

**Die Häufigkeit der Spinocerebellären Ataxie Typ 19 (SCA19) bei Ataxie-Patienten:  
Screening auf Mutationen im *KCND3*-Gen**

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

vorgelegt von Laura Mandler  
aus Gießen

Gießen 2021

**Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen**  
**Institut für Humangenetik**

Gutachter: Frau Prof. Dr. Dagmar Nolte

Gutachter: Herr Prof. Dr. Hagen Huttner

Tag der Disputation: 07.12.2021

Teile dieser Arbeit wurden präsentiert auf dem Science Day 2017 des Fachbereich 11

Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen:

Mandler, L.; Kang, J. S., Müller, U.; Nolte, D.: Search for *KCND3* mutations in German ataxia patients

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Ataxie: Definition, Klinik und Klassifizierung.....	1
1.1.1	Autosomal dominant vererbte Ataxien.....	2
1.1.2	Autosomal rezessiv vererbte Ataxien.....	3
1.1.3	X-chromosomal vererbte Ataxien.....	4
1.1.4	Mitochondrial vererbte Ataxien.....	4
1.1.5	Nicht-hereditäre Ataxien.....	5
1.2	Spinocerebelläre Ataxien.....	6
1.2.1	Spinocerebelläre Ataxien: Genetik.....	7
1.3	Spinocerebelläre Ataxie Typ 19 (SCA19).....	10
1.3.1	Spinocerebelläre Ataxie Typ19 (SCA19): Klinik .....	11
1.3.2	Spinocerebelläre Ataxie Typ19 (SCA19): Neuropathologie.....	12
1.4	Das humane <i>KCND3</i> -Gen.....	12
1.4.1	<i>KCND3</i> -Gen: Bekannte Mutationen.....	14
1.4.2	K <sub>v</sub> 4.3: Funktion und Struktur.....	16
1.5	Aufgabenstellung.....	18
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>19</b>
2.1	Materialien.....	19
2.1.1	Chemikalien und Enzyme.....	19
2.1.2	Enzyme und Sequenzier-Kits.....	19
2.1.3	Lösungen und Puffer.....	20
2.1.4	Geräte.....	20
2.1.5	Verbrauchsartikel.....	21
2.1.6	Sonstige Materialien.....	21
2.1.7	Oligonukleotid-Primer.....	21
2.1.8	Online-Datenbanken und Software.....	22
2.2	Proben.....	23
2.2.1	Auswahl der Patienten.....	23

2.3	Methoden.....	23
2.3.1	DNA-Extraktion.....	23
2.3.1.1	Photometrische DNA-Konzentrations- und Reinheitsbestimmung.....	24
2.3.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	25
2.3.2.1	Durchführung: PCR.....	26
2.3.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	28
2.3.3.1	Durchführung: Agarose-Gelelektrophorese.....	28
2.3.4	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	29
2.3.5	Sequenzierung nach Sanger.....	30
2.3.5.1	Durchführung: Sequenzierung nach Sanger.....	30
2.3.6	Auswertung von Sequenzdaten.....	32
2.3.7	Restriktionsverdau.....	34
2.3.7.1	Durchführung: Restriktionsverdau.....	35
2.3.8	Bioinformatik.....	37
2.3.9	Klassifizierung von Sequenzvarianten.....	39
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>42</b>
3.1	Überblick: Untersuchungsalgorithmus.....	42
3.2	Ergebnisse: Sequenzanalyse des <i>KCND3</i> -Gens.....	43
3.2.1	Exon 1 ( <i>KCND3-002</i> ).....	43
3.2.2	Exon 2 ( <i>KCND3-002</i> ).....	46
3.2.3	Exon 3-4 ( <i>KCND3-002</i> ).....	48
3.2.4	Exon 5 ( <i>KCND3-002</i> ).....	50
3.2.5	Exon 6 ( <i>KCND3-002</i> ).....	50
3.2.6	Exon 6.001 ( <i>KCND3-001</i> ).....	50
3.2.7	Überblick: Identifizierte Sequenzvarianten in <i>KCND3</i> .....	51
3.3	Restriktionsverdau Sequenzvariante c.455 A>G (p.D152G).....	52
3.4	Konservierung der substituierten Aminosäure c.455A>G (p.D152G).....	53
3.5	Bioinformatische Berechnung der Pathogenität der Sequenzvariante c.455A>G (p.D152G).....	55
3.6	Klinik der Patientin mit der Sequenzvariante c.455A>G (p.D152G).....	56

