der Untersuchung mit den Primern cEx3F und cInt5R	54
4.5.6 Auftreten von diversen Banden	55
4.5.7 Abschließende Untersuchung	57
4.5.8 Semiquantitativer Vergleich der Expression von <i>ELOVLI</i>	58
4.6 Ergebnis der Untersuchung der Transkriptvarianten	58
5. Diskussion	59
5.1 Bisher bekannte Varianten des <i>ELOVLI</i> -Gens	59
5.2 Im Rahmen der Untersuchung gefundene Varianten in <i>ELOVLI</i>	60
5.2.1 Variante in Intron 2	60
5.2.2 Variante in Exon 3	60
5.2.3 Variante in Exon 8	61
5.2.4 Beurteilung der Ergebnisse der Untersuchung	62

5.3 Möglicher Zusammenhang von Varianten in <i>ELOVL1</i> und dem klinischen Bild einer spinocerebellären Ataxie	63
5.3.1 Herunterregulierung von <i>Elov1l</i> im Tiermodell für SCA2	63
5.3.2 Möglicher Erbgang von Varianten	63
5.4 Zusammenhang von Varianten in <i>ELOVL1</i> , 4 sowie 5 und der Pathogenese von spinocerebellären Ataxien	64
5.4.2 Konservierung von <i>ELOVL1</i>	65
5.5 <i>ELOVL1</i> -Transkripte	66
5.6 Expression der Fettsäure-Elongasen.....	66
5.7 ELOVL-Proteine	66
5.8 Ausblick.....	67
5.8.1 Neue Therapieansätze der spinocerebellären Ataxien	67
5.8.2 Pharmakologische Therapie.....	67
5.8.3 Gentherapie	68
5.8.4 Stammzelltherapie	69
5.8.5 Zukünftiger Einsatz.....	69
5.8.6 Auswirkungen der Gendiagnostik	70
6. Zusammenfassung.....	71
7. Summary	72
8. Abkürzungsverzeichnis.....	73
9. Abbildungsverzeichnis	75
10. Tabellenverzeichnis.....	76
11. Literaturverzeichnis.....	77
12. Anhang	87
13. Ehrenwörtliche Erklärung	88
14. Danksagung	89

1. Einleitung

1.1 Einführung in Ataxien

Als Ataxie wird im Allgemeinen die Störung der Bewegungskoordination bezeichnet (Klockgether, Mariotti und Paulson, 2019). Im weiteren Sinne handelt es sich um ein neurologisches Zeichen diverser Erkrankungen mit Störungen der Bewegung und Koordination von differenter Ätiologie (Hacke, 2016). Klinisch fallen v. a. eine Gangbeeinträchtigung, Gleichgewichtsstörungen mit Fallneigung und häufigen Stürzen, Koordinationsstörungen der Gliedmaßen, Dysarthrie (Sprechstörung) und Augenbewegungsstörungen (z. B. Nystagmus) auf (Vermeer *et al.*, 2011; Jayadev und Bird, 2013). Für die Entstehung der Pathologien kommt eine Vielzahl von Ursachen, wie Varianten in verschiedenen Genen, in Frage (Klockgether, 2018; Klockgether, Mariotti und Paulson, 2019). Eine große Anzahl an nicht-genetischen Ursachen für Ataxien ist bekannt (Bird, 2019). Diese stehen hier nicht im Vordergrund.

1.2 Klassifikationen der Ataxien

Es existieren unterschiedliche Ataxie-Klassifikationen mit unterschiedlichem Fokus. Die Klassifikation der autosomal dominanten cerebellären Ataxien (ADCAs) nach Harding basiert auf Symptomatik und empirischer Evidenz und teilte die Ataxien ursprünglich in vier Klassen ein (Harding, 1982). Diese Einteilung kann auch heute noch nützlich sein, v. a. aus klinischer Sicht (Whaley *et al.*, 2011; Sullivan *et al.*, 2019). Daneben existierte auch eine Klassifikation der hereditären Ataxien (Harding, 1983). Einige ursprünglich gebräuchliche Klassifikationen finden heute jedoch keine Verwendung mehr, wie etwa die anatomische Einteilung (Hacke, 2016).

Die Einteilung der aktuellen S1-Leitlinie „Ataxien des Erwachsenenalters“ der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN) beruht auf der Ätiologie und unterscheidet generell drei Formen voneinander: genetische (erbliche), erworbene und sporadisch degenerative Ataxien. Diese drei Gruppen werden in mehrere Untergruppen gegliedert (Klockgether *et al.*, 2018). Die genetischen Ataxien werden weiter nach ihrem Vererbungsmuster (s. u.) unterteilt (Vermeer *et al.*, 2011; Klockgether *et al.*, 2018).

1.3 Ätiologie

1.3.1 Erworbene Ataxien

Zu den erworbenen, nicht-genetischen Ursachen zählen Alkoholismus, Multiple Sklerose, Vitaminmangel, fokale und vaskuläre Erkrankungen, Multisystematrophie etc. (Jayadev und Bird, 2013; Lieto *et al.*, 2019). Fokale Kleinhirnkrankheiten wie z. B. Tumoren, Abszesse, Hirninfarkte oder Hirnblutungen führen zwar klinisch zum Bild einer Ataxie, lassen sich aber häufig bereits durch eine ausführliche klinische Untersuchung von anderen Ataxien unterscheiden. Definitiv sind fokale Veränderungen in der cMRT darstellbar (Klockgether *et al.*, 2018). Verschiedene Medikamente, Drogen sowie Toxine können zu einer Ataxie führen (Lieto *et al.*, 2019). Als neurologisches Symptom treten Ataxien im Rahmen von Stoffwechselstörungen wie z. B. dem Morbus Wilson in Folge erhöhter Kupferspiegel auf (Członkowska *et al.*, 2018; Dusek *et al.*, 2019). In jedem Alter können erworbene Ataxien sporadisch entstehen. Die Wahrscheinlichkeit ihres Auftretens steigt jedoch mit dem Lebensalter an (Klockgether *et al.*, 2018).

1.3.2 Sporadische degenerative Ataxien

Werden weder erworbene noch genetische Ursachen gefunden, handelt es sich um sporadische degenerative Ataxien (Giordano *et al.*, 2017). Neben der sporadischen und progressiven Symptomatik eines cerebellären Syndroms (u. a. Ataxie) besteht bei der Multisystematrophie vom cerebellären Typ (MSA-C) auch eine autonome Funktionsstörung wie Urininkontinenz oder orthostatische Dysregulation (Klockgether *et al.*, 2018). Auch wenn die Diagnose einer MSA-C durch die klinische Untersuchung der Patienten oft wegweisend ist, kann sie erst durch den Nachweis von oligodendroglialen Einschlüssen in der Autopsie definitiv gestellt werden (Giordano *et al.*, 2017). Geht die Erkrankung ohne autonome Funktionsstörung einher und wird weder eine erworbene noch genetische Ursache gefunden, wird diese als sporadische, im Erwachsenenalter beginnende Ataxie unbekannter Ätiologie (SAOA) klassifiziert (Giordano *et al.*, 2017; Klockgether *et al.*, 2018). Nicht selten jedoch präsentieren sich hereditäre Ataxien sporadisch (Lieto *et al.*, 2019).

1.3.3 Hereditäre Ataxien

Die heterogene Gruppe der hereditären Ataxien umfasst Erkrankungen des Nervensystems, die allesamt durch das Auftreten einer Ataxie gekennzeichnet sind

(Klockgether, Mariotti und Paulson, 2019). Davon abgesehen können je nach genetischer Ursache recht unterschiedliche, additional Symptome auftreten (Whaley, Fujioka und Wszolek, 2011; Jayadev und Bird, 2013). Eine Inkoordination des Ganges ist allen Formen gemein. Oft kommen Störungen der Hand- (Extremitätenataxie und Tremor), Sprach- (cerebelläre Dysarthrie) und Augenbewegungscoordination (Okulomotorik) sowie Intentionstremor und Dysdiadochokinese (Unfähigkeit des Ausführens antagonistischer Bewegungen) hinzu (Durr, 2010; Jayadev und Bird, 2013). Hereditäre Ataxien werden nach ihrem Erbgang in autosomal-dominant, autosomal-rezessiv, X-chromosomal oder mitochondrial unterteilt (Jayadev und Bird, 2013; Nolte *et al.*, 2021).

Autosomal-rezessive Ataxien bilden eine heterogene Gruppe seltener neurodegenerativer Erkrankungen mit progressiver cerebellärer Ataxie als Leitsymptom, assoziiert mit unterschiedlichen additionalen Symptomen (Vermeer *et al.*, 2011). Von den 59 beschriebenen primär rezessiven Ataxien sind 44 sehr selten (Stand Februar 2022). Regionale und ethnische Unterschiede herrschen vor (Beaudin *et al.*, 2017, 2019). Die weltweit häufigste hereditäre Ataxie überhaupt ist die Friedreich-Ataxie (geschätzte Prävalenz 3-4 pro 100.000) (Vermeer *et al.*, 2011). Sie beginnt typischerweise im Kindes- oder Jugendalter (Beaudin *et al.*, 2019). Die Friedreich-Ataxie geht neurologisch v. a. mit einer afferenten Ataxie mit sensibler, axonaler Neuropathie oder einer Störung der Pyramidenbahn einher (Klockgether *et al.*, 2018). Nicht neurologisch imponieren bspw. eine Kardiomyopathie und ein Diabetes mellitus (Beaudin *et al.*, 2019).

Zu den X-chromosomal vererbten Ataxien zählt das neurodegenerative Fragile-X-Tremor/Ataxie-Syndrom (FXTAS). FXTAS ist langsam progredient, beginnt typischerweise nach dem 50. Lebensjahr und entsteht durch Prämutationen im *FMRI*-Gen (*fragile X mental retardation 1*) (Klockgether *et al.*, 2018; Cabal-Herrera *et al.*, 2020). Als Prämutationen werden Trinukleotidexpansionen von relativ geringer Länge (bspw. 55 bis 200 CGG-Repeats in *FMRI*) bezeichnet. Dagegen führen „Vollmutationen“ (bspw. ab 220 CGG-Repeats in *FMRI*) zum Fragilen-X-Syndrom (FXS) (Cabal-Herrera *et al.*, 2020). Führend sind beim FXTAS neben der cerebellären Ataxie ein Aktionstremor, Änderungen des Verhaltens und der Kognition sowie eine periphere Neuropathie (van de Warrenburg *et al.*, 2014).

Autosomal-dominante cerebelläre Ataxien (ADCAs) umfassen verschiedene neurodegenerative Erkrankungen mit gleichem Erbgang. Allein durch Symptomatik oder bildgebende Verfahren lassen sie sich und ihre genetische Ursache selten voneinander unterscheiden (Jayadev und Bird, 2013; Buijsen *et al.*, 2019). Sie sind in der Regel langsam progressiv und zeigen oft das Bild einer Kleinhirnatrophie (Klockgether, Mariotti und Paulson, 2019). Die meisten dieser Erkrankungen gehören zu den spinocerebellären Ataxien (SCAs) (Buijsen *et al.*, 2019). Häufig ist ein Elternteil der Erkrankten einer SCA ebenfalls betroffen (Klockgether *et al.*, 2018). Episodische Ataxien (EA) und eine spastische Ataxie (SPAX1) werden ebenfalls autosomal-dominant vererbt (Bourassa *et al.*, 2012; Choi und Choi, 2016). Die globale durchschnittliche Prävalenz der ADCAs wird mit etwa 2,7 Erkrankten pro 100.000 angegeben (Ruano *et al.*, 2014).

1.4 Spinocerebelläre Ataxien

Spinocerebelläre Ataxien (SCAs) gehören zu den autosomal-dominanten, neurodegenerativen Erkrankungen. In der Regel führen sie zu einer Degeneration des Cerebellums (Kleinhirn) und seiner afferenten sowie efferenten Fasern (Ashizawa *et al.*, 2018). Anders als der Name vermuten lassen könnte, ist bei vielen SCAs das Rückenmark nicht betroffen (Klockgether, Mariotti und Paulson, 2019). Eine Atrophie von Cerebellum und Hirnstamm ist oft das führende Zeichen in der kranialen Bildgebung (Durr, 2010). Auch diese Gruppe von Erkrankungen zeigt eine starke klinische und genetische Heterogenität (Klockgether *et al.*, 2019; Sullivan *et al.*, 2019). Bisher wurden ca. 46 SCAs beschrieben. Pathogene Varianten (vgl. Tabelle 1.1) wurden in derzeit ca. 37 Genen publiziert (Ashizawa *et al.*, 2018; Sullivan *et al.*, 2019).

1.4.1. Klinik der spinocerebellären Ataxien

Symptomatisch stehen initial v. a. eine Stand- und Gangunsicherheit im Vordergrund (Paulson *et al.*, 2017). In der klinischen Untersuchung lässt sich oftmals eine Störung der cerebellären Okulomotorik wie eine Augenbewegungsstörung oder eine Verlangsamung von Sakkaden beobachten. Einige Patienten klagen über Doppelbilder (Klockgether *et al.*, 2019). Schluck- oder Schlafstörungen wie das *Restless-Legs*-Syndrom sind weitere Symptome (Vogel *et al.*, 2015; Klockgether *et al.*, 2019). Bei einigen SCA-Subtypen tritt eine Neuropathie der sensiblen Fasern auf (Durr, 2010; Paulson *et al.*, 2017). Bei anderen SCAs wurden epileptische Anfälle beschrieben (Sun

et al., 2016; Klockgether *et al.*, 2018). Die klinischen Symptome können auf eine bestimmte SCA hindeuten, jedoch lässt sich aus den Symptomen allein häufig nicht das veränderte Gen ableiten (Klockgether *et al.*, 2019). Einigen SCAs gehen präataktische Manifestationen voraus (Kim *et al.*, 2021).

1.4.2 Epidemiologie der spinocerebellären Ataxien

Das Erkrankungsalter der SCAs liegt oft zwischen der dritten und fünften Lebensdekade, aber auch hier herrscht eine große Variabilität vor (Durr, 2010; Ruano *et al.*, 2014). SCAs treten mit einer Gesamthäufigkeit von circa 0-5,6 pro 100.000 Personen auf, bzw. mit einer durchschnittlichen Häufigkeit von 2,7 pro 100.000 Personen (Ruano *et al.*, 2014). In Deutschland sind die SCA1, 2, 3 und 6 am häufigsten (Bird, 2019). Unterschiedlichen, internationalen Studien zufolge tritt die SCA3 weltweit von allen ADCAs am häufigsten auf. Allerdings unterscheidet sich die Häufigkeit der verschiedenen SCAs je nach Land deutlich (Ruano *et al.*, 2014; Sullivan *et al.*, 2019).

1.4.3 Repeatexpansionen im codierenden Bereich

Ursächlich für die SCA1, 2, 3, 6, 7, 12 und 17 sowie DRPLA sind Trinukleotidexpansionen der sich wiederholenden Nukleinbasen Cytosin, Adenin und Guanin (CAG). Diese sind von unterschiedlicher Länge und betreffen unterschiedliche Gene (Durr, 2010; Jayadev und Bird, 2013; Paulson *et al.*, 2017). Fallen die Trinukleotidexpansionen in proteincodierende Bereiche (Exons), folgt daraus ein Protein mit elongierter polyglutaminhaltiger Aminosäuresequenz. Das wiederum kann die Funktion des translatierten Proteins beeinflussen (Jayadev und Bird, 2013). Möglicherweise entwickelt das Protein durch die verlängerte Abfolge der Aminosäure Glutamin pathogene Eigenschaften (*toxic gain of function*) (Durr, 2010; Buijsen *et al.*, 2019). Vermutlich kommt es durch die veränderte Proteinkonformation zur konsekutiven Akkumulation des Proteins und damit zur Zelltoxizität sowie Neurodegeneration und schließlich zur Apoptose von Neuronen (vgl. Abbildung 1.1) (Paulson *et al.*, 2017; Buijsen *et al.*, 2019; Sullivan *et al.*, 2019). Die Expansion von Polyglutamin führt wahrscheinlich zur Perturbation (Störung) der molekularen Regulation der Genexpression (Paulson *et al.*, 2017).

Je länger die CAG-Wiederholungen sind, desto früher und schwerwiegender kommt es im Allgemeinen zur Erkrankung mit meist auch progressiverem Krankheitsverlauf (Nethisinghe *et al.*, 2018). Allerdings variieren sowohl das Alter, der Schweregrad und

die Progression der Erkrankung als auch die Art der Symptome. Sie korrelieren nicht genau mit der Länge der Wiederholungen (Durr, 2010; Jayadev und Bird, 2013). Erst ab einer gewissen Länge an Wiederholungen kommt es je nach betroffenem Gen zur vollständigen Penetranz (Jayadev und Bird, 2013; Nethisinghe *et al.*, 2018). Bei Repeatexpansionen im codierenden Bereich kommt es zum Phänomen der Antizipation, also der Abnahme des Erkrankungsalters über Generationen und evtl. auch der Zunahme des Schweregrads (Klockgether *et al.*, 2019). Dies wird erklärt durch die Tendenz zur Verlängerung von instabilen Trinukleotid-Wiederholungen durch Vererbung (Durr, 2010). Jedoch kann die Länge der Trinukleotidexpansion auch über Generationen stabil bleiben (Jayadev und Bird, 2013).

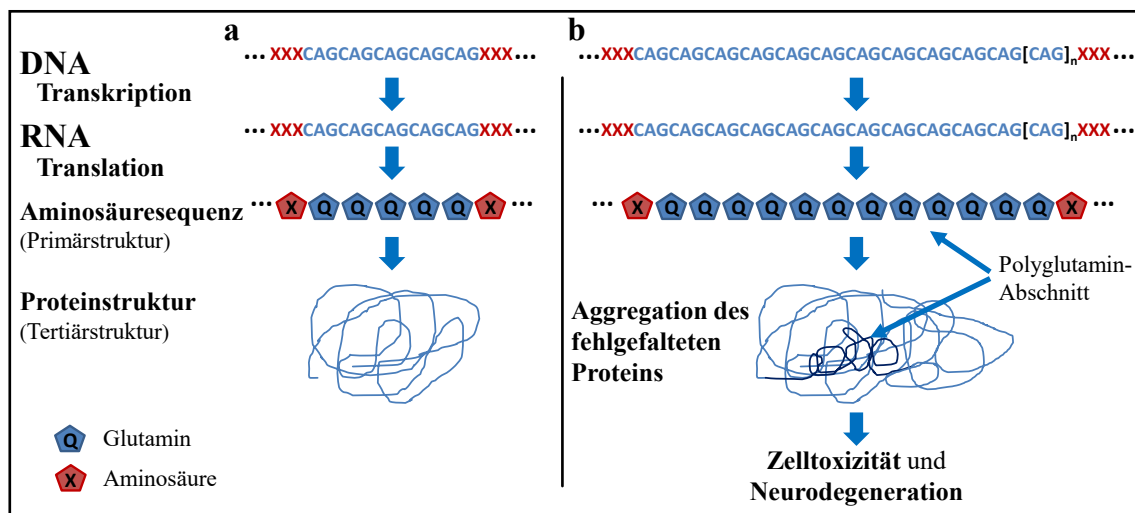


Abbildung 1.1 | **Schematische Darstellung des Fehlfaltungsmechanismus von Proteinen durch Trinukleotidexpansion.** **a** | Nach Translation der nicht expandierten RNA entsteht ein Protein mit korrekter Struktur und Funktion **b** | Die CAG-Trinukleotidexpansion führt zum fehlgefalteten Protein mit polyglutaminhaltigem Abschnitt. Abb. modifiziert nach Sullivan *et al.*, 2019.

1.4.4 Repeatexpansionen in nicht-codierenden Bereichen

Fällt die Trinukleotidexpansion wie bei SCA8, 10, 12, 31 und 36 in nicht-codierende Regionen der DNA, so führt dies vermutlich über eine Veränderung auf RNA-Ebene (*toxic gain of function*) zur konsekutiv reduzierten Translation des Proteins (Zhang und Ashizawa, 2017; Klockgether *et al.*, 2019). Möglicherweise kommt es durch eine Akkumulation des Transkripts zur Apoptose von Neuronen und damit zur Erkrankung (Sullivan *et al.*, 2019). Intranukleäre Einschlusskörperchen wurden in Purkinjezellen des Kleinhirns sowie in pontinen Neuronen von Erkrankten gefunden. Diese finden sich lediglich bei SCAs mit Polyglutaminexpansion (Durr, 2010).

1.4.5 Konventionelle Varianten

Eine weitere Ursache für die Entstehung von SCAs sind seltene konventionelle Varianten (Non-Repeatexpansionen) in unterschiedlichen Genen (Nolte und Müller, 2006; Klockgether *et al.*, 2019). Dazu gehören Einzelnukleotid-Varianten, Deletionen und kurze Insertionen (van de Warrenburg *et al.*, 2014; Sullivan *et al.*, 2019). Diese Erkrankungen verlaufen häufig nicht so schwerwiegend und sind meist mit einer höheren Lebenserwartung assoziiert, im Gegensatz zu Patienten mit Polyglutaminexpansion (Durr, 2010; Paulson *et al.*, 2017). Allerdings haben Patienten mit durch Einzelnukleotid-Varianten ausgelösten SCAs durchschnittlich einen früheren Krankheitsbeginn. Zusammen mit der höheren Lebenserwartung ergibt sich daraus eine längere Morbiditätsdauer (Durr, 2010).

Anhand verschiedener Kriterien können Varianten gemäß ACMG-Richtlinie in die fünf Klassen benigne, wahrscheinlich benigne, Variante unklarer Signifikanz (VUS), wahrscheinlich pathogen und pathogen eingeteilt werden (Richards *et al.*, 2015). Eine Mutation ist definiert als dauerhafte Änderung der Nukleotidsequenz, wohingegen eine Variante mit einer Frequenz $> 1\%$ in einer Population als Polymorphismus bezeichnet wird. Der Begriff „Variante“ umfasst sowohl Polymorphismen als auch Mutationen (Richards *et al.*, 2015). Auf die Begriffe „Polymorphismus“ und „Mutation“ wird in dieser Arbeit aufgrund des missverständlichen Charakters, der negativen Konnotation des Begriffs „Mutation“ für Patienten (Condit *et al.*, 2002; Cotton, 2002) sowie der Empfehlung der ACMG-Richtlinie (Richards *et al.*, 2015) und der HGVS (den Dunnen *et al.*, 2016) weitgehend verzichtet.

Tabelle 1.1 | Autosomal-dominante spinocerebelläre Ataxien

Ataxie	OMIM [®] (Nummer)	Betroffenes Gen/ Locus	Erkrankungsbeginn in Jahren	Mechanismus der Variante
SCA1	164400	<i>ATXN1</i>	4–74	CAG-Expansion
SCA2	183090	<i>ATXN2</i>	1–65	CAG-Expansion
SCA3	109150	<i>ATXN3</i>	5–70	CAG-Expansion
(SCA4)	600223	16q22.1	19–59	-
SCA5	600224	<i>SPTBN2</i>	10–68	SNV, <i>in-frame</i> Deletion
SCA6	183086	<i>CACNA1A</i>	30–71	CAG-Expansion
SCA7	164500	<i>ATXN7</i>	0–70	CAG-Expansion
SCA8	608768	<i>ATXN8</i> <i>ATXN8OS</i>	1–73	CAG/ CTG-Expansion (untranslatiert)
(SCA9)	612876	-	-	-
SCA10	60516	<i>ATXN10</i>	26–45	ATTCT-Expansion (untranslatiert)

SCA11	604432	<i>TTBK2</i>	15–43	SNV, Deletion (<i>Frameshift</i>)
SCA12	604326	<i>PPP2R2B</i>	8–55	CAG-Expansion (untranslatiert)
SCA13	605259	<i>KCNC3</i>	0–60	SNV
SCA14	605361	<i>PRKCG</i>	3–70	SNV, Deletion
SCA15/16 ¹	606658	<i>ITPR1</i>	7–66	SNV, Deletion
SCA17	607137	<i>TBP</i>	6–48	CAG/ CAA-Expansion
(SCA18) ²	607458	<i>IFRD1</i>	10-29	SNV ²
SCA19/22	607346	<i>KCND3</i>	11–45	SNV, Deletion
(SCA20) ³	608687	<i>11q12</i>	19-64	<i>Copy Number Variation</i>
SCA21	607454	<i>TMEM240</i>	1–30	SNV
SCA23	610245	<i>PDYN</i>	43–73	SNV
(SCA25)	608703	<i>2p21-p13</i>	-	-
SCA26	609306	<i>EEF2</i>	26–60	SNV
SCA27	609307	<i>FGF14</i>	27–40	SNV
SCA28	610246	<i>AFG3L2</i>	3–60	SNV
SCA29	117360	<i>ITPR1</i>	kongenital	SNV
(SCA30)	613371	<i>4q34.3-q35.1</i>	45-76	-
SCA31 ⁴	117210	<i>BEAN1</i>	30–80	TGGAA-Expansion
(SCA32)	613909	<i>7q32-q33</i>	breit	-
SCA34	133190	<i>ELOVL4</i>	30–50	SNV
SCA35	613908	<i>TGM6</i>	40–48	SNV
SCA36	614153	<i>NOP56</i>	43–58	GGCCTG-Expansion
SCA37	615945	<i>DAB1</i>	38-64	ATTTC-Expansion
SCA38	615957	<i>ELOVL5</i>	34–51	SNV
(SCA39)	-	<i>11q21</i>	-	-
SCA40	616053	<i>CCDC88C</i>	42–43	SNV
SCA41	616410	<i>TRPC3</i>	38	SNV
SCA42	616795	<i>CACNA1G</i>	9–78	SNV
SCA43	617018	<i>MME</i>	58	SNV
SCA44	617691	<i>GRM1</i>	20-50	SNV
SCA45	617769	<i>FAT2</i>	> 40	SNV
SCA46	617770	<i>PLD3</i>	35-70	SNV
SCA47	617931	<i>PUM1</i>	30-40	SNV
SCA48	618093	<i>STUB1</i>	42	<i>Frameshift Variante</i>
DRPLA ⁵	125370	<i>ATNI</i>	0–62	CAG-Expansion

Tabelle modifiziert nach Online Mendelian Inheritance in Man: www.omim.org (Amberger *et al.*, 2019) und www.neuromuscular.wustl.edu/ataxia/domatax.html, abgerufen am 21.01.2022 um 22:41 Uhr; Hekman *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014; Schüle und Schöls, 2017; Genis *et al.*, 2018; Bird, 2019; Ishikawa und Nagai, 2019; Sullivan *et al.*, 2019; Klockgether *et al.*, 2019; Müller, 2021. Gene und Varianten für SCA4, SCA9, SCA18, SCA20, SCA25, SCA30, SCA32 und SCA39 nicht abschließend geklärt. SCA24 und SCA33 bisher nicht beschrieben.

¹ SCA15 und SCA16 waren zunächst als singuläre Entitäten beschrieben worden.

² SNV in *IFRD1* vermutlich ursächlich für SCA18.

³ 260 kb große Duplikation auf Chromosom 11q12.

⁴ Varianten in *BEAN1* sind wahrscheinlich ursächlich für SCA31, Varianten in *PLEKHG4* nur assoziiert.

⁵ DRPLA, Dentatorubrale-pallidolysiale Atrophie. Aufgrund klinischer Merkmale als SCA klassifiziert.

1.5 Diagnose der hereditären Ataxien

Um der Vielzahl an Ursachen für Ataxien gerecht zu werden, hat sich in der Diagnostik ein schrittweises Vorgehen etabliert. Die Diagnose der hereditären Ataxien setzt sich aus ausführlicher (Familien-)anamnese, körperlicher Untersuchung, bildgebenden Verfahren des zentralen Nervensystems (*Neuroimaging*) wie die kraniale Magnetresonanztomographie (cMRT) zum Ausschluss struktureller Defekte, sowie molekulargenetischer Testung zusammen (van de Warrenburg *et al.*, 2014; Klockgether *et al.*, 2019). Eine molekulargenetische Testung sollte erfolgen, wenn eine progressive Ataxie besteht, nicht-genetische Ursachen unwahrscheinlich sind und der Hinweis auf ähnliche Störungen in der Familie besteht. Durch spezifische Symptome, erhöhte regionale Prävalenz einer spezifischen Variante oder bei Kenntnis eines familiären Genotyps kann die Anzahl der möglichen genetischen Ursachen, respektive der Testungen, verkleinert werden. Einige Symptomenkomplexe sind für eine bestimmte SCA charakteristisch und erhöhen die Wahrscheinlichkeit eines positiven Testergebnisses auf diese spezifische Erkrankung (Klockgether, Mariotti und Paulson, 2019). Falls ein Eingrenzen nicht möglich ist oder ein spezifischer Test negativ ausfällt, sollte zunächst auf die häufigen SCA 1, 2, 3, 6, 7, 17 und DRPLA molekulargenetisch getestet werden (van de Warrenburg *et al.*, 2014; Klockgether *et al.*, 2019). Bei weiterhin negativen Ergebnissen können seltenere SNVs mittels Ataxie-Panels durch *Next-Generation-Sequencing* (NGS) in einer Untersuchung gemeinsam überprüft werden. Dies erhöht die Effizienz der molekulargenetischen Diagnosestellung (Németh *et al.*, 2013; Bird, 2019). *Whole-Exome-Sequencing* (WES), also die Sequenzierung aller proteincodierenden Regionen der Gene eines Genoms (Exom), kann ggf. kosteneffektiv eingesetzt werden (Tipton *et al.*, 2017). Trotz der großen Anzahl an bekannten pathogenen Varianten in differenten Genen verbleibt ein erheblicher Anteil an Patienten ohne (genetische) Diagnose (Schüle und Schöls, 2017).

1.6 Therapie der spinocerebellären Ataxien

Momentan existiert keine kurative Therapie für SCAs (Klockgether *et al.*, 2019; Brooker *et al.*, 2021). Dafür sind regelmäßige Physio- und Ergotherapie sowie Logopädie wichtige therapeutische Komponenten, um Symptome zu lindern und Patienten zu einem besseren Zurechtkommen im Alltag zu verhelfen (Ilg *et al.*, 2014; Klockgether *et al.*, 2018; Zesiewicz *et al.*, 2018). Je nach Begleitsymptomen können differente symptomatische Therapien additiv angeboten werden (Vogel *et al.*, 2015;

Klockgether *et al.*, 2018). Diese erfolgen nach den jeweiligen Leitlinien und werden hier nicht näher erörtert.

In mehreren Studien wurde der Effekt einer pharmakologischen Therapie mit unterschiedlichen Substanzen wie Riluzol (Ristori *et al.*, 2010; Romano *et al.*, 2015) oder Acetyl-DL-Leucin (Feil *et al.*, 2021) untersucht. Hinsichtlich der Wirksamkeit blieben die Ergebnisse zum Teil widersprüchlich oder zeigten im Vergleich zum Placebo keinen Effekt (Romano *et al.*, 2015; Klockgether *et al.*, 2018; Zesiewicz *et al.*, 2018; Feil *et al.*, 2021). Aufgrund der Heterogenität der Patienten mit cerebellärer Ataxie in den Studienpopulationen (Schweregrad und Unterform der Erkrankung) erscheint es schwierig, die verschiedenen untersuchten Präparate zu vergleichen (Ilg *et al.*, 2014; Feil *et al.*, 2021). Erfolgsversprechende potentielle Therapieansätze für SCAs, wie Stammzell- und Gentherapie, befinden sich in Forschung und Entwicklung (vgl. 5.8 Ausblick) (Buijsen *et al.*, 2019; Sullivan *et al.*, 2019).

1.7 *ELOVL*-Genfamilie

Beim Menschen bildet *ELOVL* eine Genfamilie aus insgesamt sieben bekannten paralogen Genen (*ELOVL1* bis *ELOVL7*) (Jakobsson, Westerberg und Jacobsson, 2006; Kihara, 2012). Diese paralogen Gene codieren für Elongasen mit Transmembranregionen und einer ELO-Domäne (Deák *et al.*, 2019). Diese Enzyme sind im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert und besitzen eine wichtige Rolle in der Synthese von sehr langen Fettsäuren (*very-long-chain fatty acids* oder VLCFAs) mit je nach Definition über 16 bis 22 Kohlenstoff-Atomen (Kihara, 2012; Di Gregorio *et al.*, 2014). Die Fettsäure-Synthase kann Fettsäuren lediglich bis zu einer Länge von 16 Kohlenstoffatomen (Palmitinsäure - C16:0) herstellen. Allerdings werden für einige Zellfunktionen deutlich längere Fettsäuren benötigt, die zellulär durch unterschiedliche *ELOVL*-Enzyme synthetisiert werden können (Jakobsson, Westerberg und Jacobsson, 2006). Ein Teil der durch den Fettsäure-Synthase-Komplex *de novo* gebildeten und durch die Nahrung aufgenommenen Fettsäuren wird durch einen vier Schritte umfassenden Prozess zu VLCFAs um je zwei Kohlenstoffatome pro Elongationszyklus verlängert (Mueller *et al.*, 2019). Dabei sind besonders die durch *ELOVL*-Gene codierten Enzyme essenziell, da sie die erste, geschwindigkeitsbestimmende Reaktion katalysieren (Jakobsson, Westerberg und Jacobsson, 2006; Kihara, 2012).