<b>4 Diskussion.....</b>	<b>58</b>
4.1 SCA19: Häufigkeit.....	58
4.2 SCA19: Genetik.....	59
4.2.1 Sequenzvariante c.455A>G (p.D152G).....	59
4.2.2 Sequenzvariante c.455A>G (p.D152G): Klassifizierung gemäß ACMG.....	62
4.2.3 Identifizierte Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs).....	63
4.3 Auswirkungen von <i>KCND3</i> -Mutationen auf den K <sub>v</sub> 4.3 -Kanal.....	64
4.4 Klinik bekannter SCA19-Patienten im Vergleich.....	68
4.5. Empfehlungen: Vorgehen in der molekulargenetischen Diagnostik.....	73
4.6 Ausblick.....	75
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>77</b>
5.1 Zusammenfassung.....	77
5.2 Summary.....	79
<b>6 Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>80</b>
<b>7 Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>82</b>
<b>8 Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>85</b>
<b>9 Kurzschreibweisen von Aminosäuren.....</b>	<b>86</b>
<b>10 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>87</b>
<b>11 Ehrenwörtliche Erklärung.....</b>	<b>106</b>
<b>12 Danksagung.....</b>	<b>107</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Ataxie: Definition, Klinik und Klassifizierung

*„Ataxie (griech. taxis: Ordnung): Störung der Koordination von Bewegungsabläufen in Form von gestörtem Zusammenspiel einzelner Muskeln (Dyssynergie), falscher Abmessung von Zielbewegungen (Dysmetrie) und Unfähigkeit zur Durchführung einer raschen Folge antagonistischer Bewegungen (Dysdiadochokinese).“*

(Lücking et al., 2009)

Im engeren Sinn ist der Begriff der Ataxien eine Sammelbezeichnung für nicht fokale neurodegenerative Erkrankungen des Cerebellums oder seiner Verbindungen mit Leitsymptom einer progredienten, episodischen oder spastischen Ataxie (Diener et al., 2012). Betroffene weisen typischerweise Gangunsicherheit und Probleme bei grob- und feinmotorischen Tätigkeiten auf (Paulson, 2009). Klinisch zeigen sich beispielsweise im Rahmen einfacher Koordinationsprüfungen wie dem Finger-Nase-Versuch, Knie-Hacken-Versuch oder Romberg-Versuch pathologische Ergebnisse (Hentsch, 2017). Nach Ätiologie werden hereditäre und nicht-hereditäre Ataxien voneinander unterschieden. Die Prävalenz aller Ataxien wird insgesamt auf 15 bis 20: 100 000 beziffert (Klockgether, 2011), wobei der Anteil der Heredoataxien auf etwa 8: 100 000 geschätzt wird (Masuhr et al., 2013). Die Gruppe der Heredoataxien wird weiter unterteilt in autosomal dominant, autosomal rezessiv, X-chromosomal und mitochondrial vererbte Ataxien. Die Gruppe der nicht-hereditären Ataxien wird unterteilt in erworbene und sporadische Ataxien. In der klinischen Praxis liefern Symptomatik, Manifestationsalter und Familienanamnese des Betroffenen Hinweise auf die Ätiologie des Leidens und sind somit richtungsweisend für das weitere diagnostische Vorgehen (Paulson, 2009). Bei Verdacht auf Vorliegen einer Heredoataxie ermöglicht die molekulargenetische Testung unter Voraussetzung eines zuvor bereits identifizierten Krankheitslocus die Diagnosestellung. Bedingt durch die Vielzahl bekannter Krankheitsgene gestaltet sich die Testung jedoch zeitaufwendig. Dies gilt insbesondere dann, wenn die Eingrenzung potentiell vorliegender Erkrankungen aufgrund eines wenig spezifischen Phänotyps nur bedingt möglich ist.

### 1.1.1 Autosomal dominant vererbte Ataxien

Die autosomal dominant vererbten Ataxien (ADCAs) werden durch die spinocerebellären Ataxien (SCAs) repräsentiert (siehe 1.2, Seite 6 ff.). Die Dentatorubrale Pallido-Luysische Atrophie (DRPLA), zwei episodische Ataxien (EA1 und EA2) sowie eine Form spastischer Ataxie (SPAX1) werden ebenfalls als ADCAs eingestuft, nehmen aber eine Sonderstellung ein (Bird, 2019).

Die ursprüngliche Klassifizierung der ADCAs nach Harding (1982) wurde zwischenzeitlich durch eine molekulargenetische Einteilung in Subtypen spinocerebellärer Ataxien abgelöst. In der klinischen Praxis besteht ihre Bedeutung darin, dass sie Anhaltspunkte für ein sinnvolles stufenweises Vorgehen in der molekulargenetischen Diagnostik liefern kann (Dueñas et al., 2006). Tabelle 1.1 (Seite 2) veranschaulicht dies. Die Prävalenz der ADCAs wird auf etwa 1 bis 5: 100 000 beziffert (Bird, 2019; Ruano, 2014; van de Warrenburg, 2002).

**Tabelle 1.1: Modifizierte Klassifizierung der ADCAs nach Harding. (nach Dueñas et al., 2006)**

ADCA-Typ	ADCA I	ADCA II	ADCA III
<b>Klinik</b>	cerebelläres Syndrom mit Ophthalmoplegie/ pyramidale/ extrapyramidale Symptome / kognitive Beeinträchtigung/ periphere Neuropathie	cerebelläres Syndrom mit pigmentöser Retinopathie	rein cerebelläres Syndrom
<b>Neuropathologie</b>	Degeneration des Cerebellums und der Basalganglien/ des cerebellären Cortex/ des N.opticus/ der pontomedullären Systeme/der spinalen Trakte/ der peripheren Nerven	cerebelläre und pigmentöse retinale Degeneration	cerebelläre Degeneration
<b>Genloci</b>	SCA-Subtypen 1-4, 8, 10, 12, 13, 17, 18, 19/22, 20- 27, 28, 36-38, 46-48, DRPLA	SCA7	SCA-Subtypen 5, 6, 11, 14, 15/16, 26, 45

Die Dentatorubrale-Pallidoluyische Atrophie (DRPLA) ist eine seltene, vorwiegend in Japan auftretende ataktische Bewegungsstörung. Das Erkrankungsalter variiert zwischen dem ersten und 72. Lebensjahr (Veneziano & Frontali, 2016). In Abhängigkeit von diesem treten zusätzliche charakteristische Symptome auf: Bei Betroffenen mit Erkrankungsbeginn < 20 Lebensjahren gehören hierzu Myoklonie, Epilepsie sowie eine progrediente Intelligenzminderung. Betroffene mit Erkrankungsbeginn > 20 Lebensjahren fallen weiterhin durch Choreoathetose, Demenz und Charakterveränderungen auf (Veneziano & Frontali, 2016; Paulson, 2009).

Krankheitsverursachend ist eine CAG-Repeatexpansion im *ATNI*-Gen (Locus 12p13.31) (OMIM<sup>®</sup>, 2020; Veneziano & Frontali, 2016).

Die EA1 und EA2 sind zwei Typen episodischer Ataxien und weisen eine paroxysmale Symptomatik auf. Die EA1 ist charakterisiert durch kurze ataktische Episoden im Sekunden- bis Minutenbereich, die mitunter durch Stress, körperliche Anstrengung oder rasche Positionsänderungen ausgelöst werden können; zugrunde liegen Mutationen im *KCNA1*-Gen (Locus 12p13) (Krause, 2018; Paulson, 2009). Im ataxiefreien Intervall können Myokymien des Gesichtes und der Hände festgestellt werden (Krause, 2018).

Die EA2 ist durch länger (Minuten bis Tage) andauernde ataktische Episoden charakterisiert und häufig begleitet von Vertigo und Nausea (Krause, 2018). Etwa 50% der Betroffenen leiden zudem an Migräne; ursächlich sind Punktmutationen im *CACNA1A*-Gen (Locus 19p13) (Krause, 2018; Paulson, 2009).

Von spastischer Ataxie spricht man bei kombiniertem Vorliegen einer cerebellären Symptomatik und Spastizität (Bird, 2019). Es werden fünf Formen spastischer Ataxie voneinander unterschieden (SPAX1-5), wobei die Formen SPAX2-5 autosomal rezessiv vererbt werden und es sich bei der SPAX1 um eine autosomal dominant vererbte Ataxie handelt (Bird, 2019).