Fettsäuren können mit ihrem Lipidnamen angegeben werden. Daraus lassen sich die Anzahl der Kohlenstoffatome C, die Anzahl der Doppelbindungen und deren Lokalisation von der Carboxygruppe (ω -x) ableiten (Kihara, 2012; Liebisch *et al.*, 2020). Einer Konvention folgend, ist mit *ELOVL1* das humane Gen, mit *Elov1l* das Gen von Säugetieren (exklusive des Menschen) und mit *elov1l* das Gen von Nicht-Säugetieren gemeint. ELOVL1 hingegen bezeichnet das Protein (Deák *et al.*, 2019). Das Akronym „ELOVL“ steht für „*elongation of very long chain fatty acids*“, *ELOVL1* ist die Abkürzung für das Gen *ELOVL fatty acid elongase 1* (HGNC, Tweedie *et al.*, 2021). Der vollständige Name des Proteins ELOVL1 ist „Elongation of very long chain fatty acids protein 1“.

1.7.1 *ELOVL4* und SCA34

Eine Assoziation zwischen einer heterozygoten *Missense*-Variante in *ELOVL4* und dem phänotypischen Auftreten einer autosomal-dominant vererbten spinocerebellären Ataxie mit Erythrokeratodermia variabilis (EKV) wurde in einer großen französisch-kanadischen Familie gezeigt (Cadieux-Dion *et al.*, 2014). Erythrokeratodermie ist mit Erythemen und Hyperkeratosen (verstärkte Verhornung) vergesellschaftet (Bourque *et al.*, 2018). SCA34 führt zu einer langsam progredienten Gangataxie, die als Kardinalsymptom gilt (Ozaki *et al.*, 2015). Bei einigen Patienten zeigte sich eine cerebelläre und pontine Atrophie in der cMRT (Cadieux-Dion *et al.*, 2014; Bourassa *et al.*, 2015; Ozaki *et al.*, 2015; Bourque *et al.*, 2018) und in der Autopsie (Ozaki *et al.*, 2021). Weitere vier Varianten in *ELOVL4* wurden nachgewiesen, die ebenfalls SCA34 verursachen. Allerdings ist eine der beschriebenen Varianten nicht mit EKV assoziiert (Bourassa *et al.*, 2015; Ozaki *et al.*, 2015; Bourque *et al.*, 2018). Alle fünf Varianten sind *Missense*-Varianten, die während der Translation zum Austausch einer einzelnen Aminosäure in ELOVL4 (vgl. Abbildung 1.2) führen (Cadieux-Dion *et al.*, 2014; Bourassa *et al.*, 2015; Ozaki *et al.*, 2015, 2021). Einige Aminosäure-Substitutionen liegen in hoch konservierten Bereichen innerhalb orthologer ELOVL4-Proteine, wie der Vergleich mit verschiedenen Vertebraten zeigt (Cadieux-Dion *et al.*, 2014; Ozaki *et al.*, 2015). Der molekulare Pathomechanismus ist nicht genau bekannt (Hoxha *et al.*, 2017; Ozaki *et al.*, 2021).

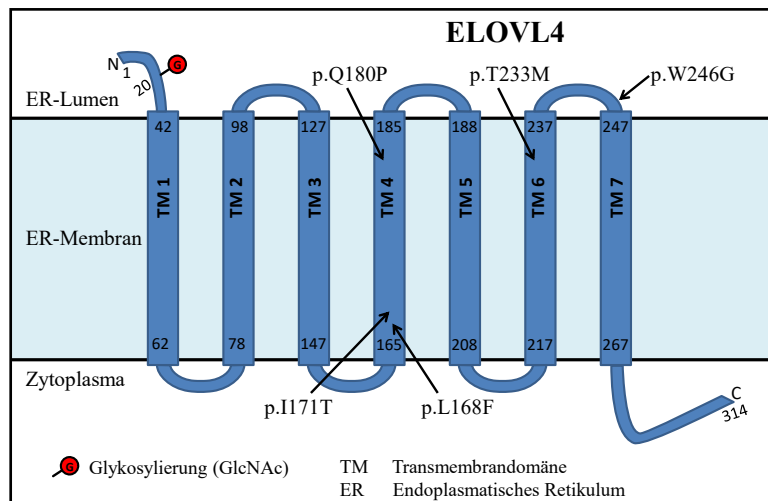


Abbildung 1.2 | **Schematische Darstellung der Sekundärstruktur von ELOVL4 und Lokalisation pathogener Varianten für SCA34.** Abb. modifiziert nach Ozaki et al., 2015, 2021. Daten zur Topologie: www.uniprot.org/uniprot/Q9GZR5 (abgerufen am 21.01.2022 16:08 Uhr).

Ein weiteres seltenes Syndrom, welches durch pathogene Varianten in *ELOVL4* verursacht wird, besteht aus den Symptomen Ichthyose, spastische Quadriplegie und mentale Retardierung (ISQMR) (Bourque *et al.*, 2018; Diociaiuti *et al.*, 2021). Dieses Syndrom könnte auch eine deutlich schwerwiegendere Form der SCA34 darstellen, denn die Symptomatik dieser Erkrankungen überschneidet sich (Bourassa *et al.*, 2015). Andere Varianten in *ELOVL4* führen zu einer seltenen Form der juvenilen Makuladystrophie mit zentralem Sehverlust (M. Stargardt Typ 3) (Donato *et al.*, 2018).

1.7.2 *ELOVL5* und SCA38

SCA38 wird durch *Missense*-Varianten in *ELOVL5* ausgelöst (Di Gregorio *et al.*, 2014). Die Varianten c.214C>G (L72V) und c.689G>T (G230V) fallen in codierende Bereiche von *ELOVL5*, die innerhalb orthologer Gene verschiedener Vertebraten einschließlich des Menschen konserviert sind (Di Gregorio *et al.*, 2014; Ozaki *et al.*, 2015). Beide Varianten liegen in helikalen, transmembranären Abschnitten des ELOVL5-Proteins (vgl. Abbildung 1.3). ELOVL5 besitzt voraussichtlich sieben Transmembranregionen (Ozaki *et al.*, 2015; Bateman *et al.*, 2021).

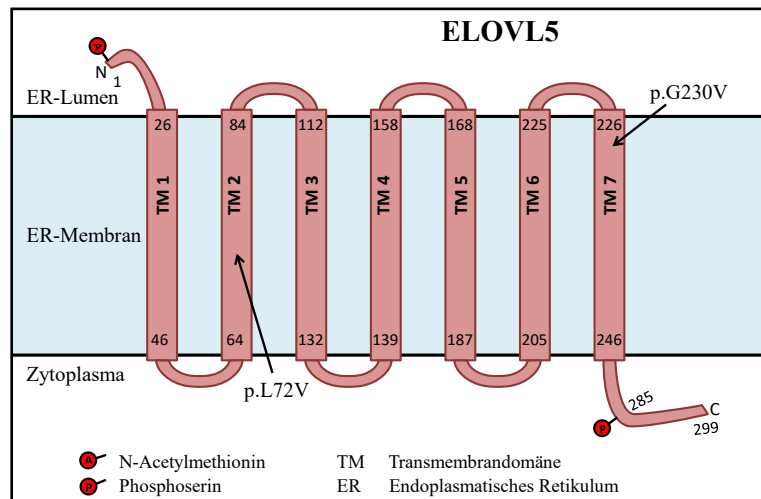


Abbildung 1.3 | **Schematische Darstellung der Sekundärstruktur von ELOVL5 und Lokalisation pathogener Varianten für SCA38.** Abb. modifiziert nach Ozaki *et al.*, 2015. Daten zur Topologie: www.uniprot.org/uniprot/Q9NYP7 (abgerufen am 21.01.2022 15:57 Uhr).

Patienten mit SCA38 erkranken in der Regel ab einem Alter von ungefähr 40 Jahren (Borroni *et al.*, 2016). Klinisch charakteristisch für SCA38 ist die langsame Progredienz der Erkrankung, die bei allen untersuchten Betroffenen mit einer Rumpfataxie und Gangstörung beginnt. Im weiteren Verlauf kommt es bei vielen Patienten zu einem Nystagmus und teilweise zu einem *Pes cavus* (Hohlfuß). Weitere Symptome wie Tremor, Diplopie (Sehen von Doppelbildern) und axonale Neuropathie treten inkonstant auf (Di Gregorio *et al.*, 2014; Borroni *et al.*, 2016). In klinischen Untersuchungen zeigte sich in der cMRT eine milde cerebelläre Atrophie und dazu korrelierend in der funktionellen Positronen-Emissions-Tomographie (PET) eine erniedrigte Metabolisierung von Glucose in den betroffenen Regionen des Cerebellums (Borroni *et al.*, 2016).

Neu entdeckte Varianten in *ELOVL5* könnten das klinische Spektrum der SCA38 erweitern (Borroni *et al.*, 2016). So konnte in einer anderen Untersuchung eine weitere Variante in *ELOVL5* entdeckt werden, die potentiell pathogen sein könnte. Dabei handelt es sich um eine *Nonsense*-Variante (c.304C>T) in Exon 4, die bei der Translation des Proteins zu einem Abbruch der Aminosäurekette führt (Reith, 2017). Exon 4 kommt lediglich in einer von vier Transkriptvarianten vor. Daher wird diese Variante laut einer neueren Untersuchung als benigne eingeschätzt (Brusco, Di Gregorio und Borroni, 2019).

1.7.3 Möglicher Pathomechanismus der SCA38

Zwei Endprodukte der durch *ELOVL5* vermittelten Synthese sind Arachidonsäure (ω 6-Fettsäure) und Docosahexaensäure (ω 3-Fettsäure) (Di Gregorio *et al.*, 2014). Im Tiermodell führte ein Knockout von *Elovl5* zu erniedrigten Serumspiegeln dieser mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Moon, Hammer und Horton, 2009). In einem weiteren Tiermodell an Mäusen mit *Elovl5*-Knockout wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen Varianten in *ELOVL5* und den Symptomen der SCA38 beschrieben, auch wenn sich die beobachteten Symptome der Versuchstiere von den Symptomen der Menschen unterschieden (Hoxha *et al.*, 2017). Dies ist möglicherweise damit zu erklären, dass ein Knockout beider Allele von *Elovl5* durchgeführt wurde. Somit erscheint eine Übertragung vom Tiermodell auf den Menschen, bei dem lediglich ein Allel betroffen ist, schwierig (Hoxha *et al.*, 2017).

ELOVL5-mRNA wird v. a. in Gehirn und Lunge exprimiert. Der Serumspiegel der sehr langen mehrfach ungesättigten Fettsäuren Arachidonsäure und Docosahexaensäure war bei Patienten mit SCA38 signifikant verringert, was auf einen *loss-of-function*-Mechanismus hinweisend sein könnte (Di Gregorio *et al.*, 2014; Hoxha *et al.*, 2017). Durch diesen Mangel an sehr langen ungesättigten Fettsäuren könnte es zu einer reaktiven Erhöhung von Transkriptionsfaktoren, wie dem *sterol regulatory element binding protein 1c* (SREBP-1c) im Sinne eines Feedbackloops, kommen. Dies könnte eine erhöhte Expression von u. a. *ELOVL5* zur Folge haben (Moon, Hammer und Horton, 2009). Tatsächlich konnte bei einigen Patienten ein erhöhter Wert von *ELOVL5*-mRNA in Lymphoblasten nachgewiesen werden (Di Gregorio *et al.*, 2014). Der genaue molekulare Pathomechanismus von SCA38 bleibt weiterhin unsicher (Hoxha *et al.*, 2017; Brusco *et al.*, 2019).

1.7.4 *ELOVL1*-Gen

ELOVL1 (*ELOVL fatty acid elongase 1*) codiert für die ELOVL-Fettsäure Elongase 1 und ist auf Chromosom 1: 43,363,398-43,368,074 in der Region 1p34.2 auf dem Rückwärtsstrang lokalisiert (Abbildung 1.4). Die Transkription erfolgt vom Telomer zum Zentromer. Von insgesamt acht Exons ist Exon 1 nicht-codierend. Exon 2 und 8 sind nur zum Teil codierend und die Exons 3 bis 7 sind vollständig codierend (Cunningham *et al.*, 2022). Die proteincodierenden Transkriptvarianten von *ELOVL1* sind in Abbildung 1.4 neben dem Idiogramm des humanen Chromosoms 1 dargestellt.

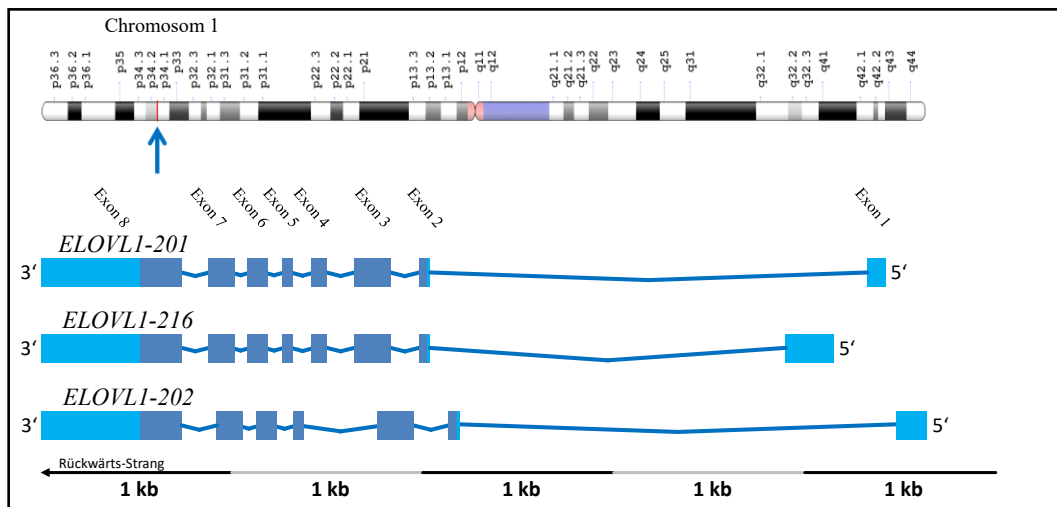


Abbildung 1.4 | Idiogramm des humanen Chromosoms 1 und die proteincodierenden Transkriptvarianten von *ELOVL1*. Abb. modifiziert nach „Genome Decoration Page“ des NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/tools/gdp) und www.ensembl.org - Release 105, Dez. 2021.

Ein komplexes Syndrom aus ichthyosiformer Keratodermie, Hypomyelinisierung zentraler Nervenfasern, spastischer Paraplegie und dysmorphen Gesichtszügen (IKSHD) wird durch eine heterozygote *de-novo*-Variante (rs1570486718) in *ELOVL1* verursacht (Kutkowska-Kaźmierczak *et al.*, 2018; Mueller *et al.*, 2019). Abbildung 1.5 zeigt schematisch die Sekundärstruktur von *ELOVL1* und die Lokalisation des Aminosäureaustausches (p.S165F) innerhalb des Proteins.

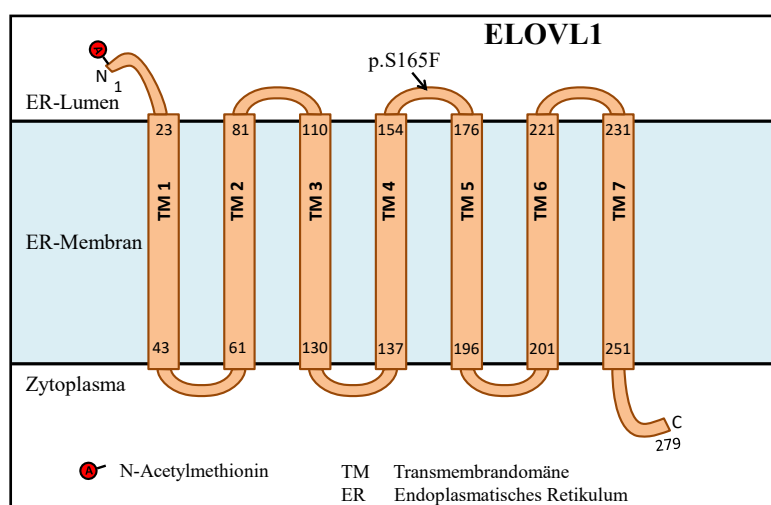


Abbildung 1.5 | Schematische Darstellung der Sekundärstruktur von *ELOVL1* und Lokalisation einer pathogenen Variante für IKSHD. Abb. modifiziert nach Mueller *et al.*, 2019. Daten zur Topologie: www.uniprot.org/uniprot/Q9BW60 (abgerufen am 21.01.2022 16:02 Uhr).

1.7.5 Transkriptvarianten von *ELOVL1*

Von insgesamt 16 verschiedenen Transkriptvarianten von *ELOVL1* sind drei proteincodierend (s. Tabelle 1.2). Sowohl *ELOVL1-201* als auch *ELOVL1-216* codieren für ein gleich großes Protein mit einer Länge von 279 Aminosäuren. *ELOVL1-202* codiert hingegen für ein Protein, das aus lediglich 252 Aminosäuren und einem drei Nukleotide längerem Exon 8 besteht. Aufgrund alternativem Spleißen fehlt Exon 4 diesem Transkript (vgl. Abbildung 1.4). 13 Transkriptvarianten codieren für *long non-coding* RNA (lncRNA) (Cunningham *et al.*, 2022). lncRNAs sind über 200 Nukleotide umfassende, nicht proteincodierende RNA-Abschnitte (Quinn und Chang, 2016; Ransohoff, Wei und Khavari, 2018). Als Funktionen werden die dreidimensionale Organisation des Nukleus, die Regulation der Genexpression sowie die Modulation von Proteinen und Interaktion der Nukleinsäuren angenommen (Ransohoff, Wei und Khavari, 2018). Varianten in lncRNA können zu zahlreichen Krankheiten führen. Viele Funktionen sind unklar (Quinn und Chang, 2016).

Tabelle 1.2 | Transkriptvarianten von *ELOVL1*

Transkriptvariante	Größe des Produktes in bp	Protein	Biotyp
<i>ELOVL1-201</i>	1466	279 Aminosäuren	proteincodierend
<i>ELOVL1-202</i>	1451	252 Aminosäuren	proteincodierend
<i>ELOVL1-203</i>	1034	Kein Protein	lncRNA
<i>ELOVL1-204</i>	726	Kein Protein	lncRNA
<i>ELOVL1-205</i>	797	Kein Protein	lncRNA
<i>ELOVL1-206</i>	1215	Kein Protein	lncRNA
<i>ELOVL1-207</i>	867	Kein Protein	lncRNA
<i>ELOVL1-208</i>	564	Kein Protein	lncRNA
<i>ELOVL1-209</i>	646	Kein Protein	lncRNA
<i>ELOVL1-210</i>	417	Kein Protein	lncRNA
<i>ELOVL1-211</i>	984	Kein Protein	lncRNA
<i>ELOVL1-212</i>	828	Kein Protein	lncRNA
<i>ELOVL1-213</i>	779	Kein Protein	lncRNA
<i>ELOVL1-214</i>	973	Kein Protein	lncRNA
<i>ELOVL1-215</i>	830	Kein Protein	lncRNA
<i>ELOVL1-216</i>	1625	279 Aminosäuren	proteincodierend

Tab. modifiziert nach Cunningham *et al.*, 2022 (www.ensembl.org, Release 105).

1.7.6 *ELOVL1*-Protein

ELOVL1 codiert für ein Protein (Elongation of very long chain fatty acids protein 1), welches als membranständiges Enzym im endoplasmatischen Retikulum den ersten, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Fettsäure-Elongation katalysiert (Ohno *et al.*, 2010; Mueller *et al.*, 2019). Der Fettsäure-Elongationszyklus besteht aus insgesamt vier Schritten. Der Kondensation von Acyl-CoA mit Malonyl-CoA zu β -Ketoacyl-CoA

durch ELOVL-Enzyme folgen drei Schritte, die durch zwei Dehydratasen und eine Reduktase katalysiert werden. Im nächsten Zyklus beginnt die fakultative Verlängerung der Fettsäure um zwei weitere Kohlenstoffatome erneut durch ELOVL (Jakobsson, Westerberg und Jacobsson, 2006; Kihara, 2012; Schackmann *et al.*, 2015). Ein auf Grundlage von Röntgenuntersuchungen zur Kristallstruktur von ELOVL7 (Nie *et al.*, 2021) beruhendes und berechnetes Modell von ELOVL1 zeigt Abbildung 1.6. Sieben α -Helices fungieren vermutlich als Transmembrandomänen. Je zwei ELOVL1-Proteine mit sieben α -Helices lagern sich zu einem Homodimer zusammen (Waterhouse *et al.*, 2018).

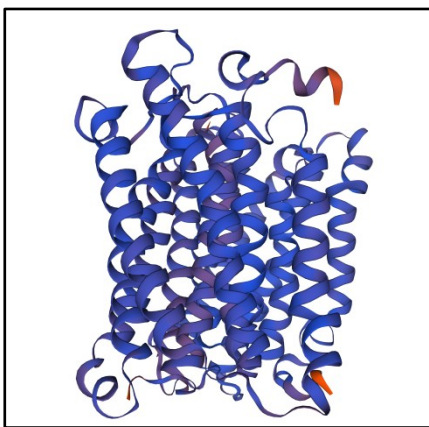


Abbildung 1.6 | **Berechnete Quartärstruktur von ELOVL1 auf Grundlage von Röntgenuntersuchungen zur Kristallstruktur von ELOVL7.** Abb. erzeugt am 15.02.2022 um 15:02 Uhr unter: www.swissmodel.expasy.org/interactive/StJaG/models (Waterhouse *et al.*, 2018; Nie *et al.*, 2021).

1.8 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob ein potentieller kausaler Zusammenhang zwischen SNVs in *ELOVL1* und einer autosomal-dominant vererbten SCA besteht. Dafür wurden in einer retrospektiven Testung 64 vorselektionierte DNA-Proben von Patienten im Alter von 28-81 Jahren mit klinischen Symptomen einer SCA und dem Hinweis auf einen autosomal-dominanten Erbgang untersucht. Zuvor wurden Ursachen anderer häufiger SCAs (vgl. 4.1 Patientenkollektiv) ausgeschlossen. Jede DNA-Probe wurde in allen codierenden und nicht-codierenden Exons sowie den angrenzenden intronischen Bereichen von *ELOVL1* untersucht.

Ein weiteres Ziel bestand darin, die Expression von unterschiedlichen *ELOVL1*-Transkripten in verschiedenen humanen Geweben mittels Synthese von cDNA aus RNA zu untersuchen und zu vergleichen. Dafür wurde die RNA unterschiedlicher Gewebe zunächst in cDNA umgeschrieben und teilweise sequenziert.

2. Material

In den folgenden Tabellen sind alle in dieser Untersuchung genutzten Materialien wie Chemikalien und Enzyme, Kits, technische Geräte und Computer-Programme sowie deren Bezeichnungen und Hersteller aufgelistet.

2.1 Chemikalien und Enzyme

Tabelle 2.1 | Chemikalien/ Enzyme

Chemikalie/Enzym	Bezeichnung/ Packungsgröße	Hersteller/ Firma
10×PCR Puffer/Gel-Ladepuffer	CoralLoad PCR Buffer; 1,2 ml	Qiagen GmbH, Hilden
100 bp Standard DNA-Marker *	FastGene MWD100; 50 µg/500 µl	NIPPON Genetics Europe GmbH, Düren
Agarose	Agarose Basic; 500 g	AppliChem GmbH, Darmstadt
Borsäure (H ₃ BO ₃)	EMSURE Borsäure; 1 kg	Merck KGaA, Darmstadt
Desoxynukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Deoxynucleotide Triphosphates (dNTPs)	Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA
Dextran-Epichlorhydrin-Copolymer	Sephadex G-50 Superfine; 100 g	GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Schweden
DNA-Fluoreszenzfarbstoff	Midori Green Advance DNA Stain; 1 ml	NIPPON Genetics Europe GmbH, Düren
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈)	Calbiochem EDTA Lösung, 0,5 M, pH=8,0	Merck KGaA, Darmstadt
Formamid (CH ₃ NO)	HiDi Formamide; 25 ml	Life Technologies Ltd., Warrington, Großbritannien
Kathodenpuffer (Laufpuffer)	SeqStudio Genetic Analyzer Cathode Buffer Container	Life Technologies Corporation, Bedford, Massachusetts, USA
Taq-DNA-Polymerase	Taq-DNA-Polymerase; 5 units/µl	Qiagen GmbH, Hilden
Trimethylammoniumacetat, (Betain, C ₅ H ₁₁ NO ₂)	Q-Solution; 1,5 ml	Qiagen GmbH, Hilden
Trishydroxymethylamino-methan (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	TRIS Pufferan; 1 kg	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Wasser (H ₂ O), nukleasefrei	Nuclease Free Water; 50 ml	Qiagen GmbH, Hilden

* Fragmentgrößen in bp: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.500, 3.000

2.2 RNA-Isolation und cDNA-Synthese: Chemikalien und Kits

Tabelle 2.2 | Chemikalien und Enzyme für die RNA-Isolation und cDNA-Synthese

Chemikalie/Enzym	Bezeichnung/ Packungsgröße	Hersteller/ Firma
5×Puffer	5×First Strand Buffer: 250 mM Tris-HCl (pH=8,3 bei RT), 375 mM KCl, 15 mM MgCl ₂	Life Technologies Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA

Desoxynukleotide (2'-Desoxynukleosid-5'- Triphosphate) (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	dNTP Mix; je 10 mM; 0,6 mM Tris-HCl (pH=7,5); 1 ml	Life Technologies Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA
Dithiotreitol (C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂)	0,1 M DTT; 500 µl	Life Technologies Corporation, Eugene, Oregon, USA
Gel-Ladepuffer	Blue Loading Buffer 6× (Bromphenolblau + Xylencyanol), 1 ml	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Random Oligonukleotid- Primer	Random Primer 300 µg (3 µg/µl)	Life Technologies Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA
Reverse Transkriptase (RT)	Super Script III; 200 U/µl; 10000 U	
Ribonuklease Inhibitor	RNaseOUT Recombinant RNase Inhibitor; 40 units/µl; 5000 U	Life Technologies Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA
Wasser (H ₂ O), nukleasefrei	Exiqon Nuclease free water; 1 ml	Exiqon A/S, Vedbaek, Dänemark

2.3 Kits

Tabelle 2.3 | **Verwendete Kits**

Kit	Bezeichnung	Hersteller/ Firma
DNA-Extraktion aus Blut	QIAamp DNA Blood Mini	Qiagen GmbH, Hilden
DNA-Gelextraktionskit	Monarch® DNA Gel Extraction Kit	New England BioLabs Inc., Ipswich, Massachusetts, USA
PCR-Produkt Aufreinigungskit	ExoSAP-IT; 500 Reaktionen, 1 ml	USB Products, Affymetrix Inc., Cleveland, Ohio USA
RNA-Isolationskit aus Vollblut	PAXgene Blood RNA Kit v2	PreAnalytiX GmbH, Hombrechtikon, Schweiz
Sequenzierkit	Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100	Applied Biosystems Inc., Austin, Texas, USA
Sequenzierpuffer	Big Dye Terminator v3.1, 5×Sequencing Buffer; 1 ml	Applied Biosystems Ltd., Warrington, Großbritannien

2.4 Geräte und Verbrauchsartikel

Tabelle 2.4 | **Geräte und Verbrauchsartikel**

Gerät/ Verbrauchsartikel	Typ/Spezifikation	Hersteller/ Vertrieb
Becherglas	TGI Ilmabor, 200 ml	Technische Glaswerke Ilmenau GmbH, Ilmenau
Deep Well Plate 3×8	Thermo-Fast 24 Well 0,2 ml	Thermo Scientific - ABgene Ltd., Altrincham, Großbritannien
Digitaler, monochromer Drucker	P93DW	Mitsubishi Electric SDN. BHD., Senai, Malaysia

Material

Elektrophorese Kamm	6 Well 1,5 mm	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
	12 Well 1,5 mm	
Elektrophorese Netzteil (Spannungsquelle)	2297 Macrodrive 5	LKB AB, Bromma, Schweden
Elutionsplatte/ 96-Well-Mikrotiterplatte	Mikrotest Plate 96 Well, Round bottom	Sarstedt Inc., Newton, North Carolina, USA
Erlenmeyerkolben	Duran Erlenmeyerkolben, 200 ml	Schott AG, Mainz
Filterplatte	MultiScreen-HV (MAHVN45), 96 Well	Merck Millipore Ltd., Tullagreen, Irland
Geldokumentationssystem	Gel iX 20 Imager mit UV-Transilluminator (UST20M-8KE)	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Horizontale Elektrophorese Kammer	Perfect Blue, Model 40-0708	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Kühl-/ Gefrierkombination	KGV36VW32	Robert Bosch GmbH, Stuttgart
Laborglasflasche	Duran GL45, 100 ml	Schott AG, Mainz
Messzylinder	50 ml	Vitlab GmbH, Großostheim
Mikroreaktionsgefäß (Tube)	Safe-Lock Tubes, 0,5 /1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Mikroreaktionsgefäß PCR Streifen	Multiply-µStrip Pro, 8×0,2 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Mikrowellenherd	R-6000E	Sharp Corporation, Osaka, Japan
Mini-Zentrifuge	Galaxy Mini Star	VWR International GmbH, Darmstadt
Nano Photometer	NP80	Implen GmbH, München
PCR-Aufbewahrungsgestell	Axygen R-96-PCR-FY	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Pipette	Reference 10 µl, 20 µl	Eppendorf AG, Hamburg
	Research 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
	Pipetman 100 µl, 200 µl	Gilson Inc., Middleton, Wisconsin, USA
	Pipetman neo 2 µl	Gilson Inc., Middleton, Wisconsin, USA
Pipettenspitze	1000 µl, 100 µl	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
	premium surface 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Nerbe Plus GmbH, Winsen
	Biosphere Filter Tips 2,5 µl, 20 µl	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Präzisions-Waage	PG5002-S DeltaRange	Mettler-Toledo International Inc., Columbus, Ohio, USA
Reaktionsgefäßständer	Mikro Test Tube Rack	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim

Scherbeneiszubereiter (Flake Ice)	RF0244A	Manitowoc Ice Inc., Manitowoc, Wisconsin, USA
Schüttelinkubator	Thermomixer Comfort; Wechselblock 24 × 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Thermocycler	T Personal	Biometra GmbH, Göttingen
Transilluminator	MacroVue UV 25, 230 V	Hoefer Pharmacia Biotech Inc., San Francisco, Kalifornien, USA
Vortex (-mischer)	RS1	IDL GmbH & Co. KG, Nidderau
Zentrifuge	Biofuge pico	Heraeus Holding GmbH, Hanau
	Multifuge 3L-R	

2.5 Sequenzer und Zubehör

Tabelle 2.5 | Sequenzer und Zubehör

Artikel	Bezeichnung	Hersteller/ Vertrieb
Abdeckung für Kathodenpuffer	SeqStudio Reservoir Septa	Life Technologies Holdings Pte. Ltd., Singapur
Abdeckung für optische Platte	SeqStudio Septa 96-well	
Genetisches Analysegerät/ Kapillarelektrophorese	SeqStudio Genetic Analyzer	Life Technologies Holdings Pte. Ltd., Singapur
	ABI Prism 3130xl/ Genetic Analyzer	HITACHI/ Applied Biosystems Inc., Foster City, Kalifornien, USA
<i>Optically clear flat 8 cap strips</i>	Ultra Clear Cap Strips	Thermo Scientific - ABgene Ltd., Altrincham, Großbritannien
Optische Reaktion Platte 96 Well	MicroAmp optical 96-Well Reaction Plate	Life Technologies Holdings Pte. Ltd., Singapur
Sequenzier-Patrone	SeqStudio Genetic Analyzer Cartridge	Life Technologies Holdings Pte. Ltd., Singapur

2.6 DNA-Oligonukleotid-Primer

Tabelle 2.6 | DNA-Oligonukleotid-Primer* (ELOVLI-Gen)

Bezeichnung/ Exon		Länge in nt	Schmelztemperatur (T_m 50 mM NaCl) in °C	Sequenz
Exon 1	Ex1F	17	64,3	5'-TGGGACCCGGCGGCACG-3'
	Ex1R	19	63,6	5'-GGAACACCCTCGCCACAG-3'
	Ex1R2	19	66,1	5'-AGGGAGGGTGCTGGCGAGG-3'
Exon 2-4	Ex2F	21	59,0	5'-CCCTAGTTCCAGTAATTCCT-3'
	Ex4R	20	58,4	5'-ACCATCTGCAAGAAGTTGGG-3'
Exon 5-7	Ex5F	21	56,2	5'-CCCTGAGGCACTTAGGGTAAG-3'
	Ex7R	20	56,2	5'-GGGAGAGATGGGGTCAAAGG-3'
Exon 8	Ex8F	20	50,6	5'-GTCTGTCTCACCTTTGACCC-3'
	Ex8R	18	53,7	5'-CAGCCCTGAGTGCTCCTC-3'

Tabelle 2.7 | DNA-Oligonukleotid-Primer* für PCR und Sequenzierung von cDNA

Bezeichnung	Länge in nt	Schmelztemperatur (T_m 50 mM NaCl) in °C	Sequenz
cEx3F	20	58,4	5'-ACTTCGTTCTCTCACTTGGG-3'
cEx4F	20	58,4	5'-CTGTGACCCTGTGGACTATT-3'
cEx6R	19	61,6	5'-ACCACCAGCTCCAGGGAAG-3'
cEx7R	20	56,4	5'-GTGCTTTTCCACCAAAGGT-3'
cEx8R	20	58,4	5'-GGAGCTCCATTTTGCTGAAG-3'
cInt5R	23	66,6	5'-CTTCTCCACCTCATTCTCCCCTC-3'

*Die Oligonukleotid-Primer wurden von der Firma Microsynth AG, Balgach (Schweiz) hergestellt.

2.7 Nukleotid-Mix

Tabelle 2.8 | Nukleotid-Mix**

Nukleotid	Volumen in µl	Konzentration in mM/µl	Endkonzentration in mM/µl
dATP	5	100	1,25
dCTP	5	100	1,25
dGTP	5	100	1,25
dTTP	5	100	1,25

** Nukleotid-Mix (2'-Desoxynukleosid-5'-Triphosphat) von Promega Corporation, Madison (USA). Der Mix wurde mit 380 µl Tris-HCl (10 mM; pH=7,5) auf 400 µl aufgefüllt.

2.8 Computerprogramme

Tabelle 2.9 | Computerprogramme

Name	Version/ Jahr	Entwickler
FinchTV	1.4.0; 2006	Geospiza Inc., Seattle, Washington, USA
INTAS GelDoc	v.0.2.22 Build December 2017	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
NCBI Primer design tool	Beruhrt auf Primer3 und BLAST; 2019	U.S. National Library of Medicine, Bethesda, Maryland, USA (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/)
SeqScape Software 3	v3.2 Build Id: B01 ©2012	Life Technologies Corporation, Carlsbad, Kalifornien, USA
SeqStudio Plate Manager	1.1.0; 2017	Life Technologies Holdings Pte. Ltd., Singapur

2.9 RNA-Proben

Tabelle 2.10 | Isolierte Gesamt-RNA aus unterschiedlichen Geweben; je 50 µg (1 µg/ µl)

Gewebe	Bezeichnung	Lot#	Cat#	Hersteller/ Firma
Gehirn	Human Brain Total RNA	1103190A	636530	Clontech Laboratories Inc., Mountain View, Kalifornien, USA (Takara Bio)
fetales Gehirn	Human Fetal Brain Total RNA	1401207A	636526	
Fettgewebe	Human Adipose Tissue Total RNA	1706605A	636558	
Leber	Human Liver Total RNA	1109024A	636531	
Niere	Human Kidney Total RNA	9110240A	636529	

3. Methoden

3.1 DNA-Extraktion aus Blut

Je nach Art der zu isolierenden DNA (chromosomale, mitochondriale oder Plasmid-DNA etc.) gibt es optimierte Verfahren für die Extraktion von Nukleinsäuren aus differenten Geweben (Río Bártulos, Tappe und Rothhämel, 2012b). In dieser Untersuchung wurde hochmolekulare chromosomale DNA für die Sequenzierung von *ELOVL1* verwendet, welche aus EDTA-Blut der Patienten gewonnen wurde.

3.1.1 Silikagel basierende Verfahren

Durch Silikagel basierende Verfahren wird hochmolekulare DNA mit bis zu 50 kb großen Fragmenten gewonnen (Qiagen, 2016a). Diese Methode besteht im Wesentlichen aus vier Schritten: Um die DNA aus den Zellen bzw. ihren Zellkernen freizusetzen und von Proteinen wie z. B. Histonen zu befreien, müssen diese zuerst lysiert werden (Ghaheer *et al.*, 2016; Kurreck, Lottspeich und Engels, 2022). Ein Enzym (z. B. Protease K) wird mit Lysepuffer zum Blut gegeben und bei ca. 50 °C im Wasserbad inkubiert. Im zweiten Schritt bindet die freigesetzte DNA durch Zentrifugation an die Silikamembran des Säulenfilters. Dann folgen Waschschrte zum Entfernen von überschüssigen Zellbestandteilen (Griffiths und Chacon-Cortes, 2014). Durch Ethanol im Waschpuffer erfolgt eine Präzipitation (Ausfällung von Proteinen), sodass die DNA von diesen isoliert werden kann (Griffiths und Chacon-Cortes, 2014). Abschließend wird die Nukleinsäure durch Elutionspuffer oder destilliertes Wasser aus der Membran herausgelöst und die eluierte DNA wird in Puffer gelagert (Río Bártulos, Tappe und Rothhämel, 2012b; Qiagen, 2016). Die DNA-Präparation wurde mithilfe des Qiagen-Kits (QIAamp DNA Blood Mini) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.2 Quantifizierung des Nukleinsäure-Gehaltes

Zur Quantifizierung des Nukleinsäure-Gehaltes (DNA, RNA) wird die photometrische Messung bei 260 nm Wellenlänge verwendet (Ghaheer *et al.*, 2016). Die Berechnung der Konzentration der Nukleinsäuren beruht dabei auf dem Lambert-Beerschen Gesetz (Griffiths und Chacon-Cortes, 2014). Nach Messen der Absorption des Elutionspuffers und Kalibrierung kann die Extinktion der Proben mit Nukleinsäure relativ zum Nullwert bestimmt werden. Eine Extinktion von $E_{260} = 1$ entspricht dabei in etwa einem Gehalt von 50 ng/µl dsDNA respektive 40 ng/µl ssRNA. Multipliziert mit dem

Extinktionskoeffizienten ε ($\text{ng} \times \text{cm}/\mu\text{l}$) und dem Verdünnungsfaktor F lässt sich die Konzentration c bestimmen ($c = E_{260} \times \varepsilon \times F$) (Río Bártulos, Tappe und Rothhämel, 2012a; Ghaheri *et al.*, 2016).

Zur Bestimmung bzw. zum Abschätzen der DNA-Reinheit werden alle Absorptionswerte der Wellenlängen von 260 bis 320 nm gemessen. Das gebildete Verhältnis aus den Werten von 260 nm zu 280 nm sowie dem Verhältnis aus 260 nm zu 230 nm wird zur Bestimmung der Reinheit herangezogen (Río Bártulos, Tappe und Rothhämel, 2012a; Implen, 2015). Proteine besitzen aufgrund der aromatischen Aminosäurereste ein Absorptionsmaximum von 280 nm (Kurreck, Lottspeich und Engels, 2022). Peptidbindungen, TRIS- und EDTA-Puffer haben ein Absorptionspeak von 230 nm (Implen, 2015). Die Messung erfolgte an einer Probe von 1 μl auf dem Nanophotometer NP80 der Firma Implen.

3.3 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist ein unverzichtbares Werkzeug in der molekulargenetischen Forschung sowie Diagnostik und wird fortlaufend weiterentwickelt. Sie bietet ein breites Spektrum an Anwendungsmöglichkeiten (Schmidt und Rothhämel, 2012; Green und Sambrook, 2019). Ein Vorteil der PCR besteht darin, äußerst kleine Mengen DNA mittels quasi-exponentieller Vervielfältigung nachweisen und spezifische Abschnitte innerhalb eines Genoms vervielfältigen zu können (vgl. Abbildung 3.2). Theoretisch wäre nur ein einziges DNA-Molekül nötig. Daraus ergibt sich allerdings auch eine Anfälligkeit für Kontaminationen (Kurreck, Lottspeich und Engels, 2022). DNA dient der Polymerase als Vorlage (*Template*). Transkripte aus RNA hingegen müssen zuvor durch eine Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden (s. u.) und können anschließend mittels PCR amplifiziert werden (Schmidt und Rothhämel, 2012).

3.3.1 Komponenten und Reagenzien

Für die Amplifizierung eines DNA-Abschnittes werden essenzielle und ggf. additional Substanzen benötigt. Neben gereinigter DNA als Ausgangsmaterial werden eine hitzestabile Polymerase, Magnesium-Ionen (Mg^{2+}), ein Puffer, Desoxyribonukleotide (dNTP), Vorwärtsprimer (5'-3' Strang) und Rückwärtsprimer (3'-5' Strang) sowie ein variabler Anteil an destilliertem Wasser benötigt (Green und Sambrook, 2019). Zu den Zusatzstoffen zählen bspw. Betain und DMSO (Green und Sambrook, 2019).

3.3.2 DNA-Polymerase

Eine thermostabile, d. h. gegenüber hohen Temperaturen von bis zu 95 °C stabile, DNA-abhängige DNA-Polymerase ist für die PCR unersetzlich (Green und Sambrook, 2019). Diese kann bspw. aus dem thermophilen Organismus *Thermus aquaticus* gentechnisch erzeugt werden und wird kurz als *Taq*-Polymerase bezeichnet (Green und Sambrook, 2019). Thermostabile Polymerasen denaturieren nicht bei Temperaturen, die für die Denaturierung von DNA notwendig sind. Dadurch können in demselben Ansatz mehrere Reaktionszyklen hintereinander durchgeführt werden (Green und Sambrook, 2019). Von der Prozessivität der verwendeten Polymerase hängt die maximal amplifizierbare Länge des DNA-Abschnittes ab (Kurreck, Lottspeich und Engels, 2022). Die in dieser Untersuchung verwendete *Taq*-Polymerase besitzt eine Prozessivität von ca. 2-4 kb/min bei 72 °C (Qiagen - *Taq* DNA Polymerase Kit).

3.3.3 Puffer

Ein Puffer verhindert starke Änderungen des pH-Wertes und damit die Denaturierung der *Taq*-Polymerase. Zusätzlich kann der Puffer Magnesiumionen (Cofaktor der Polymerase) sowie Kaliumchlorid enthalten (Green und Sambrook, 2019; Kurreck, Lottspeich und Engels, 2022).

3.3.4 Oligonukleotid-Primer

Für die PCR werden Oligonukleotid-Primer (kurz Primer) benötigt. Somit kann eine spezifische Stelle amplifiziert werden. Die Polymerase kann neue Nukleotide lediglich an eine freie 3'OH-Gruppe anbauen. Im Gegensatz zum *Cycle Sequencing*, bei dem lediglich ein Primer eingesetzt wird (lineare Zunahme), werden für die PCR zwei Primer verwendet (Kurreck, Lottspeich und Engels, 2022). Daraus resultiert eine quasi-exponentielle Vervielfältigung (2^x) des Amplikons (PCR-Fragment) (vgl. Abbildung 3.2). Je ein Primer für den Vorwärts- bzw. *sense*- und für den Rückwärts- bzw. *antisense*-Strang der DNA kommt zum Einsatz (Lorenz, 2012).

3.3.5 Desoxyribonukleotide

Ein äquimolares Gemisch von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) aus dGTP, dCTP, dATP und dTTP wird dem Ansatz zugesetzt. Die Nukleotide werden durch die Polymerase komplementär zum *Template* an das freie 3'OH-Ende des zuvor angelagerten Oligonukleotid-Primer angeheftet (Green und Sambrook, 2019).

3.3.6 PCR von GC-reichen Abschnitten

GC-reiche Abschnitte besitzen eine höhere Schmelztemperatur (Green und Sambrook, 2019). Hilfsstoffe wie z. B. Betain (2-Trimethylammonioacetat) oder DMSO (Dimethylsulfoxid) können den Ertrag der PCR von GC-reichen Abschnitten steigern (Frackman *et al.*, 1998). Betain verhindert die Ausbildung von Sekundärstrukturen, indem es die Schmelztemperatur (T_m) von GC-reichen Regionen innerhalb der DNA herabsetzt (Henke *et al.*, 1997; Lorenz, 2012).

3.3.7 Schritte der PCR

Folgende Schritte (vgl. Abbildung 3.1) werden vollautomatisiert in einem Thermocycler durchgeführt: Zuerst wird die DNA bei 90-95 °C thermisch denaturiert. Dadurch entsteht einzelsträngige DNA (ssDNA) (Green und Sambrook, 2019). Als Zweites erfolgt die Anlagerung (*Annealing*) der Primer an das *Template*, also die Hybridisierung der Primer an die ssDNA (Green und Sambrook, 2019). Als Drittes schließt sich die Elongation (Extension) des DNA-Produktes an. Bei ca. 72 °C besitzt die *Taq*-Polymerase eine hohe Aktivität und kann dem *Template* komplementäre Nukleotide an freie 3'OH-Gruppen anbauen. Diese drei Schritte werden etwa 25-40 Mal wiederholt, wodurch eine ausreichend hohe Anzahl an Kopien entsteht (Schmidt und Rothhämel, 2012; Green und Sambrook, 2019).

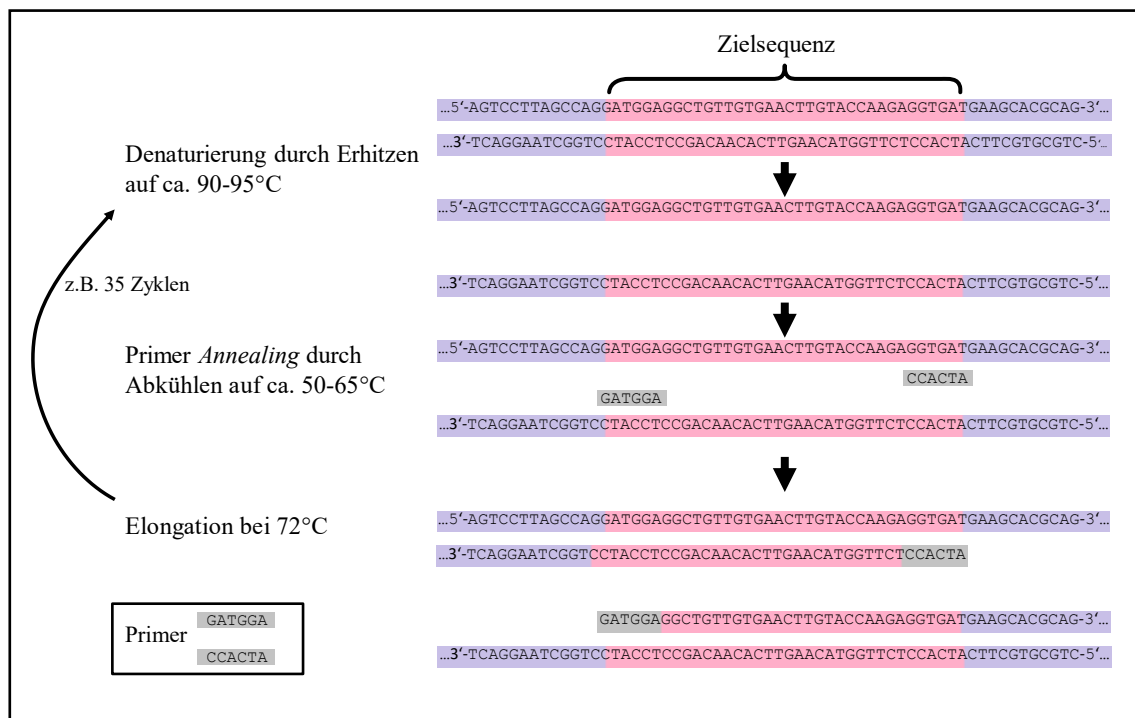


Abbildung 3.1 | **Schritte der PCR** (modifiziert nach Schmidt und Rothhämel, 2012).

3.3.8 Wahl der Primer

Wichtig für die Wahl der Oligonukleotid-Primer sind zum einen die Spezifität und zum anderen die Effizienz der Amplifizierung des DNA-Abschnittes (Dieffenbach, Lowe und Dveksler, 1993). Generell unterschieden werden sequenzspezifische, degenerierte, Oligo(dT)- und *Random* Primer (Kurreck, Lottspeich und Engels, 2022).

Die Spezifität bestimmt, mit welcher Genauigkeit der Primer ausschließlich an die bestimmte Nukleotidabfolge komplementär bindet (Green und Sambrook, 2019). Es gilt zu beachten, dass sequenzspezifische Primer ausreichend lang sein müssen, um beim menschlichen Genom (ca. 3×10^9 bp) an eine einzigartige Sequenz binden zu können (Green und Sambrook, 2019). Mit jedem zusätzlichen Nukleotid wird der Primer vierfach spezifischer. Um *Mispriming* (Fehlpaarung) zu verhindern, sollte die Länge der verwendeten Primer zwischen ca. 18 und 24 Nukleotide betragen (Dieffenbach, Lowe und Dveksler, 1993). Je länger jedoch ein Primer ist, desto geringer wird die Effizienz aus Gründen der Entropie. Ein längerer Primer benötigt mehr Zeit zum Anlagern an das *Template* (Dieffenbach, Lowe und Dveksler, 1993). Die Effizienz ist durch die theoretisch mögliche exponentielle Vervielfachung des Amplikons begrenzt (Dieffenbach, Lowe und Dveksler, 1993).

Die Wahl der passenden Primer hängt von weiteren Faktoren ab: Die Schmelztemperaturen (T_m) der Primer sollten sich lediglich um wenige Grad Celsius ($< 5^\circ\text{C}$) von der Temperatur des *Annealings* unterscheiden (Dieffenbach, Lowe und Dveksler, 1993; Lorenz, 2012). T_m ist direkt von der Länge des Primers abhängig und gibt die Temperatur der Dissoziation von Primer und *Template*-DNA an. Sie sollte bei einer Standard-PCR zwischen $52 - 58^\circ\text{C}$ betragen (Lorenz, 2012). Von Primern mit weniger als 20 nt kann diese mittels folgender Formel geschätzt werden:

$T_m = 4^\circ\text{C} \times (\text{G} + \text{C}) + 2^\circ\text{C} \times (\text{A} + \text{T})$ (Green und Sambrook, 2019). Spezielle Computerprogramme wie das „NCBI Primer design tool“ werden für die T_m -Berechnung von längeren Primern eingesetzt. Diese berücksichtigen thermodynamische Parameter (Lorenz, 2012). Der GC-Gehalt sollte zwischen 40 - 60 % betragen und das Primer-Paar sollte ähnliche Schmelztemperaturen und GC-Gehalte besitzen (Dieffenbach *et al.*, 1993; Green und Sambrook, 2019). Außerdem sollten die paarweise eingesetzten Primer nicht komplementär zueinander sein. Ansonsten könnten sich die Primer zu Dimeren zusammenlagern (Dieffenbach *et al.*, 1993; Green und Sambrook, 2019).

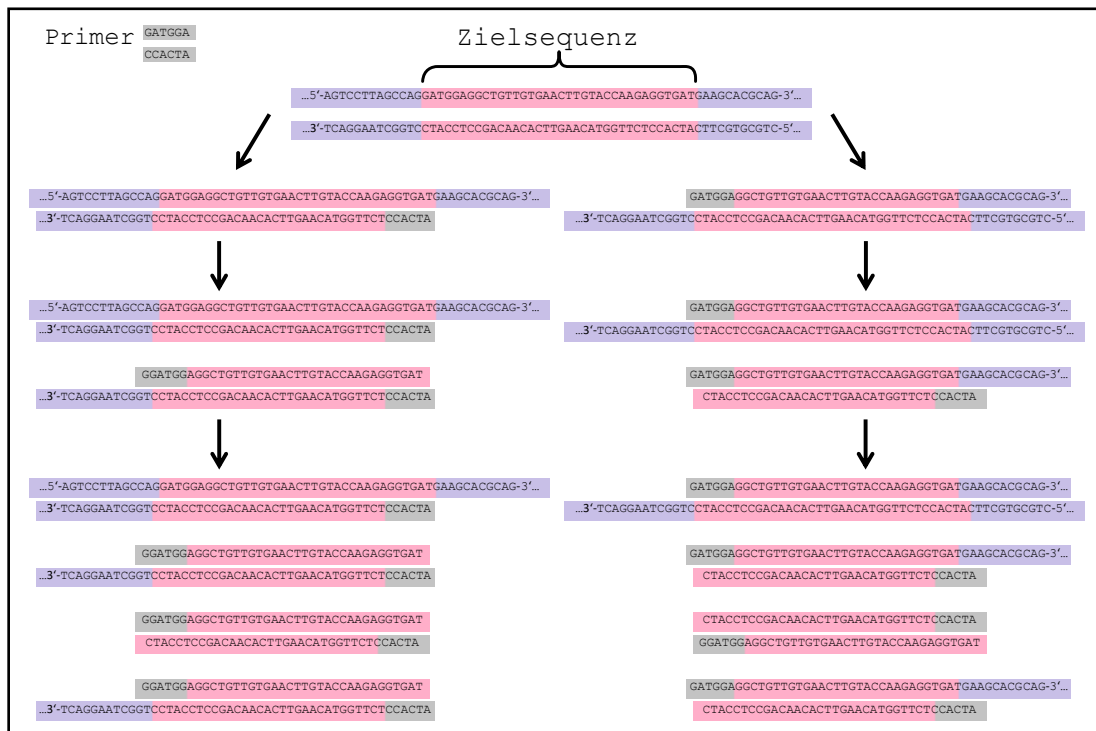


Abbildung 3.2 | Schema der (quasi-)exponentiellen Vervielfachung der PCR (Abb. modifiziert nach Green und Sambrook, 2019).

3.3.9 Primer-Bindungsstellen und Sequenzen

In dieser Untersuchung wurden verschiedene sequenzspezifische Primer verwendet. Abbildung 3.3 zeigt schematisch die Primer-Bindungsstellen an *ELOVL1*. Die dunkelblauen Kästen symbolisieren die translatierten Abschnitte der Exons, wohingegen die hellblauen Kästchen für die untranslatierten Bereiche der Exons (UTR) stehen. Zwischen den Exons befinden sich die Introns (dunkelblaue Linie). Intron 1 ist aus Gründen der Übersichtlichkeit verkürzt dargestellt.

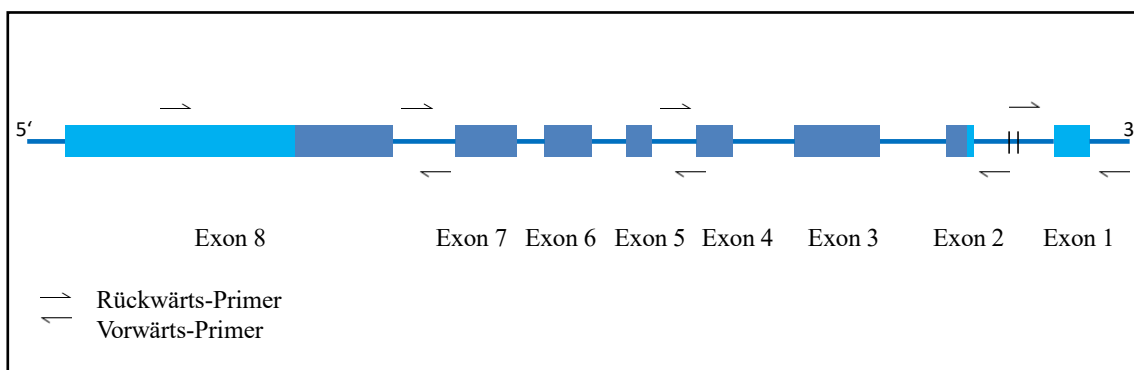


Abbildung 3.3 | Schematische Darstellung der Primer-Bindungsstellen an *ELOVL1*.

3.3.10 Durchführung der PCR des *ELOVL1*-Gens auf DNA-Ebene

Um mittels Sequenzierung die Exons und die angrenzenden intronischen Bereiche von *ELOVL1* möglichst vollständig abzudecken, wurde das Gen in vier Abschnitte (Exon 1, Exons 2-4, Exons 5-7, Exon 8) mit jeweils zwei Primern unterteilt. Dies machte unterschiedliche PCR-Bedingungen notwendig (vgl. Tabelle 3.1 und Tabelle 3.2). Deshalb unterscheiden sich die PCR-Ansätze in ihrer Zusammensetzung (s. Tabelle 3.3). Die Primer wurden so gewählt, dass sie in intronischen Bereichen liegen. Bei allen Programmen wurde eine Deckel-Temperatur von 99 °C gewählt, um ein Kondensieren zu verhindern. Damit entfällt das Hinzufügen von Silikon- oder Mineralöl (Qiagen, 2010).

Tabelle 3.1 | **PCR-Bedingungen**

Arbeitsschritt	Temperatur in °C	Zeit in s
1.) Initiale Denaturierung	95	180
2.) Denaturierung	94	30
3.) <i>Annealing</i>	56-64 (s. Tabelle 3.2)	30
4.) Elongation	72	45
5.) Finale Extension	72	180
6.) Kühlung	15	

 35 Zyklen

Tabelle 3.2 | ***Annealing* Temperaturen**

Bereich	Temperatur in °C
Exon 1	64
Exon 2-2	57
Exon 5-7	60
Exon 8	56

Tabelle 3.3 | Pipettierschema der PCR-Mastermixe

PCR-Ansatz (Mix für je 5 Proben à 40 µl*)	
Exon 1	Exons 2-4, 5-7 und 8
20 µl 10x Puffer (CoralLoad**)	20 µl 10x Puffer (CoralLoad**)
40 µl Nukleotid-Mix (1,25 mM je dNTP)	40 µl Nukleotid-Mix (1,25 mM je dNTP)
40 µl Betain	20 µl Betain
3 µl F-Primer (50 pmol/µl)	3 µl F-Primer (50 pmol/µl)
3 µl R-Primer (50 pmol/µl)	3 µl R-Primer (50 pmol/µl)
2 µl <i>Taq</i> -Polymerase (5 units/µl)	2 µl <i>Taq</i> -Polymerase (5 units/µl)
92 µl H ₂ O	112 µl H ₂ O

*Je 40 µl PCR-Ansatz wurden 1 µl H₂O (Negativ-Kontrolle) bzw. 1 µl DNA [0,8 µl für Exon 5-7] hinzugesetzt.

**enthält MgCl₂ (15 mM/µl), finale Konzentration im Mix: 1,5 mM/µl. Weitere Bestandteile sind: Tris-Cl, KCl, (NH₄)₂SO₄, Gel-Ladepuffer, oranger und roter Farbstoff; pH=8,7 bei 20 °C (Qiagen, 2016b).

3.4 Gelelektrophorese

Mittels Gelelektrophorese lassen sich verschiedene Substanzen anhand ihrer Größe auftrennen (Lee *et al.*, 2012). Zu einem gewissen Grad lässt sich auch eine Größenbestimmung und Quantifizierung anhand des Größenstandards durchführen. Aufgrund der unterschiedlichen Ladung und Größe wandern Biomoleküle in einem Gel mit Poren innerhalb eines elektrischen Feldes unterschiedlich weit. Negativ geladene Moleküle wandern dabei in Richtung Anode (Lee *et al.*, 2012; Kurreck, Lottspeich und Engels, 2022). Das Verhältnis aus Ladung zu Masse bzw. Molekülgröße und -form bestimmt die maximale Geschwindigkeit des Moleküls (Dechert, 2012).

3.4.1 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren auf Agarosegel

Mit einer Agarose-Gelelektrophorese lassen sich DNA-Fragmente zwischen ca. 0,5 und 25 kb Größe auftrennen (Voytas, 2001) und die PCR kontrollieren. Agarose ist ein Polysaccharid aus β-D-Galactose und 3,6-Anhydro-α-L-Galactose, welches in Rotalgen vorkommt (Böttcher und Peter, 2012). Bei der Gelelektrophorese wird neben der Ladung der aufzutrennenden Moleküle (negative Ladung der Phosphatgruppen der Nukleinsäuren bei einem großen pH-Bereich) ein Siebeffekt der Struktur der Agarose im Gel genutzt (Lee *et al.*, 2012). Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt von der Agarosekonzentration, der angelegten Spannung, dem verwendeten Laufpuffer, interkalierenden Substanzen und von der Form der DNA ab (Kurreck, Lottspeich und Engels, 2022).

Je nach Größe der DNA-Moleküle werden unterschiedlich konzentrierte Agarose-Gele mit unterschiedlichen Porengrößen verwendet (Lee *et al.*, 2012). Tabelle 3.4 zeigt Agarosekonzentrationen bei verschiedenen Kettenlängen an. Ein höher konzentriertes Gel besitzt kleinere Maschen (Lee *et al.*, 2012). Ein 1%iges Agarosegel bildet Poren von ca. 150 nm aus, im Gegensatz zu einem 0,16 %iges Gel mit 500 nm großen Poren. Kleinere Moleküle wandern schneller durch die Poren des Gels als größere (Dechert, 2012).

Tabelle 3.4 | Agarosekonzentrationen in Abhängigkeit von der Kettenlänge

Agarosekonzentration in %	Kettenlänge in bp
0,3	5.000-60.000
0,6	1.000-20.000
0,7	800-10.000
0,9	500-7.000
1,2	400-6.000
1,5	200-3.000
2,0	100-2.000

Nach Sambrook *et al.*, 2001; aus Dechert, 2012.

3.4.2 Durchführung der Gelelektrophorese

Für die Herstellung von 40 g eines 1,5%igen Agarose-Gels wurden zuerst 0,6 g Agarose mit 39,4 g 1×TBE-Puffer (vgl. Tabelle 3.5) in einem Erlenmeyerkolben abgewogen und gemischt. In einem Mikrowellenherd wurde das Gemisch vorsichtig aufgekocht und durch leichtes Schwenken gemischt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Starkes Aufkochen wurde vermieden, da sich die Konzentration des Gels durch Wasserverdunstung erhöht. Anschließend wurde das Gel bei Raumtemperatur (RT) auf ca. 50-60 °C abgekühlt. Dann erfolgte das Hinzufügen und Mischen von 0,75 µl des Fluoreszenzfarbstoffes „Midori Green Advanced DNA Stain“ (sekundäre Anregungspeaks bei 270 nm und 290 nm). Dieser Farbstoff lagert sich ähnlich wie Ethidiumbromid an DNA und RNA an und wird unter UV-Licht-Exposition zur Fluoreszenz angeregt (Nippon Genetics Europe). Dann wurde das Gel in eine Gelkammer gegossen (Höhe ≤5 mm) und zwei Kämme mit je 12 *Well* und 1,5 mm Dicke eingesetzt. Nach 30-60 min hatte sich das Gel soweit verfestigt, dass die Kämme entfernt und das Gel in eine mit 1×TBE-Puffer gefüllte, horizontale Elektrophoresekammer gegeben werden konnte. Anschließend wurden je 5 µl der

Negativkontrolle bzw. Proben aus der PCR sowie 3,5 µl Größenstandard (100 bp Standard DNA Marker) in die Taschen an der Kathodenseite aufgetragen. Nun wurde der Deckel verschlossen und eine Spannung von 160 V bei 110 mA für ca. 25 min angelegt. Da im PCR-Puffer (CoralLoad) bereits Laufpuffer und Farbstoff (rot und orange) zur Kennzeichnung der Wanderung enthalten waren, musste weder separater Probenauftragspuffer noch Farbstoff hinzugefügt werden. Nachdem die farbstoffmarkierten Proben in Richtung Anode gewandert waren, wurden die Banden auf dem Geldokumentationssystem unter UV-Licht auf Größe, Vollständigkeit und Quantität kontrolliert.

Tabelle 3.5 | **Herstellung des 10×TBE-Puffer**

Chemikalie	Menge
Trishydroxymethylaminomethan (C ₄ H ₁₁ NO ₃) 121,14 g/mol	108 g (890 mM)
Borsäure (H ₃ BO ₃) 61,83 g/mol	55 g (890 mM)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈) 0,5 M, pH 0,8, 292,24 g/mol	40 ml (20 mM)
Wasser (H ₂ O)	ad 1.000 ml

vgl. Voytas, 2001. Für 1×TBE-Puffer wurden 100 ml 10×TBE-Puffer mit 900 ml H₂O versetzt.

3.5 Reinigung der PCR-Produkte

Für die Sequenzierung und kapillarelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte ist eine Aufreinigung erforderlich. Denn im PCR-Ansatz befinden sich neben dem Amplikon noch Reste von Primern (oligo-dNTPs), DNA-Strängen, unfertigen PCR-Produkten und Nukleotiden. Überschüssige Nukleotide würden das Verhältnis von dNTPs zu ddNTPs stören (Río Bártulos und Tappe, 2012). Die Reinigung kann sowohl enzymatisch als auch durch physikalische Trennmethoden (z. B. Ionenaustauschsäulen) oder chemische Fällung erfolgen (Río Bártulos und Tappe, 2012). Bei der enzymatischen Aufreinigung zerschneidet die Exonuklease die Primer von ihren Enden aus in einzelne Nukleotide. Die Phosphatase spaltet die Nukleotide in Nukleoside und anorganisches Phosphat auf. Im letzten Schritt wird das Reagens erhitzt, um die Enzyme zu denaturieren bzw. zu inaktivieren (s. Abbildung 3.4) (Werle *et al.*, 1994; Bell, 2008; ExoSAP-ITTM PCR Product Cleanup Brief Protocol, 2017).

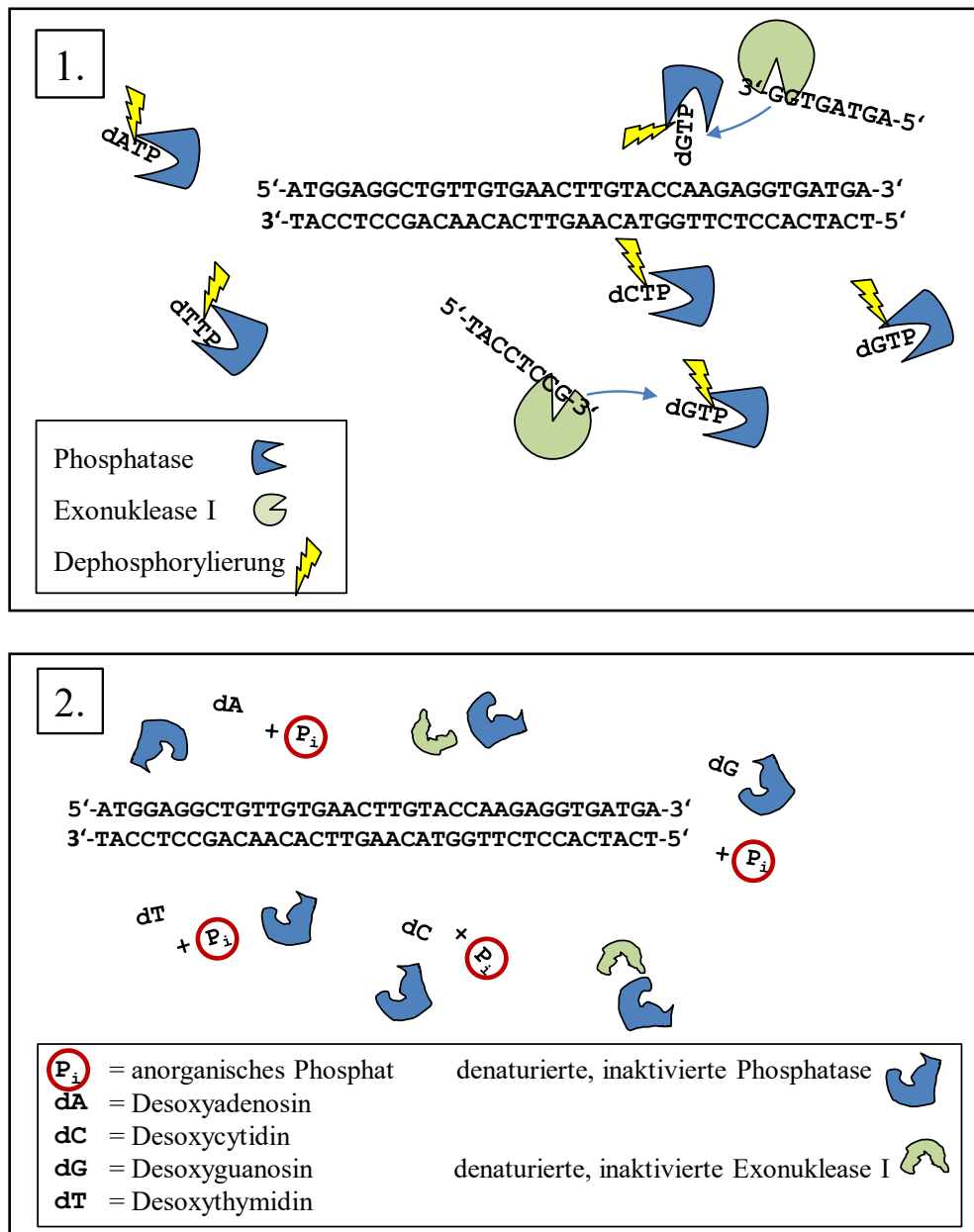


Abbildung 3.4 | **Enzymatisches Cleanup.** 1. | Exonuklease I zerschneidet die Primer in einzelne Nukleotide. Die Phosphatase spaltet die Nukleotide in Nukleoside und anorganisches Phosphat auf. 2. | Denaturierung der Proteine durch Hitze. Abb. modifiziert nach ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Brief Protocol, 2017.

3.5.1 Durchführung der Reinigung der PCR-Produkte

Für die Reinigung der in der PCR amplifizierten DNA-Stränge aus dem *ELOVL1*-Gen wurde das USB ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup von Affymetrix verwendet. Mit diesem Kit ist es möglich, Produkte zwischen ungefähr 100 und 20.000 bp von überschüssigem Material zu befreien. Das Reagens ExoSAP-IT kann der PCR-Reaktion direkt hinzugefügt werden, sodass mit dem verwendeten PCR-Puffer weitergearbeitet werden kann (Bell, 2008; ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Brief Protocol, 2017).

Auf Eis wurden zu je 3 µl Probe aus der PCR-Reaktion je 0,8 µl ExoSAP-IT™-Reagens (gelagert bei -20 °C) und je 1,2 µl RNase-freies Wasser beigelegt und vermischt. Danach wurde der Ansatz im Thermocycler bei 37 °C für 15 min erhitzt, bevor er unmittelbar danach bei 80 °C für weitere 15 min inkubiert wurde. Nun wurden die Proben auf 18 °C herunter gekühlt und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C gelagert.

3.6 Sequenzierung

Für die Sequenzierung der Nukleotidabfolge wurden verschiedene Verfahren entwickelt. Die Sequenzierung nach Sanger, Nicklen und Coulson beruht auf einem Abbruch der wachsenden Nukleotidkette, indem einer Polymerase neben 2'-Desoxynukleotiden (dNTPs) auch 2',3'-Didesoxynukleotide (ddNTPs) angeboten werden. ddNTPs besitzen keine freie 3'-Hydroxylgruppe (Sanger, Nicklen und Coulson, 1977). Der zu sequenzierende Abschnitt der DNA muss in einzelsträngiger Konformation vorliegen. Die Polymerase benötigt einen Primer und baut komplementär zum vorliegenden *Template* Desoxynukleotide ein, bis es zum Einbau eines Didesoxynukleotids und dadurch zum Kettenabbruch kommt (Río Bártulos und Tappe, 2012). Ursprünglich wurden vier Reaktionsansätze mit je einem Didesoxynukleotid, aber allen vier Desoxynukleotiden, benötigt. Initial war durch Verwendung radioaktivmarkierter ddNTPs eine Größenauftrennung mittels Autoradiographie parallel auf einem Polyacrylamidgel möglich (Sanger, Nicklen und Coulson, 1977).

3.6.1 Kapillarelektrophorese mithilfe von Fluoreszenzfarbstoffen

Die vier verwendeten Didesoxynukleotide sind heute meistens mit vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, sodass die unterschiedlich langen DNA-Fragmente mittels Kapillarelektrophorese nach ihrer wachsenden Größe aufgetrennt und mittels Laser unterstützter Detektion gemessen und computergestützt ausgewertet werden können. Aus der Abfolge der Absorptionsmaxima lässt sich in nur einem Ansatz auf die komplementäre Sequenz schließen (Río Bártulos und Tappe, 2012). Die Vorteile der kapillarelektrophoretischen Auftrennung liegen u. a. in einer besseren Automatisierbarkeit, einem kleineren benötigten Probenvolumen, einer kürzeren Analysedauer und geringeren Kosten pro Lauf (Río Bártulos und Tappe, 2012). Zur Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe wird z. B. ein Argonlaser bei 488 nm Wellenlänge eingesetzt (Río Bártulos und Tappe, 2012).

3.6.2 Durchführung des *Cycle Sequencing* durch Sanger-Sequenzierung

Auf Eis wurden zu 5 µl des gereinigten PCR-Produktes je 1 µl Big Dye Terminator 5×Sequencing Puffer, 1 µl entweder Vorwärts- oder Rückwärtsprimer (10 pmol/µl), 1,2 ml Big Dye Terminator v 3.1 (enthält ddNTPs) und 1,8 µl Wasser hinzugegeben. Der Ansatz wurde gemischt und mit der Minizentrifuge für 2 s zentrifugiert. Die Sequenzierreaktion wurde in einem Thermocycler (vgl. Tabelle 3.6) gestartet. Aufgrund der Länge der PCR-Produkte von Exon 2-4 und 5-7 wurden je ein Vorwärts- und ein Rückwärtsprimer (vgl. Tabelle 3.7) in zwei Ansätzen verwendet.

Tabelle 3.6 | Bedingungen für das *Cycle Sequencing*

Arbeitsschritt	Temperatur in °C	Zeit in s
Initiale Hitzedenaturierung	96	60
Hitzedenaturierung	96	20
Anlagerung des Primer	55	5
DNA-Synthese	60	240
Kühlen	15	Pause

 25 Zyklen

Tabelle 3.7 | Verwendete Sequenzierprimer

Exon 1 (410 bp)	Exon 2-4 (983 bp)	Exon 5-7 (720 bp)	Exon 8 (648 bp)
Ex1F (tlw. Ex1R2)	Ex2F und Ex4R	Ex5Fn und Ex7n	Ex8F (tlw. Ex8R)

3.7 Zweite Aufreinigung

Nach der Sequenzierreaktion werden die Proben für die kapillarelektrophoretische Auftrennung in einem weiteren Schritt gereinigt. Nicht eingebaute, farbstoffmarkierte ddNTPs könnten bspw. Störsignale in der Kapillarelektrophorese erzeugen (Mülhardt, 2013). Für die Aufreinigung kommen verschiedene filterbasierte Verfahren wie die Gelpermeationschromatographie zum Einsatz (Río Bártulos, Tappe und Rothhämel, 2012a).

3.7.1 Durchführung der zweiten Aufreinigung

Für die zweite Aufreinigung wurden 96 *Well* Filterplatten (MultiScreen-HV) von Millipore verwendet. 350 µl des in Wasser über Nacht bei RT vorgequollenen Sephadex wurden jedem *Well* hinzugefügt. Nun wurde die Platte bei 720 g für 2 min bei 20 °C zentrifugiert und das Eluat wurde verworfen. Die Sequenzierreaktion wurde auf den entstanden Säulenfiltern vollständig und mittig aufgetragen und erneut bei 720 g für 2 min bei 20 °C zentrifugiert. Überschüssiges Material bindet so an den Filter, wohingegen die unterschiedlich langen Produkte der Sequenzierungsreaktion ins Eluat gelangen. Formamid, das Amid der Methansäure, denaturiert DNA in Einzelstränge und

stabilisiert den *Coil*-Zustand (Blake und Delcourt, 1996). Dabei interagiert es mittels Wasserstoffbrückenbindungen mit den Nukleotiden, sodass die Ausbildung der Doppelhelix erschwert wird. Es senkt die Schmelztemperatur der DNA in Abhängigkeit des GC-Gehalts und der Konzentration an zugefügtem Formamid (Blake und Delcourt, 1996). Dem Eluat wurden anschließend je 10 µl Formamid hinzugefügt und die Proben wurden luftdicht verschlossen und lichtgeschützt bei 4 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Die Kapillarelektrophorese erfolgte je nach Verfügbarkeit entweder mit dem ABI Prism 3130xl oder SeqStudio Genetic Analyzer.

3.8 Kapillarelektrophorese

3.8.1 SeqStudio Genetic Analyzer

In einem finalen Schritt wurden die Proben auf eine optische Reaktionsplatte („MicroAmp optical 96-Well Reaction Plate“) pipettiert. Die Platte wurde mit einem Kunststoffverschluss („SeqStudio Septa 96-Well“) versehen. Dann wurde die verschlossene Platte zusammen mit Kathoden-Puffer in das Kapillarelektrophoresegerät eingesetzt. Es erfolgte die Konfiguration mit verschiedenen Parametern wie der Leselänge und die Benennung aller Proben. Anschließend analysierte das Gerät die Proben vollautomatisch. Die Daten konnten anschließend im ab1 Format auf ein Speichermedium exportiert werden und waren für die Auswertung mithilfe von Computerprogrammen bereit.

3.9 RNA-Isolation

3.9.1 Grundlagen der RNA-Isolation

RNA ist im Gegensatz zu DNA weniger stabil. Ubiquitär vorkommende RNasen können RNA degradieren. RNasen sind äußerst stabil und benötigen für ihre Aktivität keine Kofaktoren. Deshalb werden RNase Inhibitoren (z. B. RNase OUT™, Life Technologies) eingesetzt. Zudem muss eine Kontamination mit RNasen vermieden werden (Kurreck, Lottspeich und Engels, 2022). RNA ist auch für spontane Hydrolyse anfälliger als DNA (Schröder, 2012). Um den Gehalt an DNA zu minimieren, wird RNase freie DNase I eingesetzt (Schröder, 2012).

3.9.2 Durchführung der RNA-Isolation

Für die Isolation von RNA aus Blutzellen wurde das „PAXgene Blood RNA Kit“ (Version 2) der Firma PreAnalytiX benutzt. Zuerst wurde das Blut im „PAXgene Blood RNA Tube“ für 2 h bei RT inkubiert. Dadurch lysierten die Blutzellen vollständig.

Dann wurden die Tubes für 10 min bei 4.000 min^{-1} zentrifugiert und der Überstand mittels Pipette entfernt. In 4 ml RNase freiem Wasser löste sich das am Boden gebildete Pellet durch Vortex-Mischen vollständig auf. Nun wurde das Tube erneut für 10 min bei $3.000\text{-}5.000 \text{ g}$ zentrifugiert und der Überstand entfernt. In $350 \mu\text{l}$ Resuspensionspuffer löste sich das neu gebildete Pellet durch Mischen sichtbar auf. Die Lösung wurde nun in ein Mikrozentrifugationsgefäß ($1,5 \text{ ml}$) überführt und mit $300 \mu\text{l}$ des Bindepuffers sowie $40 \mu\text{l}$ Proteinase K versetzt. Nach Mischen auf dem Vortexmischer (5 s) wurde der Ansatz für 10 min bei 55°C auf dem Schüttel-Inkubator ($400\text{-}1.400/\text{min}^{-1}$) belassen.

Das Lysat wurde nun auf eine PAXgene *Shredder* Spinsäule geladen und für 3 min bei 13.000 min^{-1} in einem 2 ml großen Auffangbehälter stehend zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Mikrozentrifugationsröhrchen überführt, ohne das darin gebildete Pellet zu berühren oder zu lösen. Nachdem zum Überstand $350 \mu\text{l}$ 96%iger Ethanol hinzugefügt und gemischt worden war, wurde kurz zentrifugiert ($500\text{-}1.000 \text{ g}$ für 1 s). Dann wurden zuerst $700 \mu\text{l}$ des Ansatzes auf den PAXgene RNA Spin Säulenfilter geladen und für 1 min bei 13.000 min^{-1} zentrifugiert. Das Auffangröhrchen samt Eluat wurde verworfen und der Säulenfilter auf einem neuen Probenröhrchen platziert. Der komplette, verbleibende Teil des Ansatzes wurde nun ebenfalls auf den Säulenfilter aufgetragen und für 1 min bei 13.000 min^{-1} zentrifugiert und das Eluat verworfen.

Nach Hinzufügen von $350 \mu\text{l}$ Waschpuffer 1 und Zentrifugieren (1 min bei 13.000 min^{-1}) wurde auch dieses Eluat samt Röhrchen verworfen und ein neues Auffangröhrchen darunter platziert. $10 \mu\text{l}$ DNase 1 Stock Solution wurden mit $70 \mu\text{l}$ DNA-Verdaupuffer in einem $1,5 \text{ ml}$ großen Mikroreaktionsgefäß durch leichtes Schnipsen gemischt, denn DNase 1 ist anfällig für physikalische Einwirkungen. Nach kurzem Anzentrifugieren folgte das Aufladen dieses Ansatzes direkt auf die Membran des Säulenfilters und eine 15 minütige Inkubation bei RT.

Nun wurden erneut $350 \mu\text{l}$ des Waschpuffer 1 auf den Säulenfilter aufgetragen und einminütig bei erneut 13.000 min^{-1} zentrifugiert. Wieder wurde der Durchfluss mit Auffangröhrchen verworfen. Nach Auftragen von $500 \mu\text{l}$ Waschpuffer 2 und Zentrifugation für 1 min bei 13.000 min^{-1} wurde das Eluat erneut verworfen. Dieser Schritt wurde anschließend mit einer dreiminütigen Zentrifugation wiederholt. Wieder

wurde der Durchfluss mitsamt Auffangröhrchen verworfen. Nun wurde ohne Auftragen von neuem Puffer erneut für 1 min bei 13.000 min^{-1} in ein neues Auffangröhrchen zentrifugiert. Nach Verwerfen des Eluats und Ersetzen des Auffangröhrchens durch ein 1,5 ml großes Mikrozentrifugationsgefäß wurden 40 μl Elutionspuffer direkt auf die Membran des Filters pipettiert und wieder für 1 min bei 13.000 min^{-1} zentrifugiert. Dadurch war die RNA tlw. eluiert. Durch erneutes Auftragen von 40 μl Elutionspuffer und Zentrifugation wurde die Ausbeute an eluierter RNA erhöht. Abschließend wurde der RNA enthaltende Ansatz für 5 min bei 65°C inkubiert und danach unverzüglich auf Eis gekühlt. Dadurch denaturierte die RNA. Zum Verwahren wurde die RNA bei -70°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

RNA-Isolate aus komplettem Gehirn, fetalem Gehirn, Leber, Niere sowie aus Gewebe von Adipozyten wurden käuflich bei der Firma Clontech Laboratories bzw. TaKaRa Bio erworben und bei -80°C aufbewahrt (s. Tabelle 2.10). Die Quantifizierung des RNA-Gehalts erfolgte mittels photometrischer Messung (s. o.).

3.10 cDNA-Synthese

Aufgrund der Hydroxylgruppe im Ribose-Ring ist RNA gegenüber Umwelteinflüssen relativ instabil (Schröder, 2012). Eine gewisse Stabilität ist aber für Verfahren wie die PCR wichtig. Deshalb wird die gewonnene RNA mittels Reverser Transkriptase (RNA-abhängige-DNA-Polymerase) zunächst in DNA umgeschrieben (Martín-Alonso *et al.*, 2021). Das modifizierte *pol*-Gen der Reversen Transkriptase wurde aus dem Moloney Murine Leukemia Virus (Mo-MLV) isoliert und mittels Klonierung in das Bakterium *Escherichia coli* eingebracht und gentechnisch vervielfältigt (Kotewicz *et al.*, 1985; Gerard *et al.*, 1986; Tzertzinis *et al.*, 2008). Abhängig von verwendeten Primern werden unterschiedliche Teile der RNA in cDNA kopiert. Bei Verwendung von *Random* Primern werden all diejenigen Transkripte aus RNA, welche sich zum Zeitpunkt der Probeentnahme des untersuchten Gewebes in den Zellen befanden bzw. alle zu diesem Zeitpunkt exprimierten Gene, in cDNA umgeschrieben. D. h. die cDNA ist zelltyp- bzw. gewebetypspezifisch, denn je nach Zelle werden Gene unterschiedlich exprimiert (Tzertzinis *et al.*, 2008). *Random* Primer sind in ihrer Zusammensetzung zufällig gewählte Desoxyribonukleotide und binden unspezifisch an viele Stellen der RNA (Tzertzinis *et al.*, 2008; Martín-Alonso *et al.*, 2021).

3.10.1 Durchführung der cDNA-Synthese

Zur Herstellung von cDNA wurde die SuperScript III Reverse Transkriptase nach Protokoll verwendet. Für die Synthese des First Strand wurden auf Eis je 1 µg Gesamt-RNA (aus komplettem Gehirn, fetalem Gehirn, Fettgewebe, Blut/ Leukozyten, Leber und Niere; gelagert bei -80 °C) mit 1 µl dNTP Mix (je 10 mM), 1 µl *Random Primer* (0,1 µg/µl) sowie 10 µl Wasser gemischt. Diese Ansätze wurden bei 65 °C für 5 min erhitzt und für 1 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurden 4 µl des 5×Puffers und 1 µl Dithiotreitol (0,1 mM) sowie 1 µl RNase Inhibitor (RNaseOUT) und 1 µl Reverse Transkriptase (SuperScript III) hinzugefügt und durch Pipettieren gemischt. Dithiotreitol ist ein Reduktans, welches Enzyme und Proteine mit freien Sulfhydryl-Gruppen stabilisiert, in dem es die Sulfhydryl-Gruppen im reduzierten Zustand belässt (Cleland, 1964; ThermoFisher Scientific, 2012). Der Ansatz wurde im Thermocycler weiterverarbeitet (s. Tabelle 3.8).

Tabelle 3.8 | **Reaktionsbedingungen für die reverse Transkription**

Schritt	Temperatur in °C	Zeit in min
1	25	5
2	55	60
3	70	15
4	4	Kühlung, dann sofort auf Eis

3.10.2 PCR der cDNA

Tabelle 3.9 | **PCR der cDNA**

Arbeitsschritt	Temperatur in °C	Zeit in s
1.) Initiale Denaturierung	95	180
2.) Denaturierung	94	30
3.) <i>Annealing</i>	(je nach Primer)	30
4.) Elongation	72	45
5.) Finale Extension	72	180
6.) Kühlung	15	

 35 Zyklen

Tabelle 3.10 | **cDNA-Fragmente (Amplikons) und ihre Größen**

Bereich der cDNA (Vorwärts- und Rückwärts-Primer)	Größe in bp (ohne Introns) Transkript <i>ELOVL1-201</i>	Größe in bp (ohne Introns) Transkript <i>ELOVL1-202</i>
cEx3F - cEx6R	342	261
cEx3F - cEx7R	482	401
cEx3F - cEx8R	694	613
cEx4F - cEx7R	325	-
cEx4F - cEx8R	537	-

3.10.3 Auftrennen der Banden und DNA Geextraktion

Durch die Gelelektrophorese werden DNA-Moleküle anhand ihrer Größe zu Banden aufgetrennt (s.o.) und können anschließend sequenziert werden. Nach Herstellen eines 1,5-2,0%igen Agarose-Gels (s. o.) wurden in jedes *Well* 26 µl aus dem fertigen PCR-Ansatz aufgetragen und eine Elektrophorese bei 170 V und 110 mA durchgeführt. Anschließend wurde das Gel auf dem Geldokumentationssystem fotografiert und dann die Banden auf dem Transilluminator mit einem Skalpell scharf exzidiert. Dabei wurde die Expositionszeit mit UV-Licht minimiert, um UV-bedingte Schäden an der DNA zu reduzieren (Lee *et al.*, 2012). Für die weitere Verarbeitung wurde das Monarch® *DNA Gel Extraction Kit* laut Protokoll verwendet (New England Biolabs, 2016).

Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 13.000 min⁻¹ in der Biofuge pico durchgeführt. Die exzidierten und abgewogenen Banden wurden in ein 1,5 ml großes Mikrozentrifugationsgefäß gesetzt. Dazugegeben wurde die vierfache Menge (in mg) an Lösungspuffer. Anschließend wurden die Proben bei 50 °C und 850 min⁻¹ für 10 min auf dem Schüttelinkubator inkubiert, bis sich die Gelbestandteile vollständig aufgelöst hatten. Nachdem die Säulen in die Auffangröhrchen gestellt worden waren, wurden die Proben auf die Säule geladen und für 1 min zentrifugiert, der Durchfluss wurde nun verworfen. Nach Hinzufügen von 200 µl DNA-Waschpuffer wurde erneut für 1 min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit 200 µl DNA-Waschpuffer wiederholt, der Durchfluss wurde verworfen. Nach Transfer der Säule auf ein 1,5 ml großes Mikrozentrifugationsgefäß wurden je nach Dicke der Bande in der Gelelektrophorese 6-20 µl DNA-Elutionspuffer hinzugefügt, für 1 min inkubiert und für 1 min in der Zentrifuge eluiert (New England Biolabs, 2016).

Zur Quantifizierung und Qualitätskontrolle wurde nach der PCR eine Gelelektrophorese auf 1,5%igem Agarose Gel durchgeführt (s.o.). Hierfür wurden 5 µl Probe mit 1,5 µl Ladepuffer (enthält Bromphenolblau und Xylencyanol) gemischt und aufgetragen. Daran anschließend konnte eine Sequenzierung des ausgeschnittenen Bereichs (Bande in der Gelelektrophorese) durchgeführt werden. Dafür wurde je nach Stärke der Bande eine bestimmte Menge eingesetzt. Die enzymatische Reinigung vor der Sequenzierung entfällt hierbei, da das Produkt durch Gelextraktion bereits aufgereinigt worden ist.

4. Ergebnisse

Um einen möglicherweise bestehenden kausalen Zusammenhang zwischen Punktmutationen im *ELOVL1*-Gen und der Gruppe der neurodegenerativen Erkrankungen der spinocerebellären Ataxien zu überprüfen, wurde die DNA von 64 Ataxie-Patienten untersucht. Bei keinem dieser Patienten wurden zuvor bekannte pathogene Varianten für SCAs nachgewiesen. In einer retrospektiven Nachtestung wurden die Exons von *ELOVL1* sequenziert und auf *single nucleotide variants* (SNVs) untersucht. Die Untersuchung erscheint gerade vor dem Hintergrund von pathogenen Varianten in anderen Genen, die für Fettsäure-Elongasen codieren, relevant. So wurde ein Zusammenhang zwischen Varianten in *ELOVL4* und SCA34 (vgl. 1.7.1 *ELOVL4* und SCA34) beschrieben (Ozaki *et al.*, 2015, 2019; Bourque *et al.*, 2018). Pathogene Varianten in *ELOVL5* stehen mit SCA38 (vgl. 1.7.2 *ELOVL5* und SCA38) in Verbindung (Di Gregorio *et al.*, 2014). Die sequenzierten Proben wurden gemäß ACMG-Richtlinie (Richards *et al.*, 2015) mit der Referenzsequenz des längsten Transkriptes *ELOVL1-201* (ENST00000372458.8) des Genom-Browsers Ensembl (www.ensembl.org, Release 105, Dezember 2021, Cunningham *et al.*, 2022) verglichen. Bei allen angegebenen Varianten ist die HGVS-Nomenklatur (den Dunnen *et al.*, 2016) berücksichtigt.

4.1 Patientenkollektiv

Im Rahmen der Untersuchung wurden insgesamt 64 DNA-Proben auf benigne und pathogene Varianten in den Exons 1 bis 8 des *ELOVL1*-Gens sowie die angrenzenden intronischen Bereiche untersucht. Von 64 Patienten waren 37 männlichen Geschlechts, 27 Patienten waren weiblich. Die Patienten waren zwischen 28 und 81 Jahre alt. Bei allen über 70-Jährigen bestand die Symptomatik für mindestens 15 Jahre. Das Kollektiv an Patienten wurde so ausgewählt, dass mindestens ein Angehöriger ersten Grades mit den Symptomen einer SCA bekannt war, und somit der Hinweis auf einen autosomal-dominanten Erbgang in der Familienanamnese bestand. Durch diese Selektion waren genetische Ursachen der Krankheitsbilder der untersuchten Patienten wahrscheinlich. Bei allen verwendeten Proben wurden zuvor die pathognomonisch vorkommenden *Repeat-Expansionen* der SCA 1, 2, 3, 6, 7 und 17 exkludiert. Des Weiteren wurden keine Proben mit SNVs der SCA 11, 13, 14, 19, 23, 28, 34 (*ELOVL4*) und SCA38 (*ELOVL5*) oder Deletionen (SCA 15/16) in die Untersuchung integriert.

4.2 Gelelektrophorese

Am Beispiel von acht PCR-Proben, bei denen Exon 8 und flankierende Bereiche von *ELOVL1* amplifiziert wurden, ließ sich die Gelelektrophorese als Darstellung des amplifizierten DNA-Bereichs und zudem als Schritt der Qualitätskontrolle veranschaulichen (vgl. Abbildung 4.1). Das vervielfältigte Produkt besitzt im Falle von Exon 8 aufgrund der ausgewählten Primer eine errechnete Produktgröße von 648 bp, welches sich durch Analyse der PCR-Fragmente im Vergleich zu einem Größenstandard bestätigen ließ. Alle Banden erschienen in etwa gleich breit und intensiv, was für eine einheitliche Produktgröße und Amplifizierungsmenge sprach.

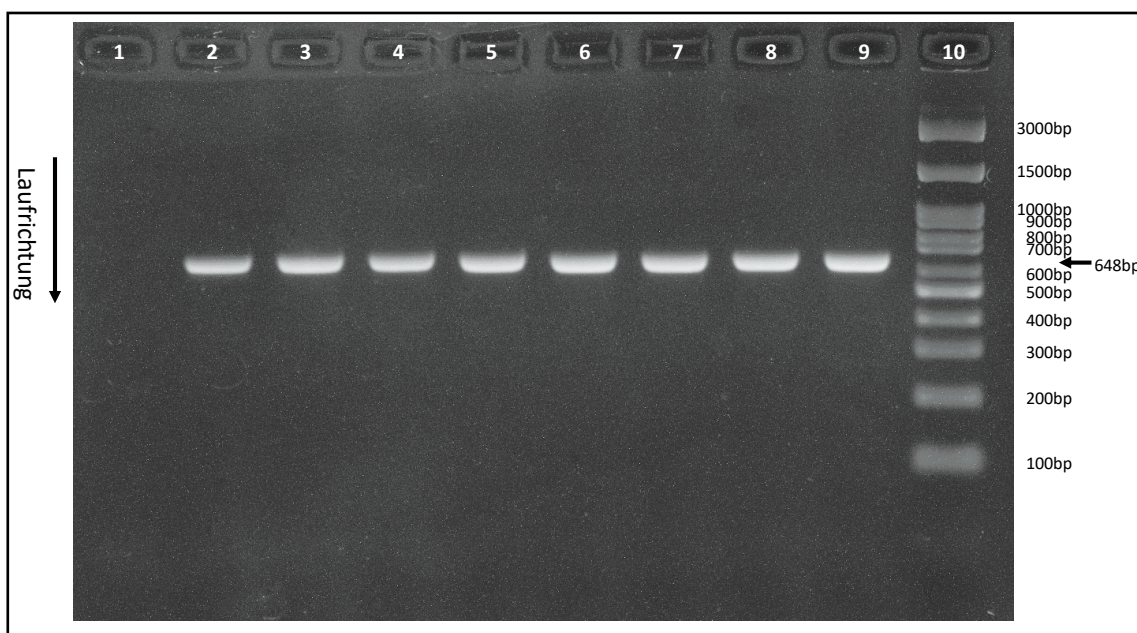


Abbildung 4.1| Gelelektrophoretische Auftrennung und Darstellung der fluoreszenzmarkierten Banden (*ELOVL1*, Exon 8). 1) Negativkontrolle, 2-9) Proben (PCR-Produkte Exon 8), 10) Größenstandard. 1,5%iges Agarose-Gel unter UV-Licht.

4.3 Sequenz-Analyse von *ELOVL1* (Exons 1-8)

Details zu den Varianten wurden der Datenbank dbSNP (Sherry *et al.*, 2001, www.ncbi.nlm.nih.gov/snp) entnommen und mit der Position in Ensembl (Cunningham *et al.*, 2022) verglichen (Stand vom 25.01.2022). Für die sich daraus resultierende Konsequenz wurden die sequenzierten Varianten mit der Datenbank ClinVar (Landrum *et al.*, 2020; www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar) und dem Tool InterVar (Li und Wang, 2017; www.wintervar.wglab.org; jeweils abgerufen am 25.01.2022) abgeglichen. Für die Häufigkeit der Varianten (MAF) wurde u. a. 1000 Genomes Project (Phase 3) herangezogen (Auton *et al.*, 2015).

4.3.1 Exon 1

In Exon 1 und den angrenzenden Introns konnte in keiner der 64 Proben eine vom Wildtyp abweichende Variante detektiert werden. Exon 1 besteht aus 97 Basenpaaren und zählt vollständig zum untranslatierten Bereich (UTR) von *ELOVL1*. In Exon 1 sind 44 Varianten bekannt, darunter 39 *single nucleotide variants* (SNVs), eine Deletion und vier Indels (Sherry *et al.*, 2001; Cunningham *et al.*, 2022). Bei einer Indel handelt es sich um eine kurze, aber mindestens den Austausch von zwei Nukleotiden oder mehr betreffende, gleichzeitige Deletion und Insertion eines Abschnitts auf der DNA. Im Gegensatz zur Substitution werden die Nukleotide nicht im gleichen Verhältnis ausgetauscht, sondern die alternierende Sequenz besitzt im Vergleich zur Ausgangssequenz des Wildtyps eine differente Länge (Kondrashov und Rogozin, 2004; Mills *et al.*, 2006). Hingegen schlägt die HGVS-Empfehlung die Verwendung des Begriffes „Deletion-insertion“ vor (den Dunnen *et al.*, 2016). Mit Verweis auf die oben genannte Definition und die durchaus übliche Verwendung (z. B. in Ensembl) erfolgt an dieser Stelle dennoch der Einsatz des Begriffs „Indel“. Nahezu alle bisher bekannten *minor allele frequencies* (MAFs) der 44 Varianten in Exon 1 sind $< 0,01$, lediglich eine Variante besitzt eine maximal beobachtete MAF von 0,03. Damit sind alle Varianten dieses Exons in den untersuchten Populationen insgesamt selten (Sherry *et al.*, 2001; Auton *et al.*, 2015; Cunningham *et al.*, 2022).

4.3.2 Exon 2

Auch in Exon 2 und den unmittelbar angrenzenden intronischen Bereichen konnte in keiner der 64 Proben eine vom Wildtyp abweichende Variante detektiert werden. Dieses Exon ist 60 Basenpaare lang. Die ersten 14 Nukleotide zählen ebenfalls zum untranslatierten Bereich von *ELOVL1*. Am ersten Codon ATG (bzw. AUG auf RNA-Ebene) beginnt der codierende Bereich. 18 Varianten sind beschrieben, welche alle den SNVs zugerechnet werden. Die Konsequenzen und die Lokalisation dieser Varianten unterscheiden sich (vgl. Tabelle 4.1). Alle bekannten MAFs dieser Varianten sind $< 0,01$, bis auf eine Variante mit einer höchst beobachteten MAF von 0,03 (Sherry *et al.*, 2001; Auton *et al.*, 2015; Cunningham *et al.*, 2022).

Tabelle 4.1 | Einteilung der bekannten Varianten in Exon 2*

Konsequenz der Variante/ Lokalisation	Anzahl
5' UTR (untranslatiert)	2
<i>Nonsense</i> (vorzeitiges Stopcodon)	1
<i>Missense</i>	7
Synonym	7
davon in Spleiß-Region	1

* Daten entstammen Ensembl (Cunningham *et al.*, 2022) und dbSNP (Sherry *et al.*, 2001).

4.3.3 Intron 2

In Intron 2 ließ sich bei zwei von 64 Proben eine Variante nachweisen (Patienten SCA331 und SCA1120). Auf dem Rückwärtsstrang des Chromosoms 1 ist an Position 25 des Introns Thymin (Wildtyp) durch Cytosin (c.46+25T>C) substituiert. Diese SNV ist unter der RefSNP-Nummer rs72671106 beschrieben und liegt hier heterozygot vor. Weil es sich um einen von Exons entfernten, intronischen Bereich ohne Einfluss auf den Spleißvorgang handelt (Transkript *ELOVL1-201*), wird trotz ausgetauschtem Nukleotid ein funktionsfähiges Protein synthetisiert. Das Intron wird zwar zunächst von der RNA-Polymerase transkribiert, aber im Rahmen des *Processing* durch *Splicing* (Spleißen) entfernt, sodass diese intronische Abfolge von Nukleotiden nicht mehr in der fertig prozessierten mRNA enthalten ist und daher auch nicht proteincodierend ist. Dieser Abschnitt der DNA wurde zweimal mittels F-Primer sequenziert, um die Variante sicher bestimmen zu können. In der untersuchten Stichprobe lag die relative Häufigkeit dieser Variante (MAF) bei etwa 1,6 %. Die von 1000 Genomes Project (Phase 3) ermittelte MAF beträgt hingegen 0,3% (Auton *et al.*, 2015). Nachfolgend wird die Variante beider Proben in der Elektrophorese (s. Abbildung 4.2 und Abbildung 4.3) dargestellt.

Summary
NT Variants
Index
Reference
Reference-AA

▶ 904
▶ 894
▶ 892
▶ 821
▶ 797
▶ 788
▶ 723
▶ 684
▶ 673
▶ 669
▶ 654
▶ 642
▶ 636
▶ 553
▶ 551
▶ 472
▶ 453
▶ 431
▶ 394
▶ 339
▼ 331

SCA331_Ex2Fw_20

SCA331_Ex2Fw_20

▶ 200
▶ 4

[illegible]

4.3.4 Exon 3

45

Adenin statt. Dadurch ändert sich das proteincodierende Triplet von CTC zu CTT. Der genetische Code ist an dieser Stelle jedoch degeneriert und die Triplets CTC und CTT codieren beide (synonym) für die Aminosäure Leucin (p.Leu35=). Somit handelt es sich um eine stille Variante. Diese wurde sowohl mit F- als auch mit R-Primer sequenziert.

In der Literatur ist diese SNV mit der RefSNP-Nummer rs75531338 beschrieben. Allerdings ist keinerlei krankheitsassoziierter Charakter bekannt (Li und Wang, 2017; Landrum *et al.*, 2020). Die MAF für Adenin an Position 59 des *forward strand* wird mit 0,003 angegeben. Die höchste jemals in einer Studie (1000 Genomes Project Phase 3) beobachtete MAF einer Population lag bei 0,025 (Auton *et al.*, 2015). In den 64 untersuchten Proben kam das seltenere Allel mit einer relativen Häufigkeit von etwa 0,8 % vor. In diesem 191 Basenpaare umfassenden codierenden Exon gibt es insgesamt 68 bekannte SNV, welche bis auf die nachgewiesene Variante allesamt eine höchste MAF von < 0,01 besitzen. Von den 68 Varianten sind 50 *missense*, davon eine *nonsense* (vorzeitiges Stopcodon), und 18 synonym (Sherry *et al.*, 2001; Cunningham *et al.*, 2022).

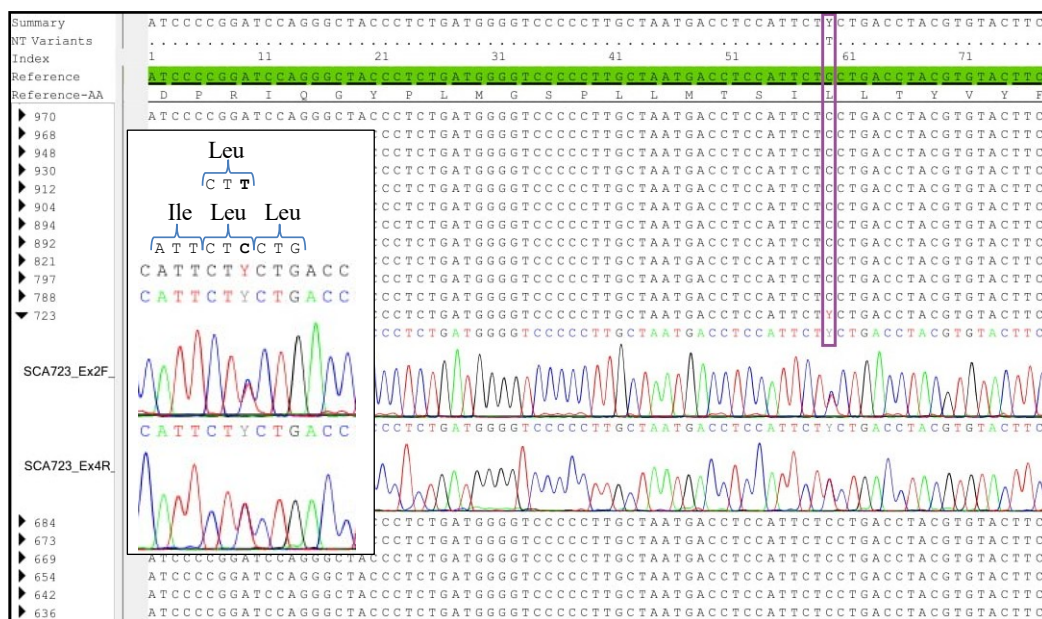


Abbildung 4.4 | Nachweis der Variante c.105C>T in Exon 3 von *ELOVL1*, Patient SCA723. Im Elektropherogramm ist die Variante (rs75531338) am gleichzeitigen Peak von Cytosin (blau, Wildtyp) und Thymin (rot) an Position 59 des Exons 3 (heterozygot) zu erkennen.

4.3.5 Exon 4

In Exon 4 und den angrenzenden Introns konnte in keiner der 64 Proben eine vom Wildtyp abweichende Variante detektiert werden. Exon 4 besteht aus 81 Basenpaaren und zählt zum codierenden Bereich von *ELOVL1*. In diesem Exon sind 26 SNVs

bekannt. Die Konsequenzen und die Lokalisation dieser Varianten unterscheiden sich (vgl. Tabelle 4.2). Auch bei diesen Varianten liegen alle bekannten MAFs bei einer relativen Häufigkeit von $< 0,01$ (Sherry *et al.*, 2001; Cunningham *et al.*, 2022).

Tabelle 4.2 | Einteilung der bekannten Varianten in Exon 4*

Konsequenz der Variante/ Lokalisation	Anzahl
<i>Missense</i>	16
Synonym	10
davon in Spleiß-Region	1

* Daten entstammen Ensembl (Cunningham *et al.*, 2022) und dbSNP (Sherry *et al.*, 2001).

4.3.6 Exon 5

In Exon 5 und im angrenzenden Bereich der Introns konnte in keiner der 64 Proben eine vom Wildtyp abweichende Variante detektiert werden. 19 Varianten sind bekannt (allesamt SNVs). Alle bekannten MAFs liegen bei $< 0,01$. Dreizehn dieser Varianten sind *missense* und sechs synonym. Exon 5 besteht aus 57 Basenpaaren und zählt vollständig zum codierenden Bereich. (Sherry *et al.*, 2001; Cunningham *et al.*, 2022).

4.3.7 Exon 6

In Exon 6 und den angrenzenden Introns konnte in keiner der 64 Proben eine vom Wildtyp abweichende Variante detektiert werden. In Exon 6 sind insgesamt 26 Varianten bekannt, darunter 25 SNVs und eine Indel. Die Konsequenzen und die Lokalisation der Varianten unterscheiden sich (vgl. Tabelle 4.3). Auch hier beträgt die relative Häufigkeit des Auftretens des selteneren Allels aller Varianten $< 0,01$. Die Sequenz von Exon 6 ist vollständig codierend und umfasst 106 Basenpaare (Sherry *et al.*, 2001; Cunningham *et al.*, 2022).

Tabelle 4.3 | Einteilung der bekannten Varianten in Exon 6*

Konsequenz der Variante/ Lokalisation	Anzahl
<i>Nonsense</i> (vorzeitiges Stopcodon)	2
<i>Missense</i>	12
Synonym	11
davon in Spleiß-Region	1
<i>Frameshift</i> (Indel)	1

* Daten entstammen Ensembl (Cunningham *et al.*, 2022) und dbSNP (Sherry *et al.*, 2001).

4.3.8 Exon 7

In Exon 7 und den angrenzenden Introns konnte in keiner der 64 Proben eine vom Wildtyp abweichende Variante detektiert werden. Bekannt sind in diesem Exon insgesamt 41 Varianten, wovon 40 zu den SNVs und eine zu den Indels gehören. Die Konsequenzen und die Lokalisation der Varianten unterscheiden sich (vgl. Tabelle 4.4). In Exon 7 ist eine pathogene Variante (vgl. 5.1 Bisher bekannte Varianten des *ELOVLI-Gens*) beschrieben (Li und Wang, 2017; Mueller *et al.*, 2019). Die MAFs aller bekannten Varianten sind $\leq 0,01$. Exon 7 besteht aus 137 Basenpaaren und ist vollständig codierend (Sherry *et al.*, 2001; Cunningham *et al.*, 2022).

Tabelle 4.4 | Einteilung der bekannten Varianten in Exon 7*

Konsequenz der Variante/ Lokalisation	Anzahl
<i>Nonsense</i> (vorzeitiges Stopcodon)	1
<i>Missense</i>	22
Synonym	17
davon in Spleiß-Region	1
<i>Frameshift</i> (Indel)	1

* Daten entstammen Ensembl (Cunningham *et al.*, 2022) und dbSNP (Sherry *et al.*, 2001).

4.3.9 Exon 8 (codierend)

Im codierenden Bereich des Exons 8 ließ sich in keiner der 64 Proben eine vom Wildtyp abweichende Variante feststellen. In diesem Bereich sind 74 Varianten bekannt, von denen alle zu den SNVs gehören. Davon sind 45 *missense*, 30 synonyme Varianten und zwei *nonsense*. Alle MAFs der bekannten Varianten sind $\leq 0,01$ (Sherry *et al.*, 2001; Cunningham *et al.*, 2022). Das Stopcodon TGA markiert nach 222 Basenpaaren in Exon 8 das Ende des codierenden Bereichs von *ELOVLI* (Cunningham *et al.*, 2022).

4.3.10 Exon 8 (nicht-codierend)

Im nicht-codierenden Bereich des Exons 8 ließ sich in der Probe SCA669 an Position 163 ein Austausch von Cytosin zu Thymin (c.*163C>T) bzw. Guanin zu Adenin (*forward strand*) nachweisen (Heterozygotie). Diese mit der RefSNP-Nummer rs190743956 beschriebene Variante liegt außerhalb des Bereichs, welcher unmittelbar in die Abfolge von Aminosäuren übersetzt wird. Dennoch wird dieser Bereich in mRNA transkribiert, die Synthese des Proteinproduktes wird allerdings zuvor beendet (3' UTR). Bei den untersuchten Proben lag die relative Häufigkeit des selteneren Allels bei circa 0,8 % im Gegensatz zu einer Häufigkeit von 0,3 % in 1000 Genomes Project Phase 3 (Auton *et al.*, 2015). Diese Variante wurde sowohl mit F- als auch R-Primer sequenziert. Nachfolgende Abbildung zeigt die Darstellung der identifizierten Variante.

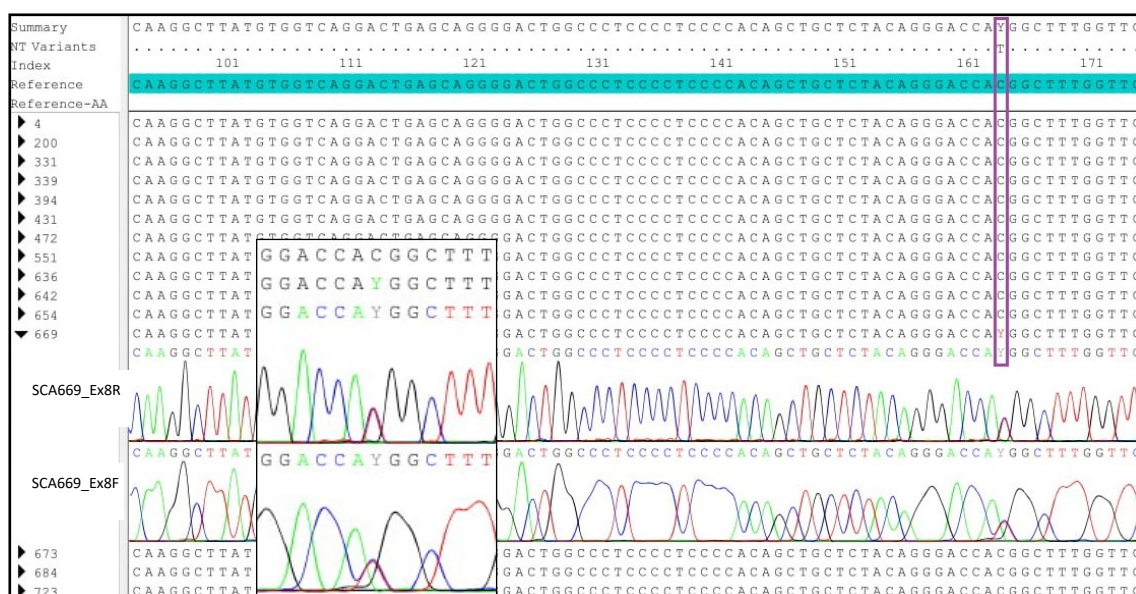


Abbildung 4.5 | Nachweis der Variante c.*163C>T (rs190743956) in Exon 8 von *ELOVL1*, Patient SCA669. Peak für Cytosin (blau, Wildtyp) und Thymin (rot) (Heterozygotie).

4.4 Nachgewiesene Varianten im Kontext der Sequenzen

Lediglich bei vier von 64 Patienten konnten Varianten in *ELOVL1* nachgewiesen werden. Die Sequenzen von allen anderen Patienten zeigten eine Übereinstimmung mit dem Wildtyp. Abbildung 4.6 zeigt die nachgewiesenen Varianten (grün hinterlegt) im Kontext zur Position innerhalb der untersuchten Sequenzen. Diese decken alle Exons sowie flankierende intronische Bereiche ab. Die drei nachgewiesenen Varianten verteilen sich auf Intron 2, Exon 3 und Exon 8 von *ELOVL1*.

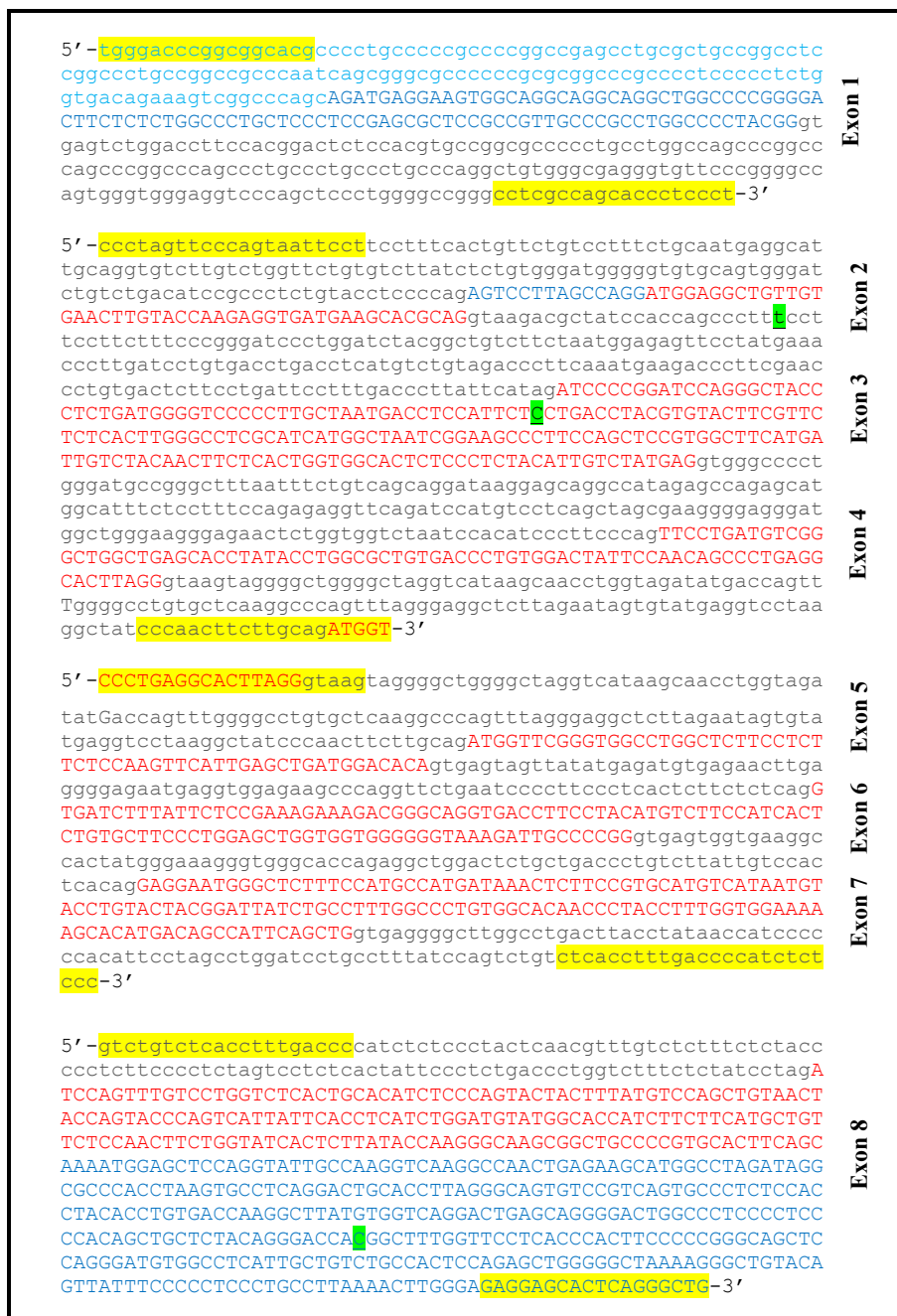


Abbildung 4.6 | **Zusammenstellung der nachgewiesenen Varianten in *ELOVL1*.**

Die Referenzsequenz des Transkriptes *ELOVL1-201* (ENST00000372458.8) wurde dem Genom Browser Ensembl unter www.ensembl.org (Release 105) entnommen.

Legende

ctg	5' flankierende Sequenz	5' - ACGT	Bindungsstelle des Vorwärts-Primers
CTG	Untranslatierter Bereich (UTR)	ACGT -3'	Bindungsstelle des Rückwärts-Primers
ctg	Intron-Sequenz	N	nachgewiesene Variante (SNV)
CTG	Translatierte Sequenz		

Somit fanden sich bei allen 64 Proben genau drei unterschiedliche Varianten im *ELOVL1*-Gen, davon eine im Intron (bei zwei Patienten), eine im codierenden und eine im nicht-codierenden Anteil eines Exons. Alle nachgewiesenen Varianten zählen zu den SNVs und besitzen eine geringe relative Häufigkeit bzw. *minor allele frequency* (MAF) von $< 0,01$ (Auton *et al.*, 2015, 1000 Genomes Project (Phase 3); Cunningham *et al.*, 2022, www.ensembl.org).

Tabelle 4.5 | **Zusammenfassung aller in dieser Arbeit nachgewiesenen Varianten** ¹

dbSNP RefSNP ²	Art der Variante	Lokalisation (<i>ELOVL1-201</i>)	Position auf cDNA- Ebene	Aminosäureposition im Protein/ Konsequenz	MAF ³
rs72671106	SNV	Intron 2	c.46+25T>C	nicht-codierend	0,003
rs75531338	SNV	Exon 3	c.105C>T	p.Leu35=	0,003
rs190743956	SNV	Exon 8	c.*163C>T	untranslatiert	0,003

¹ bezogen auf das Transkript *ELOVL1-201* (ENST00000372458.8; ENSP00000361536.3)

² dbSNP RefSNP (rs-Nummer) (Sherry *et al.*, 2001)

³ 1000 Genomes Project | Phase 3 (Auton *et al.*, 2015); www.ensembl.org (Cunningham *et al.*, 2022)

4.5 Transkriptvarianten von *ELOVL1*

Um eine Aussage über die Transkription von *ELOVL1* in unterschiedlichen Geweben treffen zu können, wurde RNA aus unterschiedlichen humanen Geweben (Gehirn, fetales Gehirn, Fettgewebe, Leber, Niere sowie Blutzellen) in cDNA umgeschrieben und der Zielbereich anschließend mittels PCR mit verschiedenen Kombinationen von Primern vervielfältigt und zur Bestätigung der Transkripte teilweise sequenziert. *ELOVL1* wird in unterschiedlichen Geweben unterschiedlich stark exprimiert (Ohno *et al.*, 2010; Kihara, 2012). Ferner werden verschiedene Transkriptionsvarianten des Gens in der Literatur beschrieben: Es gibt drei proteincodierende Transkriptvarianten, von denen allerdings zwei für ein gleich großes Protein codieren. Außerdem finden sich 13 Transkripte für *long non-coding* RNA (lncRNA) (vgl. Tabelle 1.2).

4.5.1 Vorgehensweise und Wahl der Primer

Nachdem die Gesamt-RNA der unterschiedlichen Gewebe in cDNA umgeschrieben worden war (vgl. 3.10 cDNA-Synthese), erfolgte die Amplifizierung der cDNA in mehreren Abschnitten mittels PCR. Dabei hatten die Produkte unterschiedliche Größen von 309 bis 694 bp, je nach verwendeter Primer-Kombination (s. Tabelle 3.10). Dabei wurden die Primer u. a. so gewählt, dass bei der anschließenden Sequenzierung der Bereich um Exon 4 mit erfasst wurde, um die Variante *ELOVL1-202* nachweisen zu

können. Denn diese Transkriptvariante enthält die Sequenz von Exon 4 (81 bp) nicht und besitzt im Gegensatz zu *ELOVL1-201* auch andere Transkriptgrenzen am 5'- und 3'-Ende (Cunningham *et al.*, 2022).

4.5.2 Auftreten von Nebenbanden

Bei den Versuchen zeigten sich neben der zu erwartenden Bande größere Nebenbanden. Um die optimale Vervielfältigung des jeweiligen Abschnitts auf der cDNA mittels PCR zu gewährleisten und darüber hinaus auch das artifizielle Vorkommen dieser Nebenbanden durch zu niedrige *Annealing*-Temperatur auszuschließen, wurde eine Versuchsreihe mit unterschiedlichen *Annealing*-Temperaturen angelegt. Bei niedrigeren Temperaturen zeigte sich eine relativ stärkere Amplifizierung des 537 bp großen Produktes und der Nebenbanden mit den Primern cEx4F und cEx8R. Mit höherer Temperatur wurden die Banden definierter (vgl. Abbildung 4.7).

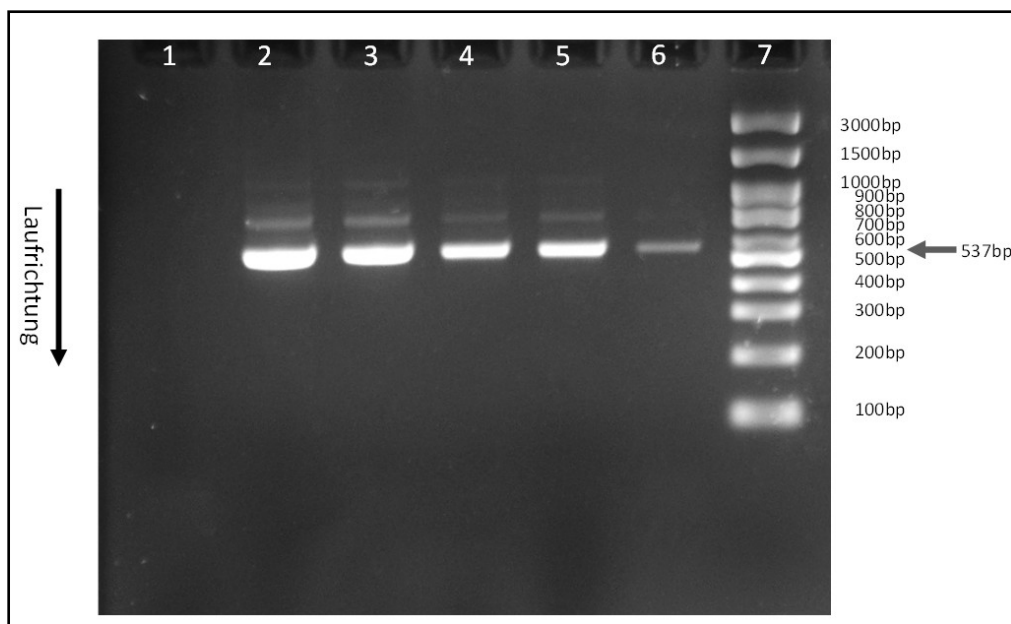


Abbildung 4.7 | Vergleich unterschiedlicher *Annealing*-Temperaturen der PCR an cDNA von *ELOVL1* aus Gehirngewebe mit den Primern cEx4F und cEx8R.

1) Negativkontrolle, 2) 58,4 °C, 3) 60,4 °C, 4) 62,4 °C, 5) 63 °C, 6) 64 °C, 7) Größenstandard

4.5.3 Ergebnis der Untersuchung mit den Primern cEx4F und cEx8R

Im nächsten Schritt wurde eine PCR an cDNA aus unterschiedlichen Geweben (Gehirn, fetales Gehirn, Fettgewebe) mit den Primern cEx4F und cEx8R durchgeführt. Dabei waren zunächst quantitative Unterschiede der erwarteten Bande (537 bp) nachweisbar. Die stärkeren Banden an cDNA aus Gehirn und Fettgewebe deuteten auf eine stärkere Expression im Vergleich zu fetalem Gehirn (s. Abbildung 4.8; Spur 3) hin. Zusätzlich wurden, wie bereits oben erwähnt, Nebenbanden nachgewiesen, die größer als die

erwartete Bande (537 bp) waren. Diese Nebenbanden waren an cDNA aus fetalem Gehirn etwas prominenter im Vergleich zu den anderen zwei getesteten Geweben (vgl. Abbildung 4.8). Die Sequenzierung von Fragmenten der ausgeschnittenen etwa 700 bis 800 bp großen Bande von Gehirngewebe mit unterschiedlichen Sequenzierungsprimern ergab eine Übereinstimmung mit exonischen und intronischen Sequenzen der genomischen DNA (Referenzsequenz ENST00000372458.8).

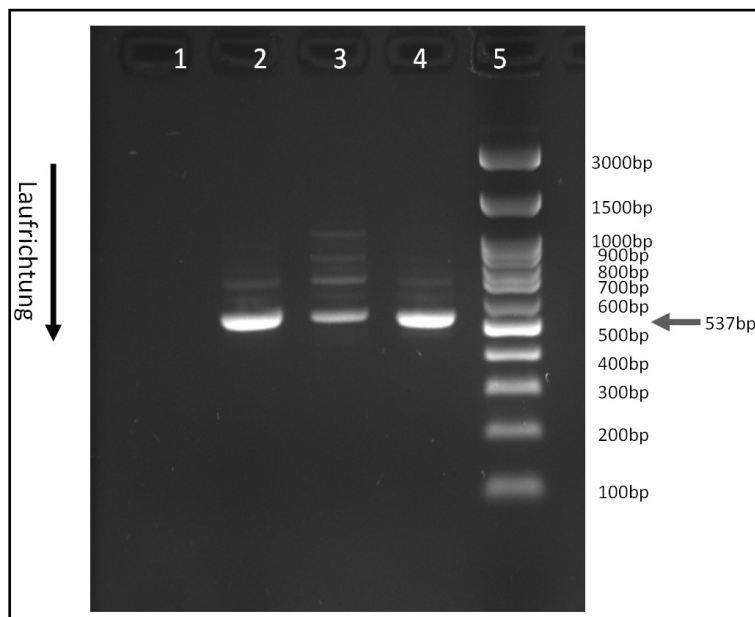


Abbildung 4.8 | **PCR an cDNA von *ELOVL1* mit den Primern cEx4F und cEx8R.**
1) Negativkontrolle, 2) Gehirn, 3) fetales Gehirn, 4) Fettgewebe, 5) Größenstandard

4.5.4 Ergebnis der Untersuchung mit den Primern cEx3F und cEx8R

Um nun das Transkript *ELOVL1-202* nachweisen zu können, wurde eine PCR mit den Primern cEx3F und cEx8F etabliert. Durch Verwendung dieser Primer wurden 5'- und 3'-Ende des PCR-Produktes so gewählt, dass Exon 4 zwischen beiden Enden lag (s. Abbildung 4.9).

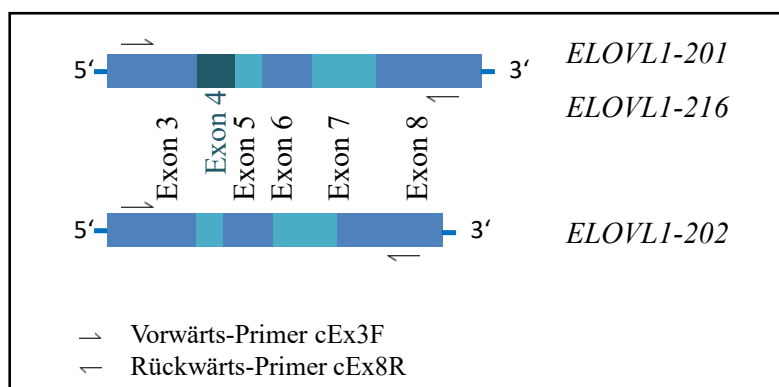


Abbildung 4.9 | **PCR der proteincodierenden *ELOVL1*-Transkripte im Vergleich.**
Die Nummerierung der Exons bezieht sich auf die Transkripte *ELOVL1-201* und *ELOVL1-216*.

Weil Transkript *ELOVL1-202* das Exon 4 (81 bp) von *ELOVL1-201* und *ELOVL1-216* nicht enthält, wäre ein Produkt mit der Größe von 613 bp (ohne Exon 4) neben einem Produkt mit einer Größe von 694 bp (mit Exon 4) zu erwarten gewesen. Durch eine anschließende Sequenzierung der Produkte könnte die Deletion von Exon 4 bestätigt werden und damit auf das Vorliegen von *ELOVL1-202* hindeuten. Das um Exon 4 verkürzte Produkt wäre durch die Verwendung eines Primers wie cEx4F nicht nachweisbar, weil cEx4F an die Sequenz von Exon 4 bindet. In den sechs getesteten Geweben ließen sich durch PCR lediglich Banden mit einer Größe von 694 bp nachweisen, nicht jedoch ein 613 bp großes Produkt. Dies deutet auf das Vorliegen der Transkripte *ELOVL1-201* oder *ELOVL1-216* hin. Wie schon bei Verwendung der Primer cEx4F und cEx8R fällt die Bande (694 bp) von fetalem Gehirn insgesamt semiquantitativ geringer aus (vgl. Abbildung 4.10).

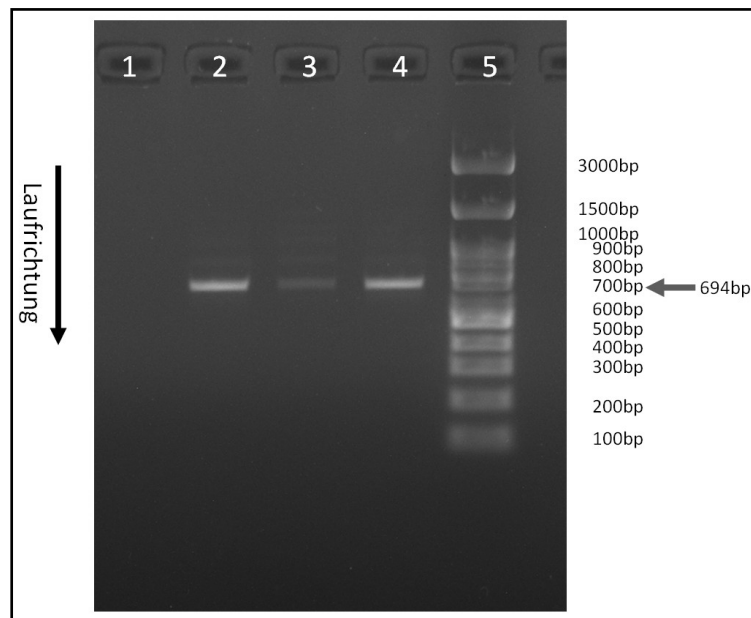


Abbildung 4.10 | PCR an cDNA von *ELOVL1* mit den Primern cEx3F und cEx8R.

1) Negativkontrolle, 2) Gehirn, 3) fetales Gehirn, 4) Fettgewebe, 5) Größenstandard

4.5.5 Ergebnis der Untersuchung mit den Primern cEx3F und cInt5R

Aufgrund des Auftretens von mehreren unterschiedlich großen Banden bei den vorangehenden PCRs, die sich nicht durch ein zweites Transkript wie *ELOVL1-202* erklären ließen, wurde die Möglichkeit untersucht, dass es sich um DNA-Fragmente mit verbliebenen Introns handeln könnte. Der Primer cInt5R bindet spezifisch an die intronische Sequenz des Intron 5 von *ELOVL1*. Somit werden mittels PCR nur diejenigen Sequenzen der cDNA exponentiell amplifiziert, welche genau diese intronische Sequenz beinhalten. Durch den Einsatz der Primer-Kombination cEx3F und

cInt5R konnte gezeigt werden, dass die synthetisierte cDNA intronische Bereiche enthielt und damit vermutlich auch die zum Umschreiben eingesetzte Gesamt-RNA. Dokumentiert wurden vier verschiedene Produktgrößen (s. Abbildung 4.11). Sowohl in der Negativkontrolle als auch bei der getesteten cDNA ließen sich schwache Banden mit einer Größe von deutlich weniger als 100 bp darstellen. Hierbei handelt es sich mutmaßlich um überschüssige Primer mit Größen von 20 bp (cEx3F) bzw. 23 bp (cInt5R). Der Primer-Überschuss der PCR an cDNA aus Gehirn stellt sich quantitativ dezenter dar. Dies ließe sich durch den partiellen Verbrauch an Primern im Gegensatz zur Negativkontrolle (kein Verbrauch) erklären (s. Abbildung 4.11).

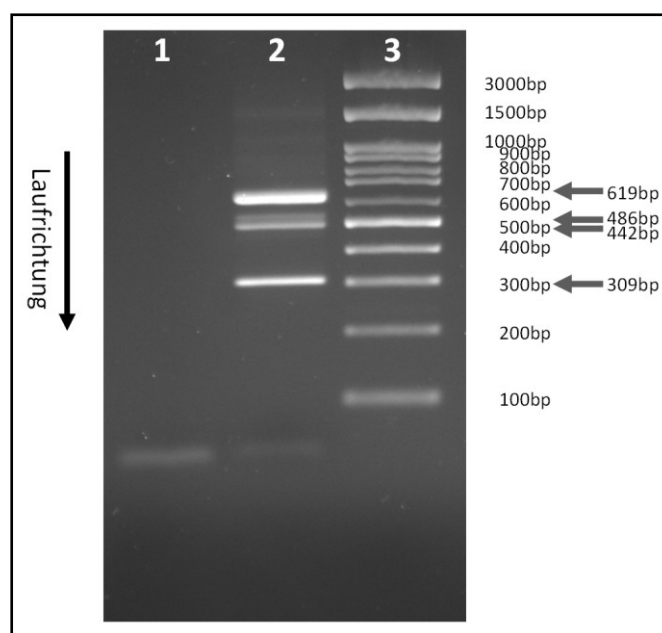


Abbildung 4.11 | PCR an *ELOVLI*-cDNA mit den Primern cEx3F und cInt5R.
1) Negativkontrolle, 2) Gehirn, 3) Größenstandard

4.5.6 Auftreten von diversen Banden

Das Auftreten der vier beobachteten Banden könnte sich durch den Verbleib von „intronischer“ RNA ergeben. Allen Produkten gemeinsam wäre demnach das Vorhandensein von Exon 3, ab dem der Primer cEx3F an die cDNA hybridisiert, sowie der vollständigen Exons 4 und 5 und dem Bereich von Intron 5 bis zu der Sequenz des Primers cInt5R. Das kleinste Produkt unter ihnen mit einer Größe von 309 bp besäße lediglich diese Bereiche bestehend aus Exon 3, 4 und 5 plus Intron 5, aber weder Intron 3 noch Intron 4. Das größte Produkt mit 619 bp enthielte dagegen zusätzlich auch die Sequenzen von sowohl Intron 3 als auch Intron 4.

Um das Vorliegen der intronischen Sequenzen in dem größten Produkt nachzuweisen, wurde dieses zunächst gereinigt und zur Kontrolle auf ein Agarosegel aufgetragen (vgl. Abbildung 4.12). Daran anschließend wurde die Probe sequenziert. Es konnten teilweise Übereinstimmungen mit intronischen Sequenzen nachgewiesen werden.

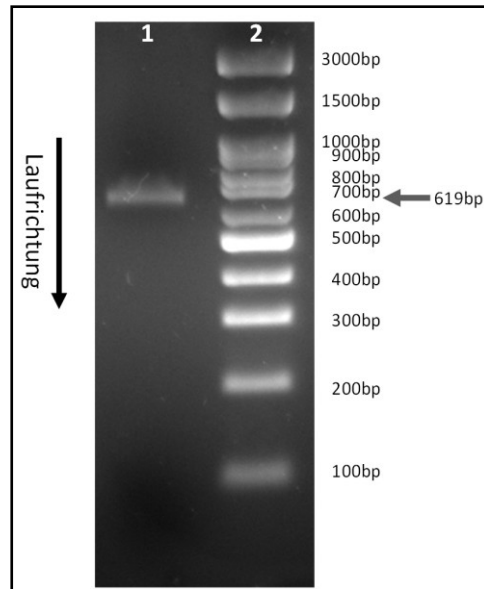


Abbildung 4.12 | **Bande mit gereinigter cDNA der PCR mit Primern cEx3F und cInt5R.**
1) Gehirn, 2) Größenstandard

Eine mittelgroße Produktgröße von 442 bp könnte sich durch Exon 3, 4 und 5 sowie Intron 4 und 5 ergeben, wohingegen eine Größe von 486 bp durch eine Kombination von Exon 3, 4 und 5 sowie Intron 3 und 5 erklärbar wäre (s. Abbildung 4.13). Diese unterschiedliche Zusammensetzung könnte der Grund für das Auftreten der vier unterschiedlich großen Banden sein.

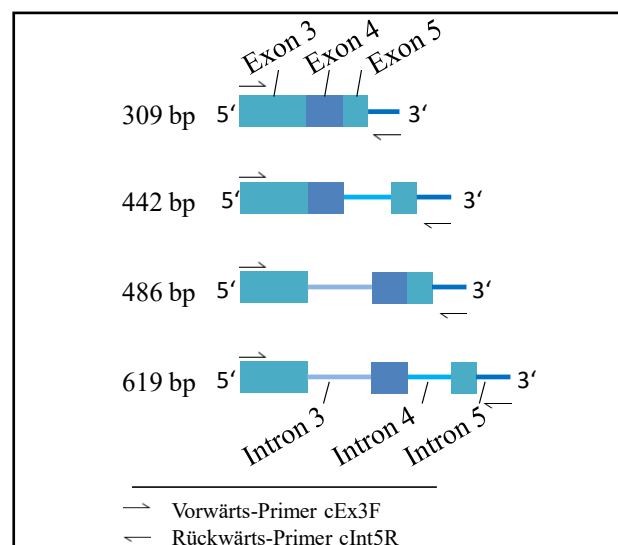


Abbildung 4.13 | **Unterschiedliche Produktgrößen der PCR an cDNA von *ELOVL1-201* mit den Primern cEx3F und cInt5R.**

4.5.7 Abschließende Untersuchung

Abschließend wurde ein Vergleich der PCR der cDNA mit den Primern cEx3F und cEx6R aus den verschiedenen Geweben durchgeführt. In jedem der getesteten Gewebe wie Gehirn, fetalem Gehirn, Fettgewebe, Blutzellen, Leber und Niere ließ sich ein Produkt nachweisen, welches auf das Vorliegen des Transkripts *ELOVL1-201* hinwies, respektive für eine Expression in den Zellen dieser Gewebe spricht. Aufgrund der gleichen Zusammensetzung der proteincodierenden Sequenz und lediglich unterschiedlichen Transkriptgrenzen könnte es sich auch um *ELOVL1-216* handeln. Die 342 bp große Bande war je nach untersuchtem Gewebe unterschiedlich stark ausgeprägt. Die Produkte von Gehirn (*total brain*), Fettgewebe und Niere fielen in Relation zu den anderen getesteten Geweben quantitativ stärker aus. Es wurden keine kleineren Produkte sichtbar, die auf eine Transkriptvariante wie *ELOVL1-202* oder eine andere, bisher unbekannte, kleinere Transkriptvariante hindeuteten. Das PCR-Produkt des Transkripts *ELOVL1-202* mit einer errechneten Größe von 261 bp ließ sich in keinem der getesteten Gewebe nachweisen. Die Produktgröße von 342 bp wies unter Verwendung der Primer cEx3F und cEx6R bei allen Geweben auf die Transkriptvariante *ELOVL1-201* bzw. *ELOVL1-216* hin.

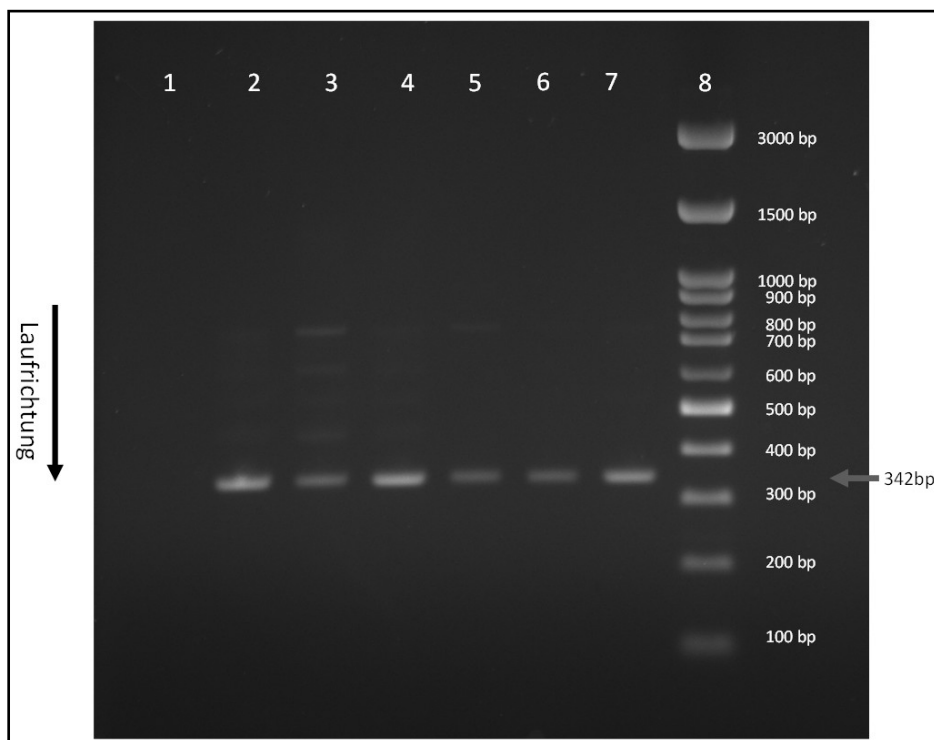


Abbildung 4.14 | **Finaler Vergleich der PCR von unterschiedlich stark exprimierten *ELOVL1-201* Transkripten.** 1) Negativkontrolle, 2) Gehirn, 3) fetales Gehirn, 4) Fettgewebe, 5) Blutzellen, 6) Leber, 7) Niere, 8) Größenstandard. Primer cEx3F und cEx6R; 2,0%iges Agarose-Gel.

4.5.8 Semiquantitativer Vergleich der Expression von *ELOVL1*

Die mittels Gelelektrophorese durchgeführte semiquantitative Bestimmung der Expression von *ELOVL1* in den verschiedenen, getesteten Geweben zeigte Unterschiede zwischen den untersuchten Geweben. Sowohl Gehirn-, als auch Fettgewebe und Niere lagen bezüglich ihrer Expression auf ungefähr gleich hohem Niveau, gemessen an der Stärke der Hauptbande (342 bp). Dagegen stellte sich fetales Hirngewebe schwächer exprimiert dar, obwohl die Nebenbanden dort am deutlichsten imponierten. Die Banden von Blutzellen und Leber stellten sich im direkten Vergleich in ungefähr gleichem Maße schwächer dar. Die Nebenbanden von den Geweben Leber und Niere fielen erheblich schwächer aus und waren kaum erkennbar (vgl. Abbildung 4.14).

4.6 Ergebnis der Untersuchung der Transkriptvarianten

In den durchgeführten Untersuchungen konnte lediglich das proteincodierende Transkript *ELOVL1-201* (mit einer Gesamtlänge von 1466 bp) nachgewiesen werden, nicht jedoch das um Exon 4 depletierte proteincodierende Transkript *ELOVL1-202* (1451 bp). Bei diesem Transkript wird Exon 4 im Rahmen des *processing* übersprungen (alternatives Spleißen durch *exon skipping*) (Cunningham *et al.*, 2022). Auch ließ sich kein anderes, kleineres Transkript als *ELOVL1-201* im Sinne einer alternativen Spleißvariante oder Transkript für lncRNA darstellen. Allerdings präsentierten sich größere, aber schwächere (Neben-)banden. Die Sequenzierung der größten Nebenbande zeigte den Verbleib einiger intronischer Bereiche. Dies könnte ein Hinweis auf hnRNA sein, sogenannte *heterogeneous nuclear RNA*, welche als Vorläufer-mRNA (prä-mRNA) nicht vollständig gespleißt ist. Eine andere mögliche Erklärung wäre eine Verunreinigung der RNA mit genomischer DNA (gDNA) oder eine bisher unbekannte, größere Transkriptvariante als *ELOVL1-201* und *ELOVL1-216*.

5. Diskussion

Vor dem Hintergrund, dass pathogene Varianten in zwei paralogen Genen von *ELOVL1* (*ELOVL4* und *ELOVL5*) in die Pathophysiologie von SCA34 und SCA38 involviert sind (Cadieux-Dion *et al.*, 2014; Di Gregorio *et al.*, 2014), erscheint eine bedeutsame Rolle von *ELOVL1* ebenso denkbar. Auch das RNA- und Protein-Expressionsmuster⁶ von *ELOVL1* in neuronalen Geweben, wie dem Cerebellum, lässt den zentralen Stellenwert dieses Enzyms in der intrazellulären Homöostase der Zellen von Hirngewebe vermuten (Ohno *et al.*, 2010; Sjöstedt *et al.*, 2020). Ebenso unterstützt wird diese Hypothese durch den Nachweis einer *single nucleotide variant* (SNV) in *ELOVL1*, welche ein komplexes neurologisches Syndrom mit Paraplegie (IKSHD) auslöst (Kutkowska-Kaźmierczak *et al.*, 2018; Deák *et al.*, 2019; Mueller *et al.*, 2019).

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurden 64 DNA-Proben von Ataxie-Patienten mit Hinweis auf autosomal-dominante Vererbung auf benigne und pathogene Varianten in *ELOVL1* getestet. Zunächst wurden die pathognomonisch vorkommenden *Repeat-Expansionen* der SCAs 1, 2, 3, 6, 7 und 17 ausgeschlossen, ebenso die SNVs der SCAs 11, 13, 14, 19, 23, 28 sowie SCA34 (*ELOVL4*) und SCA38 (*ELOVL5*). Außerdem wurden zuvor Proben mit Deletionen (SCA15/ 16) von dieser Untersuchung exkludiert.

5.1 Bisher bekannte Varianten des *ELOVL1*-Gens

Auch wenn eine große Anzahl von Varianten (v. a. SNVs) in *ELOVL1* publiziert worden ist, wurde lediglich eine pathogene Variante⁷ (s. u.) beschrieben. Der Großteil der annotierten Varianten von *ELOVL1* ist mit niedrigen Allelfrequenzen assoziiert. Überdies fehlen Angaben zu klinischen Auswirkungen dieser Varianten in den Genomdatenbanken weitgehend. Dennoch kann eine pathophysiologische Wirkung einer dieser seltenen Varianten nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Die zwei häufigsten Varianten im codierenden Bereich haben eine MAF zwischen 0,01 und maximal 0,03. Davon führt nur eine Variante (rs111698274) zu einem Austausch einer Aminosäure im Protein (www.ensembl.org). Lediglich eine intronische Variante (rs839764) kommt mit einer MAF von 0,2 bis 0,42 häufig in den untersuchten Populationen vor (1000 Genomes Project, Auton *et al.*, 2015; www.ensembl.org). Allerdings wird diese bereits häufig beschriebene Variante den ACMG-Richtlinien (Richards *et al.*, 2015) entsprechend der Klasse 1 (*benign*) zugeordnet.

⁶ www.proteinatlas.org/ENSG00000066322-ELOVL1/tissue abgerufen am 28.01.2022 um 11:07 Uhr

⁷ www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1570486718 abgerufen am 03.02.2022 um 12:05 Uhr

In zwei voneinander unabhängigen Untersuchungen an zwei nicht verwandten polnischen Patienten wurde eine *de-novo*-Variante (rs1570486718) nachgewiesen, die zu einem komplexen Syndrom aus ichthyosiformer Keratodermie, spastischer Paraplegie, Hypomyelinisierung zentraler Nervenfasern, partieller Taubheit hoher Frequenzen und Optikusatrophie respektive dysmorphen Gesichtszügen (IKSHD) führt. Diese *Missense*-Variante (c.494C>T; p.S165F) liegt in einem für Wirbeltiere hoch konservierten Bereich (Kutkowska-Kaźmierczak *et al.*, 2018; Mueller *et al.*, 2019) und wird als pathogen⁸ eingestuft (Landrum *et al.*, 2020). Ein ähnlich komplexes Krankheitsbild mit Ichthyose als Form der Hautbeteiligung findet sich ebenfalls bei mehreren pathogenen Varianten in *ELOVL4*. Neben der Ichthyose sind eine spastische Quadriplegie (Tetraplegie) und mentale Retardierung (ISQMR) führende klinische Zeichen (Diociaiuti *et al.*, 2021). Zusammenfassend sind Varianten in Exons von *ELOVL1* insgesamt selten. Es ist von einem konservierten genetischen Code von *ELOVL1* und konsekutiv von einer konservierten Struktur von *ELOVL1* auszugehen, die möglicherweise für die Zellfunktion essenziell ist (Mueller *et al.*, 2019).

5.2 Im Rahmen der Untersuchung gefundene Varianten in *ELOVL1*

5.2.1 Variante in Intron 2

Bei zwei von 64 Patienten wurde in Intron 2 die bereits bekannte SNV (rs72671106) festgestellt. Da es sich um eine intronische Variante (c.46+25T>C) handelt und diese weit entfernt von Exons und den konservierten Spleißregionen liegt, ist ein Einfluss auf den Spleißvorgang und ferner ein Krankheitswert eher unwahrscheinlich (Wachutka *et al.*, 2019). Der ACMG-Richtlinie folgend ist diese Variante (vgl. 4.3.3 Intron 2) wahrscheinlich benigne (*likely benign*). Aufgrund der Lage im Intron fehlt ein Eintrag zur klinischen Auswirkung dieser Variante in der Datenbank ClinVar⁹ (Landrum *et al.*, 2020) und der bioinformatischen Software InterVar¹⁰ (Li und Wang, 2017).

5.2.2 Variante in Exon 3

In einer anderen Probe konnte die bereits beschriebene Variante (rs75531338) in Exon 3 nachgewiesen werden. Diese SNV (c.105C>T) betrifft zwar den codierenden Bereich von *ELOVL1*, allerdings bedingt der Austausch des Nukleotids keine Änderung der translatierten Aminosäure des Proteins (p.Leu35=) und dadurch vermutlich keine

⁸ www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/652597/ abgerufen am 14.02.2022 um 12:55 Uhr

⁹ www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs72671106 abgerufen am 07.02.2022 um 12:41 Uhr

¹⁰ www.wintervar.wglab.org

unmittelbare Veränderung im vollendeten Genprodukt. Jedoch kann es auch bei synonymen Varianten zur Veränderung des Genprodukts kommen. Ein Beispiel dafür ist eine pathogene Variante in *NPC1*, die zum Morbus Niemann-Pick führt. Hier bedingt der Austausch eines Nukleotids ein Exon-Skipping und zudem das Auftreten eines vorzeitigen Stopcodons, wodurch ein verändertes Protein entsteht (Encarnação *et al.*, 2020). Bei der in dieser Arbeit gefundenen Variante ist jedoch ein pathogener Mechanismus eher unwahrscheinlich und bisher nicht bekannt (vgl. 4.3.4 Exon 3). Gemäß ACMG-Richtlinien wird diese Variante als wahrscheinlich benigne (*likely benign*) eingestuft (Li und Wang, 2017).

5.2.3 Variante in Exon 8

Bei einem Patienten fand sich die bereits beschriebene Variante (rs190743956) im nicht-codierenden Bereich (3'UTR) des Exons 8 (c.*163C>T). Diese Variante (vgl. 4.3.10 Exon 8 (nicht-codierend)) zählt ebenfalls zu den SNVs und wird gemäß ACMG-Richtlinien als wahrscheinlich benigne (*likely benign*) eingestuft (Richards *et al.*, 2015). In der Datenbank ClinVar¹¹ und dem bioinformatischen Tool InterVar¹² ist die klinische Signifikanz dieser Variante nicht verzeichnet bzw. nicht berechenbar (Li und Wang, 2017; Landrum *et al.*, 2020). Weil diese Variante außerhalb des proteincodierenden Bereichs von *ELOVL1* liegt, hat diese Variante vermutlich keinen klinisch relevanten Effekt auf die Proteinbiosynthese von ELOVL1 und ist somit mutmaßlich nicht an der Pathogenese von spinocerebellären Ataxien beteiligt. Bei einer Variante im untranslatierten Bereich eines Gens besteht zwar prinzipiell die Möglichkeit, dass das Genprodukt in falscher Konzentration synthetisiert oder zellulär an falsche Stelle transportiert wird (Chatterjee und Pal, 2009). Die endgültige Lokalisation eines Proteins wird N- und C-terminal durch ein Signalpeptid beziehungsweise auf DNA-Ebene durch eine Sequenz im nicht-codierenden Bereich (5'UTR oder 3'UTR) bestimmt (von Heijne, 1985; Negi *et al.*, 2015). Daher können sich Varianten in diesem Bereich durchaus klinisch bemerkbar machen. Entscheidend für die Funktionsfähigkeit von ELOVL1 ist u. a. dessen physiologische Lokalisation auf der luminalen Seite des endoplasmatischen Retikulums (Ohno *et al.*, 2010; Mueller *et al.*, 2019). Vermutlich ist aber ein Dilysin-Motiv am carboxy-terminalen Ende des Proteins als Retentionssignal

¹¹ www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs190743956 abgerufen am 07.02.2022 um 12:43 Uhr

¹² www.wintervar.wglab.org

für die subzelluläre Lokalisierung von ELOVL1 verantwortlich (Bateman *et al.*, 2021, uniprot). Somit ist der 3'UTR-Bereich wahrscheinlich nicht maßgeblich beteiligt.

5.2.4 Beurteilung der Ergebnisse der Untersuchung

Zusammenfassend wurde in dieser Untersuchung von *ELOVL1* in den 64 untersuchten DNA-Proben keine relevante Variante detektiert, welche an der Pathogenese von spinocerebellären Ataxien beteiligt oder direkt ursächlich für die Symptomatik der untersuchten Patienten sein könnte. Dies kann unterschiedliche Gründe haben: Zum einen sind bisher wenige, seltene ($MAF < 0,01$) und gutartige Varianten in *ELOVL1* in der allgemeinen Bevölkerung bekannt. Weiterhin ist das vorselektierte Kollektiv aus 64 Probanden im Verhältnis zu den selten vorkommenden Varianten klein. Daher ist auch die Wahrscheinlichkeit vorab gering, dass bekannte seltene oder neue Varianten gefunden werden, zumal bisher keine SCA-Assoziation mit Ausnahme von IKSHD publiziert wurde. Selbst wenn es eine Korrelation zwischen einer Variante in *ELOVL1* und dem klinischen Bild der SCAs gäbe, kann eine Untersuchung von 64 Patienten diesen Zusammenhang ggf. nicht zweifelsfrei zeigen. Auch kann das Auftreten von Varianten in *ELOVL1* in der untersuchten, deutschen Bevölkerung seltener sein als in anderen Ethnien.

Zum anderen wurden zwar alle codierenden Exons untersucht, allerdings nicht die 5'-untranslatierten Regionen. Varianten in Promotor-Elementen könnten bspw. einen Einfluss auf die Transkriptionseffizienz haben (de Vooght *et al.*, 2009). Deshalb lässt sich mit dieser Untersuchung letztlich nicht ausschließen, dass es relevante Varianten in *ELOVL1* mit Effekt auf die Entstehung von spinocerebellären Ataxien geben könnte. Varianten in nicht-codierenden Exons sind in den meisten Fällen benigne oder zeigen sich inapparent, wenn sie nicht in festgelegten Strukturelementen wie alternativen Promotoren liegen (de Vooght *et al.*, 2009; Cunningham *et al.*, 2022).

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass Patienten ein zweites Allel mit großen Deletionen aufweisen, welche nicht mit PCR und Sequenzierung abgedeckt werden können. So würde lediglich das Wildtyp-Allel in der Sequenzierung erscheinen und die Untersuchung fiel damit weitestgehend unauffällig aus. Zur SCA15/ 16 führen bspw. Deletionen, die das *ITPR1*-Gen (Inositol-1,4,5-triphosphat-Rezeptor-Typ 1) und weitere, nicht ursächliche DNA-Abschnitte betreffen (van de Leemput *et al.*, 2011; Whaley, Fujioka und Wszolek, 2011; Tipton *et al.*, 2017).

5.3 Möglicher Zusammenhang von Varianten in *ELOVL1* und dem klinischen Bild einer spinocerebellären Ataxie

Aufgrund neuer Forschungsergebnisse, die eine Assoziation von Varianten in *ELOVL1* und neurodegenerativen Erkrankungen nahelegen (Mueller *et al.*, 2019; Sen *et al.*, 2019), ist der Fokus auf *ELOVL1* bei bisher ätiologisch unbekannten neurologischen Krankheiten weiterhin wichtig. So könnten neu entdeckte Varianten zu einem erweiterten Verständnis der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen, wie bspw. spinocerebellären Ataxien, beitragen. Deshalb sollte *ELOVL1* in Ataxie-Panels integriert werden. Zum besseren Verständnis von *ELOVL1* müssen weiterführende, umfangreiche Untersuchungen zur Expression in unterschiedlichen humanen Geweben durchgeführt werden.

5.3.1 Herunterregulierung von *Elovl1* im Tiermodell für SCA2

Eine Untersuchung an Mäusen in einem Tiermodell für SCA2 zeigte, dass die mRNA-Spiegel von *Elovl1* in Oligodendrozyten des Cerebellums und des Rückenmarks signifikant reduziert waren. Desweiteren waren in dieser Studie auch die mRNA-Spiegel für *Elovl4* in Neuronen und für *Elovl5* in Astrozyten reduziert (Sen *et al.*, 2019). Kongruent dazu konnte eine Störung des Lipidstoffwechsels gezeigt werden. Die Konzentration von sehr langkettigen Sphingomyelinen war erniedrigt (Sen *et al.*, 2019). Passend zu diesen Ergebnissen wurde bei zwei Patienten mit Hypomyelinisierung der Nervenfasern eine Variante in *ELOVL1* entdeckt (Kutkowska-Kaźmierczak *et al.*, 2018; Mueller *et al.*, 2019). Ein weiterer Zusammenhang zwischen spinocerebellären Ataxien und der Genregulation von *Elovl1* konnte bei der SCA2 beschrieben werden: Trinukleotidexpansionen in *Ataxin-2* (*ATXN2*) führen zur SCA2 (Paulson *et al.*, 2017). *ATXN2* inhibiert vermutlich den mTORC1-Signalweg. Durch Trinukleotidexpansionen in *ATXN2* könnte die Expression von *Elovl1* über mTORC1 herunterreguliert werden (Sen *et al.*, 2019). Diese Ergebnisse legen den zentralen Stellenwert von *Elovl1* und anderen Elongase codierenden Genen im Zusammenhang mit dem Lipidstoffwechsel des Nervengewebes in Cerebellum und Rückenmark nahe.

5.3.2 Möglicher Erbgang von Varianten

Varianten in *ELOVL1* können vermutlich nicht nur autosomal-dominant vererbt werden. Die Vorauswahl der Patientenproben schloss aber divergente Erbgänge weitestgehend aus. Somit kann in dieser Untersuchung keine eindeutige Aussage zu andersartig

vererbten Varianten in *ELOVL1* getroffen werden. Allerdings sind Varianten jeglichen Erbgangs in diesem Gen insgesamt verhältnismäßig selten (1000 Genomes Project). Varianten in *STUB1* können sowohl zur autosomal-rezessiven spinocerebellären Ataxie 16 (SCAR16) als auch zur autosomal-dominant vererbten spinocerebellären Ataxie 48 (SCA48) führen (Genis *et al.*, 2018; Gazulla, 2020). Dieses Beispiel zeigt, dass Varianten in demselben Gen trotz unterschiedlicher Erbgänge zu ähnlichen Krankheitsbildern führen können, wenn auch divergierende Charakteristika, wie das Auftretsalter, je nach Erbgang prädominieren (Gazulla, 2020). Der Erbgang innerhalb einer Familie ist nicht allein wegweisend auf beteiligte Gene. Möglicherweise spielen auch *de-novo*-Varianten in *ELOVL1* eine entscheidende Rolle (Kutkowska-Kaźmierczak *et al.*, 2018; Mueller *et al.*, 2019).

5.4 Zusammenhang von Varianten in *ELOVL1*, 4 sowie 5 und der Pathogenese von spinocerebellären Ataxien

ELOVL4 und *ELOVL5* sind im Zusammenhang mit spinocerebellären Ataxien verstärkt untersucht worden. Nachdem die jeweils erste krankheitsauslösende Variante für SCA34 bzw. SCA38 nachgewiesen worden war (Cadieux-Dion *et al.*, 2014; Di Gregorio *et al.*, 2014), wurden weitere pathogene Varianten in *ELOVL4* und *ELOVL5* (Reith, 2017; Bourque *et al.*, 2018) beschrieben. Es konnte ein plausibler potentieller Kausalzusammenhang zwischen Variante und Entstehung der spinocerebellären Symptome postuliert werden (Bourque *et al.*, 2018; Brusco, Di Gregorio und Borroni, 2019).

Ein möglicher Pathomechanismus der SCA38 könnte in der Akkumulation von durch Aminosäure-Substitution fehlgefalteten *ELOVL5*-Proteinen liegen. Dies hätte vermutlich einen Einfluss auf die Homöostase der subzellularen Kompartimente (Di Gregorio *et al.*, 2014). So könnte es in einer Zelle mit mutiertem Allel zu einer erhöhten Konzentration von *ELOVL5* im Golgi-Apparat, aber zu einer erniedrigten Konzentration im endoplasmatischen Retikulum führen. Die physiologische Lokalisation des membranständigen Proteins ist aber hauptsächlich das endoplasmatische Retikulum (Di Gregorio *et al.*, 2014). Dadurch könnte die enzymatische Funktion des Proteins eingeschränkt sein (Hoxha *et al.*, 2017) und die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase möglicherweise gestört werden (Müller, 2021).

Allerdings ist der genaue zelluläre Mechanismus von SCA38 bislang unbekannt (Brusco, Di Gregorio und Borroni, 2019; Müller, 2021).

Untersuchungen ähnlicher, in die Fettsäuresynthese eingebundener Gene bzw. Enzyme deuten auf eine Korrelation zwischen Varianten in diesen Genen und Neurodegeneration hin. So korrelieren autosomal-rezessive Varianten in *FA2H* („*fatty acid 2-hydroxylase*“) mit dem Auftreten einer seltenen Unterform der Neurodegeneration mit Eisenablagerung im Gehirn (*neurodegeneration with brain iron accumulation*, NBIA) und hereditärer spastischer Paraplegie (SPG35) (Dick *et al.*, 2010; Kruer *et al.*, 2010; Rattay *et al.*, 2019).

5.4.2 Konservierung von *ELOVL1*

ELOVL1 besitzt ähnliche Eigenschaften wie ELOVL4 und ELOVL5. Eine pathogene Variante in *ELOVL1* gilt, wie bereits oben beschrieben, als krankheitsverursachend für ein Syndrom mit neurologischen Symptomen wie spastischer Paraplegie (Kutkowska-Kaźmierczak *et al.*, 2018; Mueller *et al.*, 2019). Dennoch ließen sich in dem Patientenkollektiv von 64 Patienten lediglich drei Varianten nachweisen, die allesamt voraussichtlich benigne oder wahrscheinlich benigne sind. Aufgrund der Seltenheit von Varianten in *ELOVL1* ist anzunehmen, dass das Protein ELOVL1 eine essenzielle Funktion für die Homöostase der Zellen des Menschen besitzt. Dafür spricht auch die konservierte Struktur innerhalb der Orthologie der Vertebraten (Bhandari *et al.*, 2016). Pathogene Varianten in *ELOVL1* sind insgesamt sehr selten (www.ensembl.org, Cunningham *et al.*, 2022). Tritt jedoch eine Variante mit Änderung des Genprodukts auf, ist vermutlich mit einer höheren Wahrscheinlichkeit von der Entstehung einer schwerwiegenden Erkrankung oder gar eines Abortes auszugehen.

In einer Studie der Arbeitsgruppe um Schackmann führte ein Gen-*Knockdown* von *ELOVL1* zu erniedrigten C26 Fettsäurespiegeln in Fibroblasten (Schackmann *et al.*, 2015). Durch einen Gen-*Knockdown* kommt es zu einer verminderten Expression eines Gens. Dabei wird das Gen aber anders als bei einem Gen-*Knockout* lediglich unvollständig inaktiviert (Rossi *et al.*, 2015). Eine Untersuchung mit *Elov1l*-defizienten Mäusen („Gen-*Knockout*“) ergab, dass dieser Defekt im Myelin zu einer reduzierten Kettenlänge von Sphingolipiden führte. Zudem zeigten sich im Tiermodell auch neurologische Symptome wie eine reduzierte, motorische Koordination (Isokawa *et al.*, 2019).

5.5 *ELOVL1*-Transkripte

Von *ELOVL1* sind bisher 16 verschiedene Transkriptvarianten bekannt, drei davon sind proteincodierend (siehe 1.7.5 Transkriptvarianten von *ELOVL1*). Von den drei proteincodierenden Transkripten codieren zwei (*ELOVL1-201* und *-216*) für die gleiche Anzahl an Aminosäuren, das Transkript *ELOVL1-202* ist kürzer (www.ensembl.org Release 104, Cunningham *et al.*, 2022). Ziel war es nun, die unterschiedlich langen Transkripte und ggf. weitere bisher unbekannte Transkriptvarianten in unterschiedlichen Geweben nachzuweisen und eine Aussage über die Verteilung in den Geweben zu treffen. In allen untersuchten Geweben ließen sich lediglich die Transkriptvarianten *ELOVL1-201* und *-216* nachweisen. Grund dafür könnte eine inadäquate oder rudimentäre Methodik oder die fehlende Expression dieser Transkriptvariante in den untersuchten Geweben sein.

5.6 Expression der Fettsäure-Elongasen

Die Fettsäure-Elongasen *ELOVL1-7* werden in verschiedenen Geweben unterschiedlich stark exprimiert, je nachdem, welche Fettsäureklassen gewebespezifisch vermehrt vorkommen. In 16 untersuchten humanen Geweben kamen Transkripte von *ELOVL1*, 5 und 6 ubiquitär vor. Die Konzentration von *ELOVL4*-mRNA hingegen ist je nach Studie in Thymus oder Retina am höchsten (Ohno *et al.*, 2010; Kihara, 2012). *ELOVL7*-mRNA wird in den meisten Geweben, außer im Herz- und Skelettmuskel, exprimiert. *ELOVL2*-mRNA wurde gewebspezifisch in hoher Konzentration in Leber und *Testes* nachgewiesen, wohingegen *ELOVL3* ausschließlich in den *Testes* nachgewiesen wurde (Ohno *et al.*, 2010).

Um die Funktion des *ELOVL1*-Gens sowie des Enzyms *ELOVL1* genauer analysieren zu können, wäre es weiterhin erforderlich, genaue Untersuchungen zur Expression in differenten Geweben, aber auch einzelnen Zellarten, durchzuführen. Möglicherweise schwankt die Konzentration von *ELOVL1*-mRNA in unterschiedlichen Zellen eines Gewebes. Dies könnte zu einem verzerrten Bild der Expression eines Gens im Gewebe führen, weil ein Durchschnittswert aller Zellen eines Gewebes entsteht. Auch muss der interindividuelle Unterschied berücksichtigt werden.

5.7 *ELOVL*-Proteine

Bioinformatische Modelle sagen membranständige *ELOVL*-Proteine voraus, welche entweder fünf oder sieben Transmembrandomänen (s. Abbildung 1.2, Abbildung 1.3,

Abbildung 1.5) sowie je ein katalytisches Histidinmotiv besitzen. Allerdings ist die präzise Struktur der Proteine, außer von ELOVL7, mangels Untersuchungen zur Kristallstruktur unbekannt (Kutkowska-Kazmierczak *et al.*, 2018; Deák *et al.*, 2019; Nie *et al.*, 2021).

ELOVL1, 3, 4, 6 und 7 sind an der Elongation von gesättigten Fettsäuren und einfach ungesättigten Fettsäuren beteiligt. ELOVL1 im Speziellen vermag gesättigte Fettsäuren (C18:0 bis C26:0) sowie einfach ungesättigte Fettsäuren (C20:1 (ω -9) und C22:1 (ω -9)) zu verlängern und ist somit die wichtigste Elongase zur Erzeugung von C24 Sphingolipiden (Ohno *et al.*, 2010; Kihara, 2012). ELOVL4 ist als einziges Mitglied der ELOVL-Familie in der Lage, sehr lange gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäuren mit über 26 bis 38 Kohlenstoffatomen zu synthetisieren, die im Gehirn, der Retina und in Spermatozoen vorkommen. Weil keine andere Elongase diese Fähigkeit besitzt, kann ein vollständiger Funktionsausfall nicht kompensiert werden (Kihara, 2012; Deák *et al.*, 2019). ELOVL2 und ELOVL5 hingegen sind ausschließlich für die Elongation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren verantwortlich (Kihara, 2012).

5.8 Ausblick

5.8.1 Neue Therapieansätze der spinocerebellären Ataxien

Bislang existiert keine kurative Therapie für spinocerebelläre Ataxien (Klockgether *et al.*, 2018; Buijsen *et al.*, 2019). Allerdings gibt es eine Reihe von potentiellen, erfolgsversprechenden kurativen und symptomatischen Therapieansätzen. Sie basieren auf dem Einsatz pharmakologischer Therapeutika sowie Gen- und Stammzelltherapie (Zesiewicz *et al.*, 2018; Buijsen *et al.*, 2019; Sullivan *et al.*, 2019).

5.8.2 Pharmakologische Therapie

Als pharmakologische Therapeutika kommen eine große Anzahl von Präparaten mit unterschiedlicher Wirkweise in Betracht, die v. a. als symptomatische und meist weniger spezifische Therapie eingesetzt werden können. In Studien allerdings zeigten nur wenige Präparate eine Wirksamkeit im Vergleich zum Placebo. Lediglich dem Einsatz von Riluzol konnte ein gewisser positiver Effekt (s. 1.6 Therapie der spinocerebellären Ataxien) nachgewiesen werden (Ristori, Romano und Visconti, 2010; Romano *et al.*, 2015). Bisher wurde keine Substanz zur Behandlung einer SCA zugelassen (Ashizawa, Öz und Paulson, 2018). Trotzdem bietet die Pharmakologie aufgrund von möglichen komplexen chemischen Strukturen eine fast unbegrenzte

Anzahl an potentiellen Substanzen, die maßgeschneidert an die Pathophysiologie der jeweiligen Form der Ataxie und die Symptome der Patienten entwickelt und eingesetzt werden könnten (Zesiewicz *et al.*, 2018; Klockgether, Mariotti und Paulson, 2019).

5.8.3 Gentherapie

Zur Gentherapie gehören die RNA-Interferenz (RNAi), Antisense-Oligonukleotide (ASOs) und Techniken der Genom-Editierung (Buijsen *et al.*, 2019).

Unter dem Begriff der RNA-Interferenz werden unterschiedliche Anwendungen mit microRNA (miRNA), short hairpin RNA (shRNA) und small interfering RNA (siRNA) zusammengefasst (Buijsen *et al.*, 2019). Diese größtenteils experimentell eingesetzten Methoden greifen in die Genregulation ein, indem sie Zielgene spezifisch stilllegen (*gene-silencing*) und dadurch den Pathomechanismus der Erkrankung abschwächen. Durch diesen sequenzspezifischen Eingriff in die Genregulation sollen unspezifische Nebenwirkungen verhindert werden (Chen *et al.*, 2018; Buijsen *et al.*, 2019). Eine Herausforderung dieser Methode besteht in der Stabilität und Applikationsweise der RNA. Diese muss an ihren Zielort in den Zellen gelangen, ohne zuvor zu zerfallen oder durch Endonukleasen abgebaut worden zu sein (Pecot *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2018). *In vitro* wird die RNA direkt in die Zellen injiziert (Fire *et al.*, 1998). Eine klinische Anwendung ist damit kaum möglich. Neuere Methoden basieren auf dem Transfer der RNA mittels subkutaner Injektion von Lipid-Nanopartikeln oder durch virale Vektoren (Chen *et al.*, 2018), wie bei einigen COVID-19-Impfstoffen (Zieneldien *et al.*, 2021).

Antisense-Oligonukleotide sind synthetisierte, aus wenigen Nukleotiden bestehende Oligomere, welche sequenzspezifisch an RNA binden und die Expression der Ziel-RNA über verschiedene Mechanismen verändern können (Evers, Toonen und van Roon-Mom, 2015; Bennett, 2019). Dieser Therapieansatz wird für einige neurodegenerative Erkrankungen wie spinale Muskelatrophie (SMA), amyotrophe Lateralsklerose (ALS) und Chorea Huntington klinisch erprobt (Bennett, Krainer und Cleveland, 2019; Silva *et al.*, 2020) und im Tiermodell für einige SCAs untersucht (Scoles *et al.*, 2017; Klockgether, Mariotti und Paulson, 2019). Nusinersen bspw. wurde durch FDA und EMA bereits 2017 für die Behandlung bestimmter Formen der spinalen Muskelatrophie zugelassen (Bennett, 2019; Bennett, Krainer und Cleveland, 2019).

Die Genomeditierung ist eine weitere Form der Gentherapie. Dazu zählt z. B. CRISPR-Cas9 (*clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR-associated*

protein 9) (Doudna und Charpentier, 2014). Mit dieser Technik lässt sich ein spezifischer DNA-Doppelstrangbruch an einer beliebigen Stelle durch die Endonuklease Cas9 durchführen. An diese Stelle kann dann eine veränderte DNA-Sequenz eingeführt werden (Doudna und Charpentier, 2014). So besteht bspw. die Möglichkeit, einzelne Nukleotide wie SNVs auszutauschen und durch die Sequenz des Wildtyps zu ersetzen (Doudna und Charpentier, 2014). Das mögliche Einsatzgebiet von Techniken wie CRISPR-Cas9 und anderen Verfahren der Genomeditierung ist groß und umfasst bspw. Therapien gegen Chorea Huntington und ALS (Baliou *et al.*, 2018; Raikwar *et al.*, 2019). Zukünftig könnte diese Technik als Grundlage für die Entwicklung einer Therapie von spinocerebellären Ataxien dienen (Ashizawa, Öz und Paulson, 2018; Raikwar *et al.*, 2019).

5.8.4 Stammzelltherapie

Der klinische Einsatz der Stammzelltherapie wird erforscht. In klinischen Phase I- und II-Studien für Patienten mit SCA1, 2 und 3 wurde die intravenöse oder intrathekale Gabe von humanen, mesenchymalen Stammzellen umbilikalen Ursprungs (UC-MSC) oder aus Fettgewebe gewonnenen Stammzellen untersucht (Sullivan *et al.*, 2019; Tamada, Watanabe und Muguruma, 2020). Gemessen an klinischen Scores wie SARA (*Scale for the Assessment und Rating of Ataxia*) und ICARS (*International Cooperative Ataxia Rating Scale*) verbesserte sich daraufhin die Symptomatik der Patienten innerhalb von sechs bis zwölf Monaten (Sullivan *et al.*, 2019; Appelt *et al.*, 2021). Dieser positive Effekt konnte jedoch in einer Metaanalyse nicht bestätigt werden, aber es traten auch keine bedeutenden Nebenwirkungen auf (Appelt *et al.*, 2021). Modifiziert könnte dieser Therapieansatz auch bei anderen SCAs zum Einsatz kommen (Sullivan *et al.*, 2019).

5.8.5 Zukünftiger Einsatz

Bevor die oben genannten Therapieansätze in Zukunft routinemäßig und erfolgreich gegen SCAs eingesetzt werden können, müssen Parameter zu Wirksamkeit und Sicherheit erforscht und sowohl optimiert als auch justiert werden. Außerdem bedarf es einer weitergehenden, umfassenden, ethischen Debatte, welche Methoden eingesetzt werden sollten. Desweiteren sind die bisher erforschten Therapieansätze v. a. für durch Trinukleotidexpansionen ausgelöste SCAs getestet worden, bei denen als Pathogenese eine Akkumulation von polyglutaminhaltigen Proteinen vermutet wird. Beispielsweise werden aber die SCA34 und SCA38 durch verschiedene SNVs in *ELOVL4* und *ELOVL5* ausgelöst (Di Gregorio *et al.*, 2014; Ozaki *et al.*, 2015). Vermutlich werden

die Therapieansätze wegen des divergenten Pathomechanismus (s. 1.7.3 Möglicher Pathomechanismus der SCA38) anders ausfallen (Ashizawa, Öz und Paulson, 2018).

5.8.6 Auswirkungen der Gendiagnostik

Das Procedere der molekulargenetischen Testung ist in Deutschland im Gesetz über genetische Untersuchungen am Menschen (Gendiagnostikgesetz- GenDG) geregelt. So muss neben der Einwilligung des Patienten (§8 GenDG) eine vollständige Aufklärung (nach §9 GenDG) erfolgen und dem Patienten sowie ggf. seinen biologischen Verwandten eine humangenetische Beratung (nach §10 GenDG) angeboten werden.

Zwar wächst die Anzahl der bekannten Ataxie *Genloci*, dennoch verbleibt die molekulargenetische Ursache bei rund einem Drittel der Familien mit ADCA unbekannt (Ruano *et al.*, 2014; Buijsen *et al.*, 2019). Für Patienten mit dem klinischen Bild einer progressiven Ataxie wird eine Stufendiagnostik (s. 1.5 Diagnose der hereditären Ataxien) durchgeführt. Bei unauffälligem Ergebnis eines spezifischen Tests und Ataxie-Panels kann eine weiterführende, genetische Testung mittels Exom-Sequenzierung (WES) durchgeführt werden (van de Warrenburg *et al.*, 2014; Klockgether *et al.*, 2019), was die Erfolgsrate einer Diagnose im Vergleich zu Ataxie-Panels verdoppeln kann (Galatolo *et al.*, 2018). Allerdings verbleibt auch damit ein mitunter beträchtlicher Anteil an Patienten ohne Diagnose einer genetischen Ursache (Nibbeling *et al.*, 2017). Komplexe Ataxie-Panels mit multiplen *Genloci* werden sich durchsetzen und durch den zunehmenden Einsatz von Techniken wie dem *Whole-Genome-Sequencing* (WGS) werden weitere krankheitsverursachende Varianten publiziert werden (Ashizawa *et al.*, 2018; Klockgether *et al.*, 2019; Sullivan *et al.*, 2019). Sofern DNA der Eltern des Betroffenen vorhanden oder verfügbar ist, kann durch Trioanalyse die Rate an detektierten neuen, relevanten Varianten beträchtlich erhöht werden (Richards *et al.*, 2015; Coutelier *et al.*, 2018). Dadurch werden zukünftig mehr Patienten eine exakte Diagnose erhalten, wodurch für diese Patienten auch kausal behandelbare Erkrankungen weitgehend ausgeschlossen werden können. Als weiteren Benefit werden mehr Patienten die genetische Ursache ihrer Erkrankung kennen. Für Betroffene kann es ernüchternd sein, dass aktuell keine Kausaltherapie angeboten werden kann. Dennoch ist das Verständnis des exakten Pathomechanismus für zukünftige Therapiestrategien der SCA-Subtypen essenziell (Ashizawa *et al.*, 2018; Klockgether *et al.*, 2019).

6. Zusammenfassung

Spinocerebelläre Ataxien (SCAs) zählen zu den neurodegenerativen Erkrankungen mit autosomal-dominanter Vererbung. Die Degeneration zeigt sich u. a. im Cerebellum. Symptomatisch stehen eine Stand- und Gangunsicherheit sowie Störungen der Bewegung und Koordination im Vordergrund, jedoch ist die Symptomatik heterogen. Die Anzahl an SCAs wächst und umfasst derzeit Varianten in ca. 37 Genen. Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob ein potentieller kausaler Zusammenhang zwischen Varianten in *ELOVL1* (*ELOVL fatty acid elongase 1*) und einer SCA besteht.

ELOVL1 codiert für eine Fettsäure-Elongase. Das RNA- und Protein-Expressionsmuster von *ELOVL1* in neuronalen Geweben lässt essentielle Funktionen in Hirngewebe vermuten. Vor dem Hintergrund, dass pathogene Varianten in zwei paralogen Genen von *ELOVL1* in die Pathophysiologie von SCA34 und 38 involviert sind, erscheint eine bedeutsame Rolle von *ELOVL1* denkbar. Unterstützt wird diese Hypothese durch den Nachweis einer *single nucleotide variant* (SNV) in *ELOVL1*, welche ein komplexes neurologisches Syndrom mit spastischer Paraplegie (IKSHD) auslöst.

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurde die DNA von Ataxie-Patienten mit vermutetem autosomal-dominanten Erbgang aus 64 Blutproben extrahiert, mittels PCR vervielfältigt, sequenziert und retrospektiv auf benigne und pathogene Varianten in *ELOVL1* untersucht. Zuvor waren Proben mit Repeatexpansionen, SNVs sowie Deletionen von dieser Untersuchung exkludiert worden. Lediglich bei vier Patienten ließen sich drei Varianten in *ELOVL1* mit geringen *minor allele frequencies* von < 0,01 nachweisen. Jedoch ergab sich kein Hinweis auf pathogene Varianten. *ELOVL1* sollte dennoch in Ataxie-Panels integriert werden, um neue Varianten eruieren zu können.

Um eine Aussage über die Transkription von *ELOVL1* in unterschiedlichen Geweben treffen zu können, wurde RNA aus differenten humanen Geweben in cDNA umgeschrieben und partiell sequenziert. Neben drei proteincodierenden Transkriptvarianten sind 13 Transkripte für *long non-coding* RNA beschrieben. In dieser Untersuchung konnte lediglich das proteincodierende Transkript *ELOVL1-201* nachgewiesen werden, nicht jedoch *ELOVL1-202*. Weitere Untersuchungen zur gewebspezifischen Transkription von *ELOVL1* sollten erfolgen.

7. Summary

Spinocerebellar Ataxias (SCAs) are neurodegenerative, autosomal dominant disorders. Degeneration appears in the cerebellum. Common symptoms are gait, truncal, and limb ataxia, loss of balance and coordination. However, symptoms are heterogeneous. The number of known SCAs increases with variants in approximately 37 genes. Aim of this research was to find out whether there is a causal correlation between variants in *ELOVL1* (*ELOVL fatty acid elongase 1*) and SCA.

ELOVL1 encodes for a fatty acid elongase. The RNA- and protein expression of *ELOVL1* in neuronal tissues suggests essential functions in those tissues. Pathogenic variants in two paralogous genes of *ELOVL1* are involved in the pathophysiology of SCA34 and 38. Therefore it is possible that *ELOVL1* plays also a crucial role. This hypothesis is supported due to the fact, that a *de novo* *ELOVL1* variant causes a complex neurological syndrome with spastic paraplegia (IKSHD).

In this study the DNA of 64 ataxia patients with autosomal dominant inheritance was extracted, amplified by PCR, and sequenced. The presence of benign and pathogenic variants in *ELVOL1* was examined. Specimens with repeat expansions, SNVs, and deletions were excluded from this study prior to testing. Overall, only three variants were found in four patients with *minor allele frequencies* < 0.01. However, there was no evidence of pathogenic variants. Nevertheless, *ELOVL1* should be included in ataxia panels to determine new variants.

To elicit information about the transcription of *ELOVL1* in different human tissues, cDNA was synthesized from RNA, via reverse transcription, and was finally sequenced partially. Three protein-coding transcripts and 13 transcripts of *long non-coding* RNA are described. In this investigation protein-coding transcript *ELOVL1-201* was the only experimentally verified transcript but not *ELOVL1-202*. Further studies should consider tissue-specific transcription of *ELOVL1*.

8. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACMG	American College of Medical Genetics and Genomics
ADCA	Autosomal-dominante cerebelläre Ataxie
ARCA	Autosomal-rezessive cerebelläre Ataxie
AS	Aminosäure
ASO	Antisense-Oligonukleotid
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cCT	kraniale Computertomographie
cDNA	komplementäre DNA (<i>engl.</i> complementary DNA)
cMRT	kraniale Magnetresonanztomographie
COVID-19	Coronavirus-Krankheit-2019 (<i>engl.</i> coronavirus disease 2019)
CTP	Cytidintriphosphat
d...	Desoxy...
dd...	Didesoxy...
d. h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>engl.</i> Desoxyribonucleic acid)
DRPLA	Dentatorubrale-pallidolysiale Atrophie
DTT	Dithiotreitol
EA	Episodische Ataxie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKV	Erythrokeratoderma variabilis
<i>ELOVL</i>	Elongation sehr langkettiger Fettsäuren (<i>engl.</i> <i>elongation of very long-chain fatty acids</i>)
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur (<i>engl.</i> European Medicines Agency)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
etc.	et cetera
...F	<i>Forward</i> (vorwärts)
FDA	U. S. Food and Drug Administration (US-amerikanische Behörde für Lebens- und Arzneimittel)
FXS	Fragiles-X-Syndrom
FXTAS	Fragiles-X-Tremor-Ataxie-Syndrom
GenDG	Gesetz über genetische Untersuchungen bei Menschen (Gendiagnostikgesetz)
ggf.	gegebenenfalls
GTP	Guanosintriphosphat
HGNC	The HUGO Gene Nomenclature Committee
HGVS	Human Genome Variation Society

ICARS	International Cooperative Ataxia Rating Scale
IKSHD	ichthyotic keratoderma, spasticity, hypomyelination, and dysmorphic facial features [Syndrom]
Indel	gleichzeitige Insertion und Deletion von mindestens zwei Nukleotiden
ISQMR	Ichthyosis, spastische Quadriplegie und mentale Retardierung
IUB(MB)	Internationale Vereinigung für Biochemie (und Molekularbiologie) (<i>engl.</i> International Union of Biochemistry (and Molecular Biology))
IUPAC	Internationale Union für reine und angewandte Chemie (<i>engl.</i> International Union of Pure and Applied Chemistry)
kb	Kilobase
lncRNA	<i>long non-coding RNA</i>
M.	Morbus
MAF	Minor allele frequency
MSA-C	Multisystematrophie vom cerebellären Typ
nt	Nukleotid
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>engl.</i> polymerase chain reaction)
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PUFA	mehrfach ungesättigte Fettsäure (<i>engl.</i> polyunsaturated fatty acid)
...R	<i>Reverse</i> (rückwärts)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>engl.</i> ribonucleic acid)
RT	Reverse Transkriptase
s.	siehe
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
SAOA	Sporadische, im Erwachsenenalter beginnende Ataxie unbekannter Ätiologie (<i>engl.</i> sporadic adult-onset ataxia)
SARA	Scale for the Assessment and Rating of Ataxia
SCA	spinocerebelläre Ataxie
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (<i>engl.</i> single nucleotide polymorphism)
SNV	Einzelnukleotid-Variante (<i>engl.</i> single nucleotide variant)
sog.	sogenannte
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
tlw.	teilweise
Tris	Trishydroxymethylaminomethan (C ₄ H ₁₁ NO ₃)
TTP	Thymidintriphosphat
u. a.	unter anderem
v. a.	vor allem
VLCFA	sehr langkettige Fettsäure (<i>engl.</i> very-long-chain fatty acid)
VUS	Varianten unklarer Signifikanz (s. ACMG-Richtlinie)
WES	<i>Whole-Exome-Sequencing</i>
WGS	<i>Whole-Genome-Sequencing</i>
z. B.	zum Beispiel

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Schematische Darstellung des Fehlfaltungsmechanismus von Proteinen durch Trinukleotidexpansion	6
Abbildung 1.2 Schematische Darstellung der Sekundärstruktur von ELOVL4.....	12
Abbildung 1.3 Schematische Darstellung der Sekundärstruktur von ELOVL5.....	13
Abbildung 1.4 Idiogramm des humanen Chromosoms 1 und die proteincodierenden Transkriptvarianten von <i>ELOVL1</i>	15
Abbildung 1.5 Schematische Darstellung der Sekundärstruktur von ELOVL1.....	15
Abbildung 1.6 Berechnete Quartärstruktur von ELOVL1	17
Abbildung 3.1 Schritte der PCR.....	26
Abbildung 3.2 Schema der (quasi-)exponentiellen Vervielfachung der PCR.....	28
Abbildung 3.3 Schematische Darstellung der Primer-Bindungsstellen an <i>ELOVL1</i>	28
Abbildung 3.4 Enzymatisches Cleanup.....	33
Abbildung 4.1 Gelelektrophoretische Auftrennung und Darstellung der fluoreszenzmarkierten Banden (ELOVL1, Exon 8)	42
Abbildung 4.2 Nachweis der Variante c.46+25T>C, Patient SCA331	45
Abbildung 4.3 Nachweis der Variante c.46+25T>C, Patient SCA1120	45
Abbildung 4.4 Nachweis der Variante c.105C>T, Patient SCA723	46
Abbildung 4.5 Nachweis der Variante c.*163C>T, Patient SCA669	49
Abbildung 4.6 Zusammenstellung der nachgewiesenen Varianten in <i>ELOVL1</i>	50
Abbildung 4.7 Vergleich unterschiedlicher Annealing-Temperaturen	52
Abbildung 4.8 PCR an cDNA von <i>ELOVL1</i> mit den Primern cEx4F und cEx8R.....	53
Abbildung 4.9 PCR der proteincodierenden <i>ELOVL1</i> -Transkripte im Vergleich	53
Abbildung 4.10 PCR an cDNA von <i>ELOVL1</i> mit den Primern cEx3F und cEx8R.....	54
Abbildung 4.11 PCR an <i>ELOVL1</i> -cDNA mit den Primern cEx3F und cInt5R	55
Abbildung 4.12 GereinigtercDNA der PCR mit Primern cEx3F und cInt5R	56
Abbildung 4.13 Unterschiedliche Produktgrößen der PCR an cDNA von <i>ELOVL1-201</i> mit den Primern cEx3F und cInt5R.	56
Abbildung 4.14 Finaler Vergleich der PCR von unterschiedlich stark exprimierten <i>ELOVL1-201</i> Transkripten.....	57

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 Autosomal-dominante spinocerebelläre Ataxien	7
Tabelle 1.2 Transkriptvarianten von <i>ELOVL1</i>	16
Tabelle 2.1 Chemikalien/ Enzyme	18
Tabelle 2.2 Chemikalien und Enzyme für die RNA-Isolation und cDNA-Synthese	18
Tabelle 2.3 Verwendete Kits	19
Tabelle 2.4 Geräte und Verbrauchsartikel	19
Tabelle 2.5 Sequenzer und Zubehör	21
Tabelle 2.6 DNA-Oligonukleotid-Primer (<i>ELOVL1</i> -Gen)	21
Tabelle 2.7 DNA-Oligonukleotid-Primer für PCR und Sequenzierung von cDNA	22
Tabelle 2.8 Nukleotid-Mix	22
Tabelle 2.9 Computerprogramme	22
Tabelle 2.10 Isolierte Gesamt-RNA aus unterschiedlichen Geweben	22
Tabelle 3.1 PCR-Bedingungen	29
Tabelle 3.2 Annealing Temperaturen	29
Tabelle 3.3 Pipettierschema der PCR-Mastermixe	30
Tabelle 3.4 Agarosekonzentrationen in Abhängigkeit von der Kettenlänge	31
Tabelle 3.5 Herstellung des 10×TBE-Puffer	32
Tabelle 3.6 Bedingungen für das <i>Cycle Sequencing</i>	35
Tabelle 3.7 Verwendete Sequenzierprimer	35
Tabelle 3.8 Reaktionsbedingungen für die reverse Transkription	39
Tabelle 3.9 PCR der cDNA	39
Tabelle 3.10 cDNA-Fragmente (Amplikons) und ihre Größen	39
Tabelle 4.1 Einteilung der bekannten Varianten in Exon 2	44
Tabelle 4.2 Einteilung der bekannten Varianten in Exon 4	47
Tabelle 4.3 Einteilung der bekannten Varianten in Exon 6	47
Tabelle 4.4 Einteilung der bekannten Varianten in Exon 7	48
Tabelle 4.5 Zusammenfassung aller in dieser Arbeit nachgewiesenen Varianten	51
Tabelle 12.1 Verwendete physikalische und chemische Einheiten und Konstanten	87
Tabelle 12.2 Nomenklatur für Nukleinsäuren	87

11. Literaturverzeichnis

- Amberger JS, Bocchini CA, Scott AF, Hamosh A. OMIM.org: Leveraging knowledge across phenotype-gene relationships. *Nucleic Acids Res* 2019; 47: D1038–43.
- Appelt PA, Comella K, de Souza LAPS, Luvizutto GJ. Effect of stem cell treatment on functional recovery of spinocerebellar ataxia: systematic review and meta-analysis. *Cerebellum and Ataxias* 2021; 8: 1–9.
- Ashizawa T, Öz G, Paulson HL. Spinocerebellar ataxias: prospects and challenges for therapy development. *Nat Rev Neurol* 2018; 14: 590–605.
- Auton A, Abecasis GR, Altshuler DM, Durbin RM, Bentley DR, Chakravarti A, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature* 2015; 526: 68–74.
- Baliou S, Adamaki M, Kyriakopoulos AM, Spandidos DA, Panayiotidis M, Christodoulou I, et al. CRISPR therapeutic tools for complex genetic disorders and cancer (Review). *Int J Oncol* 2018; 53: 443–68.
- Bateman A, Martin MJ, Orchard S, Magrane M, Agivetova R, Ahmad S, et al. UniProt: The universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res* 2021; 49: D480–9.
- Beaudin M, Klein CJ, Rouleau GA, Dupré N. Systematic review of autosomal recessive ataxias and proposal for a classification. *Cerebellum and Ataxias* 2017; 4: 1–12.
- Beaudin M, Matilla-Dueñas A, Soong BW, Pedroso JL, Barsottini OG, Mitoma H, et al. The Classification of Autosomal Recessive Cerebellar Ataxias: a Consensus Statement from the Society for Research on the Cerebellum and Ataxias Task Force. *Cerebellum* 2019; 18: 1098–125.
- Bell JR. A simple way to treat PCR products prior to sequencing using ExoSAP-IT®. *Biotechniques* 2008; 44: 834.
- Bennett CF. Therapeutic antisense oligonucleotides are coming of age. *Annu Rev Med* 2019; 70: 307–21.
- Bennett CF, Krainer AR, Cleveland DW. Antisense Oligonucleotide Therapies for Neurodegenerative Diseases. *Annu Rev Neurosci* 2019; 42: 385–406.
- Bhandari S, Lee JN, Kim Y Il, Nam IK, Kim SJ, Kim SJ, et al. The fatty acid chain elongase, Elovl1, is required for kidney and swim bladder development during zebrafish embryogenesis. *Organogenesis* 2016; 12: 78–93.
- Bird TD. Hereditary Ataxia Overview. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews*® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1998 Oct 28 [Updated 2019 Jul 25]; S. 1993–2020.
- Blake RD, Delcourt SG. Thermodynamic effects of formamide on DNA stability. *Nucleic Acids Res* 1996; 24: 2095–103.
- Borroni B, Di Gregorio E, Orsi L, Vaula G, Costanzi C, Tempia F, et al. Clinical and neuroradiological features of spinocerebellar ataxia 38 (SCA38). *Park Relat Disord* 2016; 28: 80–6.
- Böttcher D, Peter MG. Agarose [Internet]. Roempp-Lexikon Chemie, 2012. Verfügbar unter: www.roempp.thieme.de/roempp4.0/do/data/RD-01-01028

- Bourassa C V, Meijer IA, Merner ND, Grewal KK, Stefanelli MG, Hodgkinson K, et al. VAMP1 mutation causes dominant hereditary spastic ataxia in newfoundland families. *Am J Hum Genet* 2012; 91: 548–52.
- Bourassa C V., Raskin S, Serafini S, Teive HAG, Dion PA, Rouleau GA. Mutation in a Case of Spinocerebellar Ataxia With Erythrokeratoderma. *JAMA Neurol* 2015; 72: 942–3.
- Bourque PR, Warman-Chardon J, Lelli DA, Laberge L, Kirshen C, Bradshaw SH, et al. Novel *ELOVL4* mutation associated with erythrokeratoderma and spinocerebellar ataxia (SCA 34). *Neurol Genet* 2018; 4: 1–5.
- Brooker SM, Edamakanti CR, Akasha SM, Kuo SH, Opal P. Spinocerebellar ataxia clinical trials: opportunities and challenges. *Ann Clin Transl Neurol* 2021; 8: 1543–56.
- Brusco A, Di Gregorio E, Borroni B. Spinocerebellar Ataxia Type 38. In: *GeneReviews®*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, Amemiya A; 2019. S. 1–12
- Buijsen RAM, Toonen LJA, Gardiner SL, van Roon-Mom WMC. Genetics, Mechanisms, and Therapeutic Progress in Polyglutamine Spinocerebellar Ataxias. *Neurotherapeutics* 2019; 16: 263–86.
- Cabal-Herrera AM, Tassanakijpanich N, Salcedo-Arellano MJ, Hagerman RJ. Fragile X-associated tremor/ataxia syndrome (FXTAS): Pathophysiology and clinical implications. *Int J Mol Sci* 2020; 21: 1–23.
- Cadieux-Dion M, Turcotte-Gauthier M, Noreau A, Martin C, Meloche C, Gravel M, et al. Expanding the Clinical Phenotype Associated With *ELOVL4* Mutation. *JAMA Neurol* 2014; 71: 470–5.
- Chatterjee S, Pal JK. Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases. *Biol Cell* 2009; 101: 251–62.
- Chen X, Mangala LS, Rodriguez-Aguayo C, Kong X, Lopez-Berestein G, Sood AK. RNA Interference–Based Therapy and Its Delivery Systems. *Cancer Metastasis Rev* 2018; 37: 107–24.
- Choi K-D, Choi J-H. Episodic Ataxias: Clinical and Genetic Features. *J Mov Disord* 2016; 9: 129–35.
- Cleland WW. Dithiothreitol, a New Protective Reagent for SH Groups. *Biochemistry* 1964; 3: 480–2.
- Condit CM, Achter PJ, Lauer I, Sefcovic E. The changing meanings of ‘mutation:’ A contextualized study of public discourse. *Hum Mutat* 2002; 19: 69–75.
- Cotton RGH. Communicating ‘mutation:’ Modern meanings and connotations. *Hum Mutat* 2002; 19: 2–3.
- Coutelier M, Hammer MB, Stevanin G, Monin ML, Davoine CS, Mochel F, et al. Efficacy of exome-targeted capture sequencing to detect mutations in known cerebellar ataxia genes. *JAMA Neurol* 2018; 75: 591–9.
- Cunningham F, Allen JE, Allen J, Alvarez-Jarreta J, Amode MR, Armean IM, et al. Ensembl 2022. *Nucleic Acids Res* 2022; 50: D988–95.

- Członkowska A, Litwin T, Dusek P, Ferenci P, Lutsenko S, Medici V, et al. Wilson disease. *Nat Rev Dis Prim* 2018; 4
- Deák F, Anderson RE, Fessler JL, Sherry DM. Novel Cellular Functions of Very Long Chain-Fatty Acids: Insight From ELOVL4 Mutations. *Front Cell Neurosci* 2019; 13
- Dechert U. Gelelektrophoresen. In Jansohn M, Rothhämel S. Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. 5. Auflage, S. 37-93. Spektrum; 2012. ISBN 978-3-8274-2429-7.
- Deutscher Bundestag. Gesetz über genetische Untersuchungen bei Menschen (Gendiagnostikgesetz – GenDG). *Jahrb für Wiss und Ethik* 2009; 14: 347–62.
- Dick KJ, Eckhardt M, Paisán-Ruiz C, Alshehhi AA, Proukakis C, Sibbain NA, et al. Mutation of FA2H underlies a complicated form of hereditary spastic paraplegia (SPG35). *Hum Mutat* 2010; 31: 1251–60.
- Dieffenbach CW, Lowe TMJ, Dveksler GS. General Concepts for PCR Primer Design. *Cold Spring Harb Lab Press* 1993
- Diociaiuti A, Martinelli D, Nicita F, Cesario C, Pisaneschi E, Macchiaiolo M, et al. Two italian patients with ELOVL4-related neuro-ichthyosis: Expanding the genotypic and phenotypic spectrum and ultrastructural characterization. *Genes* 2021; 12: 1–9.
- Donato L, Scimone C, Rinaldi C, Aragona P, Briuglia S, D’Ascola A, et al. Stargardt phenotype associated with two *ELOVL4* promoter variants and *ELOVL4* downregulation: New possible perspective to etiopathogenesis? *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2018; 59: 843–57.
- Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* (80-) 2014; 346
- den Dunnen JT, Dalglish R, Maglott DR, Hart RK, Greenblatt MS, McGowan-Jordan J, et al. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Hum Mutat* 2016; 37: 564–9.
- Durr A. Autosomal dominant cerebellar ataxias: Polyglutamine expansions and beyond. *Lancet Neurol* 2010; 9: 885–94.
- Dusek P, Litwin T, Członkowska A. Neurologic impairment in Wilson disease. *Ann Transl Med* 2019; 7: S64–S64.
- Encarnação M, Coutinho MF, Cho SM, Cardoso MT, Ribeiro I, Chaves P, et al. NPC1 silent variant induces skipping of exon 11 (p.V562V) and unfolded protein response was found in a specific Niemann-Pick type C patient. *Mol Genet Genomic Med* 2020; 8: 1–13.
- Evers MM, Toonen LJA, van Roon-Mom WMC. Antisense oligonucleotides in therapy for neurodegenerative disorders. *Adv Drug Deliv Rev* 2015; 87: 90–103.
- Feil K, Adrion C, Boesch S, Doss S, Giordano I, Hengel H, et al. Safety and Efficacy of Acetyl-DL-Leucine in Certain Types of Cerebellar Ataxia: The ALCAT Randomized Clinical Crossover Trial. *JAMA Netw Open* 2021; 4
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391: 806–11.

- Frackman BS, Kobs G, Simpson D, Storts D, Corporation P. Betaine and DMSO : Enhancing Agents for PCR. *Promega Notes* 1998; 9–12.
- Galatolo D, Tessa A, Filla A, Santorelli FM. Clinical application of next generation sequencing in hereditary spinocerebellar ataxia: increasing the diagnostic yield and broadening the ataxia-spasticity spectrum. A retrospective analysis. *Neurogenetics* 2018; 19
- Gazulla J. Spinocerebellar ataxia type 48: last but not least. *Neurol Sci* 2020; 41: 2423–32.
- Genis D, Ortega-Cubero S, Nicolas HS, Corral J, Gardenyes J, De Jorge L, et al. Heterozygous STUB1 mutation causes familial ataxia with cognitive affective syndrome (SCA48). *Neurology* 2018; 91: E1988–98.
- Gerard GF, D'Alessio JM, Kotewicz ML, Noon MC. Influence on Stability in *Escherichia coli* of the Carboxy-Terminal Structure of Cloned Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase. *DNA* 1986; 5: 271–9.
- Ghaaheri M, Kahrizi D, Yari K, Babaie A, Suthar RS, Kazemi E. A comparative evaluation of four DNA extraction protocols from whole blood sample. *Cell Mol Biol* 2016; 62: 120–4.
- Giordano I, Harmuth F, Jacobi H, Paap B, Vielhaber S, MacHts J, et al. Clinical and genetic characteristics of sporadic adult-onset degenerative ataxia. *Neurology* 2017; 89: 1043–9.
- Green MR, Sambrook J. Polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Protoc* 2019; 2019: 436–56.
- Di Gregorio E, Borroni B, Giorgio E, Lacerenza D, Ferrero M, Lo Buono N, et al. *ELOVL5* mutations cause spinocerebellar ataxia 38. *Am J Hum Genet* 2014; 95: 209–17.
- Griffiths L, Chacon-Cortes D. Methods for extracting genomic DNA from whole blood samples: current perspectives. *J Biorepository Sci Appl Med* 2014; 1.
- Hacke W. Neurologie. 14. Auflage. Springer-Verlag Heidelberg Berlin; 2016. ISBN 978-3-662-46891-3.
- Harding AE. The Clinical Features and Classification of the Late Onset Autosomal Dominant Cerebellar Ataxias. *Brain* 1982; 105: 1–28.
- Harding AE. Classification of the Hereditary Ataxias and Paraplegias. *Lancet* 1983; 321: 1151–5.
- von Heijne G. Signal sequences. The limits of variation. *J Mol Biol* 1985; 184: 99–105.
- Hekman KE, Yu GY, Brown CD, Zhu H, Du X, Gervin K, et al. A conserved eEF2 coding variant in SCA26 leads to loss of translational fidelity and increased susceptibility to proteostatic insult. *Hum Mol Genet* 2012; 21: 5472–83.
- Henke W, Herdel K, Jung K, Schnorr D, Loening SA. Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 3957–8.
- Hoxha E, Gabriele RMC, Balbo I, Ravera F, Masante L, Zambelli V, et al. Motor deficits and cerebellar atrophy in *Elovl5* knock out mice. *Front Cell Neurosci* 2017; 11: 1–11.

- Ilg W, Bastian AJ, Boesch S, Burciu RG, Celmik P, Claaße J, et al. Consensus Paper: Management of Degenerative Cerebellar Disorders. *Cerebellum* 2014; 13: 248–68.
- Implen: NanoPhotometer ® NP80/N60/N50/C40 User Manual. 2015, verfügbar unter: www.implen.de/wp-content/uploads/downloads/User-Manual-V3.1.1_NP80_N60_N50_C40-17_08_22.pdf; abgerufen am 18.02.2022.
- Ishikawa K, Nagai Y. Molecular Mechanisms and Future Therapeutics for Spinocerebellar Ataxia Type 31 (SCA31). *Neurotherapeutics* 2019; 16: 1106–14.
- Isokawa M, Sassa T, Hattori S, Miyakawa T, Kihara A. Reduced chain length in myelin sphingolipids and poorer motor coordination in mice deficient in the fatty acid elongase Elovl1. *FASEB BioAdvances* 2019; 1: 747–59.
- Jakobsson A, Westerberg R, Jacobsson A. Fatty acid elongases in mammals: Their regulation and roles in metabolism. *Prog Lipid Res* 2006; 45: 237–49.
- Jayadev S, Bird TD. Hereditary ataxias: overview. *Genet Med* 2013; 15: 673–83.
- Kihara A. Very long-chain fatty acids: Elongation, physiology and related disorders. *J Biochem* 2012; 152: 387–95.
- Kim DH, Kim R, Lee JY, Lee KM. Clinical, imaging, and laboratory markers of premanifest spinocerebellar ataxia 1, 2, 3, and 6: A systematic review. *J Clin Neurol* 2021; 17: 187–99.
- Klockgether T, et al. Ataxien des Erwachsenenalters, S1-Leitlinie, 2018, in: Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Verfügbar unter: www.dgn.org/leitlinien/11-030-031-ataxien-des-erwachsenenalters-2018; abgerufen am 15.02.2022.
- Klockgether T, Mariotti C, Paulson HL. Spinocerebellar ataxia. *Nat Rev Dis Prim* 2019; 5: 1–21.
- Kondrashov AS, Rogozin IB. Context of Deletions and Insertions in Human Coding Sequences. *Hum Mutat* 2004; 23: 177–85.
- Kotewicz ML, D'Alessio JM, Driftmier KM, Blodgett KP, Gerard GF. Cloning and overexpression of Maloney murine leukemia virus reverse transcriptase in *Escherichia coli*. *Gene* 1985; 35: 249–58.
- Kruer MC, Paisán-Ruiz C, Boddaert N, Yoon MY, Hama H, Gregory A, et al. Defective *FA2H* Leads to a Novel Form of Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation (NBIA). *Ann Neurol* 2010; 68: 611–8.
- Kurreck J, Lottspeich F, Engels JW (Hrsg.). Bioanalytik. 4. Auflage. Springer Spektrum; 2022. ISBN 978-3-662-61706-9.
- Kutkowska-Kaźmierczak A, Rydzanicz M, Chlebowski A, Kłosowska-Kosicka K, Mika A, Gruchota J, et al. Dominant *ELOVL1* mutation causes neurological disorder with ichthyotic keratoderma, spasticity, hypomyelination and dysmorphic features. *J Med Genet* 2018; 55: 408–14.
- Landrum MJ, Chitipiralla S, Brown GR, Chen C, Gu B, Hart J, et al. ClinVar: Improvements to accessing data. *Nucleic Acids Res* 2020; 48: D835–44.

- Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp* 2012; 1–5.
- van de Leemput J, Wavrant-De Vrièze F, Rafferty I, Bras J, Giunti P, Fisher E, et al. Sequencing analysis of the *ITPR1* gene in a pure autosomal dominant spinocerebellar ataxia series. *Mov Disord* 2011; 25: 763–5.
- Li Q, Wang K. InterVar: Clinical Interpretation of Genetic Variants by the 2015 ACMG-AMP Guidelines. *Am J Hum Genet* 2017; 100: 267–80.
- Liebisch G, Fahy E, Aoki J, Dennis EA, Durand T, Ejsing CS, et al. Update on LIPID MAPS classification, nomenclature, and shorthand notation for MS-derived lipid structures. *J Lipid Res* 2020; 61: 1539–55.
- Lieto M, Roca A, Santorelli FM, Fico T, De Michele G, Bellofatto M, et al. Degenerative and acquired sporadic adult onset ataxia. *Neurol Sci* 2019; 1335–42.
- Life Technologies: RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor. 2011. Verfügbar unter: www.thermofisher.com/order/catalog/product/10777019; abgerufen am 16.02.2022.
- Lorenz TC. Polymerase Chain Reaction : Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *J Vis Exp* 2012; 1–15.
- Martín-Alonso S, Frutos-Beltrán E, Menéndez-Arias L. Reverse Transcriptase: From Transcriptomics to Genome Editing. *Trends Biotechnol* 2021; 39: 194–210.
- Mills RE, Luttig CT, Larkins CE, Beauchamp A, Tsui C, Pittard WS, et al. An initial map of insertion and deletion (INDEL) variation in the human genome. *Genome Res* 2006; 16: 1182–90.
- Moon YA, Hammer RE, Horton JD. Deletion of *ELOVL5* leads to fatty liver through activation of SREBP-1c in mice. *J Lipid Res* 2009; 50: 412–23.
- Mueller N, Sassa T, Morales-Gonzalez S, Schneider J, Salchow DJ, Seelow D, et al. De novo mutation in *ELOVL1* causes ichthyosis, acanthosis nigricans, hypomyelination, spastic paraplegia, high frequency deafness and optic atrophy. *J Med Genet* 2019; 56: 164–75.
- Mülhardt C. Der Experimentator: Molekularbiologie Genomics. 7. Auflage. Springer Spektrum; 2013. ISBN 978-3-642-34635-4
- Müller U. Spinocerebellar ataxias (SCAs) caused by common mutations. *Neurogenetics* 2021; 22: 235–50.
- Negi S, Pandey S, Srinivasan SM, Mohammed A, Guda C. LocSigDB: A database of protein localization signals. *Database* 2015; 2015: 1–7.
- Németh AH, Kwasniewska AC, Lise S, Parolin Schneckenberg R, Becker EBE, Bera KD, et al. Next generation sequencing for molecular diagnosis of neurological disorders using ataxias as a model. *Brain* 2013; 136: 3106–18.
- Nethisinghe S, Pigazzini ML, Pemble S, Sweeney MG, Labrum R, Manso K, et al. PolyQ tract toxicity in SCA1 is length dependent in the absence of CAG repeat interruption. *Front Cell Neurosci* 2018; 12: 1–8.

- New England Biolabs: Monarch® DNA Gel Extraction Kit, 2016. Verfügbar unter: www.neb.com/T1020; abgerufen am 16.02.2022.
- Nibbeling EAR, Duarri A, Verschuuren-Bemelmans CC, Fokkens MR, Karjalainen JM, Smeets CJLM, et al. Exome sequencing and network analysis identifies shared mechanisms underlying spinocerebellar ataxia. *Brain* 2017; 140: 2860–78.
- Nie L, Pascoa TC, Pike ACW, Bushell SR, Quigley A, Ruda GF, et al. The structural basis of fatty acid elongation by the ELOVL elongases. *Nat Struct Mol Biol* 2021; 28: 512–20.
- Nippon Genetics Europe: Midori Green Advanced Protocol. Verfügbar unter: www.bulldog-bio.com/nippon_genetics/midorigreenadvancedprotocol.pdf; abgerufen am 16.02.2022.
- Nolte D, Kang JS, Hofmann A, Schwaab E, Krämer HH, Müller U. Mutations in MT-ATP6 are a frequent cause of adult-onset spinocerebellar ataxia. *J Neurol* 2021; 268: 4866–73.
- Nolte D, Müller U. Punktmutationen und Deletionen bei spinocerebellären Ataxien. *Neuroforum* 2006; 4: 260–5.
- Nomenclature committee for the International Union of Biochemistry (NC-IUB). Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences. Recommendations 1984. *Eur J Biochem* 1985; 83: 4–8.
- Ohno Y, Suto S, Yamanaka M, Mizutani Y, Mitsutake S, Igarashi Y, et al. ELOVL1 production of C24 acyl-CoAs is linked to C24 sphingolipid synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 18439–44.
- Ozaki K, Ansai A, Nobuhara K. Prevalence and clinico-radiological features of spinocerebellar ataxia type 34 in a Japanese ataxia cohort. *Park Relat Disord* 2019; 65: 238–242.
- Ozaki K, Doi H, Mitsui J, Sato N, Iikuni Y, Majima T, et al. A novel mutation in *ELOVL4* leading to spinocerebellar ataxia (SCA) with the hot cross bun sign but lacking erythrokeratoderma: A broadened spectrum of SCA34. *JAMA Neurol* 2015; 72: 797–805.
- Ozaki K, Irioka T, Uchihara T, Yamada A, Nakamura A, Majima T, et al. Neuropathology of SCA34 showing widespread oligodendroglial pathology with vacuolar white matter degeneration: a case study. *Acta Neuropathol Commun* 2021; 9: 1–16.
- Paulson HL, Shakkottai VG, Clark HB, Orr HT. Polyglutamine spinocerebellar ataxias - from genes to potential treatments. *Nat Rev Neurosci* 2017; 176: 139–48.
- Pecot C V, Calin GA, Coleman RL, Lopez-Berestein G, Sood AK. RNAi in the clinic: challenges and future directions. *Nat Rev Cancer* 2011; 11: 59–67.
- Qiagen: *Taq PCR Handbook*. 2010. Verfügbar unter: www.qiagen.com/de/resources/resourcedetail?id=c73208eb-a83e-40c4-a9b6-ea5c4c94b9f4&lang=en; abgerufen am 16.02.2022.

- Qiagen: QIAamp DNA Mini Blood Handbook. 2016. Verfügbar unter: www.qiagen.com/de/resources/resourcedetail?id=62a200d6-faf4-469b-b50f-2b59cf738962&lang=en; abgerufen am 16.02.2022.
- Qiagen: *Taq* DNA Polymerase and *Taq* PCR Core Kit - Quick-Start Protocol. 2016. Verfügbar unter: www.qiagen.com/de/products/discovery-and-translational-research/pcr-qpcr-dpcr/pcr-enzymes-and-kits/end-point-pcr/taq-pcr-core-kit; abgerufen am 16.02.2022.
- Quinn JJ, Chang HY. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nat Rev Genet* 2016; 17: 47–62.
- Raikwar SP, Kikkeri NS, Sakuru R, Saeed D, Zahoor H, Premkumar K, et al. Next Generation Precision Medicine: CRISPR-mediated Genome Editing for the Treatment of Neurodegenerative Disorders. *J Neuroimmune Pharmacol* 2019; 14: 608–41.
- Ransohoff JD, Wei Y, Khavari PA. The functions and unique features of long intergenic non-coding RNA. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018; 19: 143–57.
- Rattay TW, Lindig T, Baets J, Smets K, Deconinck T, Söhn AS, et al. FAHN/SPG35: A narrow phenotypic spectrum across disease classifications. *Brain* 2019; 142: 1561–72.
- Reith EH. Mutationssuche im *ELOVL5*-Gen bei Ataxie-Patienten. Inauguraldissertation, 2017.
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. 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* 2015; 17: 405–24.
- Río Bártulos C, Tappe H. Anhang 1 Sequenzierung von DNA. In Jansohn M, Rothhämel S. Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. 5. Auflage, S. 589-615. Spektrum; 2012. ISBN 978-3-8274-2429-7.
- Río Bártulos C, Tappe H, Rothhämel S. Allgemeine Methoden. In Jansohn M, Rothhämel S. Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. 5. Auflage, S. 1-36. Spektrum; 2012a. ISBN 978-3-8274-2429-7.
- Río Bártulos C, Tappe H, Rothhämel S. Isolierung von DNA. In Jansohn M, Rothhämel S. Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. 5. Auflage, S. 95-134. Spektrum; 2012b. ISBN 978-3-8274-2429-7.
- Ristori G, Romano S, Visconti A. Riluzole in cerebellar ataxia. *Neurology* 2010; 74: 839–45.
- Romano S, Coarelli G, Marcotulli C, Leonardi L, Piccolo F, Spadaro M, et al. Riluzole in patients with hereditary cerebellar ataxia: A randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol* 2015; 14: 985–91.
- Rossi A, Kontarakis Z, Gerri C, Nolte H, Hölper S, Krüger M, et al. Genetic compensation induced by deleterious mutations but not gene knockdowns. *Nature* 2015; 524: 230–3.

- Ruano L, Melo C, Silva MC, Coutinho P. The global epidemiology of hereditary ataxia and spastic paraplegia: A systematic review of prevalence studies. *Neuroepidemiology* 2014; 42: 174–83.
- Sambrook J, Maniatis TP, Russell DW, Green MR. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. New York: *Cold Spring Harbor Laboratory Press*; 2001
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5463–7.
- Schackmann MJA, Ofman R, Dijkstra IME, Wanders RJA, Kemp S. Enzymatic characterization of ELOVL1, a key enzyme in very long-chain fatty acid synthesis. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids* 2015; 1851: 231–7.
- Schmidt H, Rothhämel S. Polymerase-Kettenreaktion (PCR). In Jansohn M, Rothhämel S. *Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. 5. Auflage, S. 135-171. Spektrum; 2012. ISBN 978-3-8274-2429-7.
- Schröder M. Isolierung und Markierung von RNA. In Jansohn M, Rothhämel S. *Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. 5. Auflage, S. 233-260. Spektrum; 2012. ISBN 978-3-8274-2429-7.
- Schüle R, Schöls L. Ataxien und hereditäre spastische Spinalparalysen. *Nervenarzt* 2017; 88: 720–7.
- Scoles DR, Meera P, Schneider MD, Paul S, Dansithong W, Figueroa KP, et al. Antisense oligonucleotide therapy for spinocerebellar ataxia type 2. *Nature* 2017; 544: 362–6.
- Sen NE, Arsovic A, Meierhofer D, Brodesser S, Oberschmidt C, Canet-Pons J, et al. In human and mouse spino-cerebellar tissue, ataxin-2 expansion affects ceramide-sphingomyelin metabolism. *Int J Mol Sci* 2019; 20
- Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, et al. DbSNP: The NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: 308–11.
- Silva AC, Lobo DD, Martins IM, Lopes SM, Henriques C, Duarte SP, et al. Antisense oligonucleotide therapeutics in neurodegenerative diseases: The case of polyglutamine disorders. *Brain* 2020; 143: 407–29.
- Sjöstedt E, Zhong W, Fagerberg L, Karlsson M, Mitsios N, Adori C, et al. An atlas of the protein-coding genes in the human, pig, and mouse brain. *Science* 2020; 367: 1–16.
- Sullivan R, Yau WY, O'Connor E, Houlden H. Spinocerebellar ataxia: an update. *J Neurol* 2019; 266: 533–44.
- Sun YM, Lu C, Wu ZY. Spinocerebellar ataxia: relationship between phenotype and genotype – a review. *Clin Genet* 2016; 90: 305–14.
- Tamada A, Watanabe S, Muguruma K. Investigating developmental and disease mechanisms of the cerebellum with pluripotent stem cells. *Mol Cell Neurosci* 2020; 107: 103530.

- Thermo Fisher Scientific: Dithiothreitol, Cleland's reagent, Produktinformation. 2012 verfügbar unter: www.thermofisher.com/order/catalog/product/R0861; abgerufen am 18.02.2022.
- Thermo Fisher Scientific: ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Brief Protocol. 2017. Verfügbar unter: www.thermofisher.com/order/catalog/product/78250.40.UL; abgerufen am 16.02.2022.
- Tipton PW, Guthrie K, Strongosky A, Reimer R, Wszolek Z. Spinocerebellar Ataxia 15: A Phenotypic Review and Expansion. *Neurol Neurochir Pol* 2017; 51: 86–91.
- Tweedie S, Braschi B, Gray K, Jones TEM, Seal RL, Yates B, et al. Genenames.org: The HGNC and VGNC resources in 2021. *Nucleic Acids Res* 2021; 49: D939–46.
- Tzertzinis G, Tabor S, Nichols NM. RNA-dependent DNA polymerases. *Curr Protoc Mol Biol* 2008: 1–4.
- Vermeer S, van de Warrenburg BPC, Willemsen MAAP, Cluitmans M, Scheffer H, Kremer BP, et al. Autosomal recessive cerebellar ataxias: The current state of affairs. *J Med Genet* 2011; 48: 651–9.
- Vogel AP, Keage MJ, Johansson K, Schalling E. Treatment for dysphagia (swallowing difficulties) in hereditary ataxia. *Cochrane Database Syst Rev* 2015; 2015
- de Vooght KMK, van Wijk R, van Solinge WW. Management of gene promoter mutations in molecular diagnostics. *Clin Chem* 2009; 55: 698–708.
- Voytas D. Resolution and Recovery of DNA Fragments- Agarose Gel Electrophoresis. *Curr Protoc Immunol* 2001: 1–8.
- Wachutka L, Caizzi L, Gagneur J, Cramer P. Global donor and acceptor splicing site kinetics in human cells. *eLife* 2019; 8: 1–52.
- Wang Y, Koh K, Miwa M, Yamashiro N, Shindo K, Takiyama Y. A Japanese SCA5 family with a novel three-nucleotide in-frame deletion mutation in the *SPTBN2* gene: A clinical and genetic study. *J Hum Genet* 2014; 59: 569–73.
- van de Warrenburg BPC, van Gaalen J, Boesch S, Burgunder JM, Dürr A, Giunti P, et al. EFNS/ENS Consensus on the diagnosis and management of chronic ataxias in adulthood. *Eur J Neurol* 2014; 21: 552–62.
- Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, et al. SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res* 2018; 46: W296–303.
- Werle E, Schneider C, Renner M, Volker M, Fiehn W. Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 4354–5.
- Whaley NR, Fujioka S, Wszolek ZK. Autosomal dominant cerebellar ataxia type I: A review of the phenotypic and genotypic characteristics. *Orphanet J Rare Dis* 2011; 6: 33.
- Zesiewicz TA, Wilmot G, Kuo S-H, Perlman S, Greenstein PE, Sarah Y, et al. Comprehensive systematic review summary: Treatment of cerebellar motor dysfunction and ataxia. *Neurology* 2018; 90: 464–71.

Zhang N, Ashizawa T. RNA toxicity and foci formation in microsatellite expansion diseases. *Curr Opin Genet Dev* 2017; 44: 17–29.

Zieneldien T, Kim J, Cao J, Cao C. Covid-19 vaccines: Current conditions and future prospects. *Biology* 2021; 10: 960

12. Anhang

Tabelle 12.1 | **Verwendete physikalische und chemische Einheiten und Konstanten**

Einheitenzeichen	Einheitenname	Physikalische Größe
A	Ampere	Stromstärke
°C	Grad Celsius	Temperatur
g	Gramm	Masse
g	Fallbeschleunigung	$(\vec{g} \approx 9,81 \frac{m}{s^2})$
h	Stunde	Zeit
M	Molare Masse	
m	Meter	Länge
min	Minute	Zeit
mol	Mol	Stoffmenge
RT	Raumtemperatur	Temperatur
s	Sekunde	Zeit
T_m	Schmelztemperatur	Temperatur
V	Volt	Stromspannung

Tabelle 12.2 | **Nomenklatur für Nukleinsäuren**

Symbol	Bedeutung	Ursprung des Symbols
G	G	<u>G</u> uanin
A	A	<u>A</u> denin
T	T	<u>T</u> hymine
C	C	<u>C</u> ytosine
U*	U	<u>U</u> racil
R	A oder G	Pu <u>R</u> ine
Y	C oder T	Py <u>Y</u> rimidine
M	A oder C	A <u>M</u> inogruppe
K	G oder T	<u>K</u> etogruppe
S	G oder C	<i>engl. strong</i> (starke Wasserstoffbrückenbindungen)
W	A oder T	<i>engl. weak</i> (schwache Wasserstoffbrückenbindungen)
H	A, C, oder T (U)	nicht G, (H folgt im Alphabet auf G)
B	G, C, oder T (U)	nicht A, (B folgt im Alphabet auf A)
V	G, A, oder C	nicht T (U), (V folgt im Alphabet auf U)
D	G, A, oder T (U)	nicht C, (D folgt im Alphabet auf C)
N	G, A, C oder T	<i>engl. aNy</i> (jedes Nukleotid möglich)

modifiziert nach Nomenclature committee for the International Union of Biochemistry (NC-IUB), 1985

*U kommt in der ursprünglichen Nomenklatur nicht vor.

13. Ehrenwörtliche Erklärung¹³

„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.“

Gießen, 25.11.2022

Jendrik Mause

¹³ aus „Richtlinien für die Abgabe von Dissertationen am Fachbereich Medizin“ der Justus-Liebig-Universität Gießen, Stand 06.01.2022

14. Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Dagmar Nolte für die ausgezeichnete Betreuung und exzeptionelle Unterstützung während aller Phasen meiner Doktorarbeit, ihren wissenschaftlichen Rat und Anregungen beim Erstellen des Manuskripts, ihren Ansporn zum wissenschaftlichen Arbeiten und für die Vergabe der Dissertation. Frau Prof. Nolte hatte stets ein offenes Ohr für meine Anliegen und förderte mich nachhaltig.

Desweiteren gilt mein Dank allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Humangenetik unter kommissarischer Leitung von Prof. Dr. Nolte und PD Dr. med. Axel Weber. Insbesondere bedanke ich mich bei Pia Winter, Mitarbeiterin der Molekulargenetik, für die kompetente Einarbeitung in multiple Labormethoden und ihre Ratschläge. Frau Dr. Frauke Härtel danke ich für den wissenschaftlichen Impetus zu Beginn meiner Arbeit.

Ich bedanke mich bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des HLA-Labors, insbesondere bei Marion Ernst-Schlegel und Christina Lang.

Meinen Eltern und Geschwistern danke ich für ihren Rückhalt, ihre emotionale Stütze und Anregungen. Janna danke ich im Besonderen für ihre Nachsicht und mannigfaltige Unterstützung. Meinem langjährigen Konsesemester Justus Reitz danke ich für den lebhaften Austausch auf vielen Ebenen.