### 1.1.2 Autosomal rezessiv vererbte Ataxien

Die autosomal rezessiv vererbten Ataxien (ARCAs) repräsentieren eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, bei denen neben dem zentralen und peripheren Nervensystem auch andere Organe und Organsysteme betroffen sein können (Palau & Espinós, 2006). Es werden fünf Subtypen autosomal rezessiv vererbter Ataxien voneinander unterschieden (Palau & Espinós, 2006):

- kongenitale/ entwicklungsbedingte Ataxien (bspw. Cayman-Ataxie)
- mit metabolischen Erkrankungen assoziierte Ataxien (bspw. Ataxie mit isolierter Vitamin-E-Defizienz)
- Ataxien mit DNA-Reparaturdefekt (bspw. Ataxia-teleangiectasia, Ataxie mit okulomotorischer Apraxie Typ 1 und 2)
- degenerative und progrediente Ataxien (bspw. Friedreich-Ataxie)
- weitere Ataxien

Die Friedreich-Ataxie (FRDA) ist nach Bidichandani & Delatycki (2017) mit einer Prävalenz von 2 bis 4: 100 000 die häufigste Heredoataxie in Europa und manifestiert sich in der Regel vor dem 25. Lebensjahr (mittleres Alter 10-15 Jahre). Betroffene treten klinisch mitunter durch eine progrediente Ataxie, fehlende Beineigenreflexe, Dysarthrie und Fußfehlbildungen (Pes cavus) in Erscheinung (Ziefer & Lücking, 2009; Harding, 1981). Komplizierend können kardiale Symptome (Reizleitungsstörungen, hypertrophe Kardiomyopathie), Diabetes mellitus und eine Minderung des Hörvermögens auftreten (Ziefer & Lücking, 2009; Harding, 1981). Ursächlich ist bei den meisten Betroffenen eine homozygote GAA-Tripletexpansion im ersten Intron des *FXN*-Gens (Locus 9q13) (Gomes & Santos, 2013; Campuzano et al., 1996). Seltener weisen die Betroffenen eine *compound*-Heterozygotie mit GAA-Expansion auf einem, und Punktmutation auf dem anderen Allel auf (Ziefer & Lücking, 2009; Cossée et al., 1999).

### 1.1.3 X-chromosomal vererbte Ataxien

Der derzeit relevanteste Vertreter dieser Gruppe ist das Fragile-X-Tremor-Ataxie-Syndrom (FXTAS). Betroffen sind insbesondere Männer ab dem 50. Lebensjahr, die Träger einer *FMRI*-Prämutation sind (Locus Xq27.3), wobei der Prämutationsbereich etwa 55 bis 200 CGG-Repeat-Einheiten umfasst (OMIM<sup>®</sup>, 2021; Zanni & Bertini, 2011). Bei etwa 45,5% der Männer und 16,5% der Frauen, die Träger einer Prämutation sind, kommt es zur Krankheitsmanifestation (Hagermann et al., 2001), wobei die Prävalenz der *FMRI*-Prämutation auf etwa 1: 209 Frauen und 1: 430 Männern beziffert wird (Tassone et al., 2012). Klinisch treten Betroffene durch eine Gangataxie, Intentionstremor, Parkinsonismus, Polyneuropathie, Demenz, orthostatische Hypotonie sowie autonome Dysfunktion in Erscheinung (Ziefer und Lücking, 2009; Hagermann et al., 2008).

### 1.1.4 Mitochondrial vererbte Ataxien

Ursache mitochondrial vererbter Ataxien sind Mutationen im mitochondrialen Genom, die in den meisten Fällen zu einer Störung der oxidativen Phosphorylierung und somit des cellulären Energiestoffwechsels führen (Finsterer, 2009). In der Folge spiegelt die Symptomatik bei Vorliegen einer entsprechenden Erkrankung vorwiegend die

resultierende Dysfunktion von Organen mit hohem Energiebedarf wider (Finsterer, 2009). Charakteristisch ist hierbei u.a. eine Beteiligung des zentralen Nervensystems, die sich mitunter in Form von Krämpfen, Demenz, Migräne, Spastizität und Ataxie äußern kann (Chinnery, 2014). Eine Ataxie ist beispielsweise bei Erkrankungen wie dem Kearns-Sayre-Syndrom (KSS) oder dem MERFF-Syndrom (MERFF) häufig festzustellen (Chinnery, 2014; Finsterer, 2009).

Weiterhin verursachen Mutationen im mitochondrialen *ATP6*-Gen ein Krankheitsbild, das klinisch nicht von einer spinocerebellären Ataxie zu unterscheiden ist (Krankheitsmanifestation im Erwachsenenalter, cerebelläre und pyramidale Dysfunktion, Neuropathie) (Pfeffer et al., 2012). *MTATP6*-Mutationen stehen außerdem in ursächlichem Zusammenhang zum Leigh-Syndrom und NARP-Syndrom (Neuropathie, Ataxie und Retinopathia pigmentosa) (Stendel et al., 2020). Neuere Studien unterstreichen die Relevanz einer *MTATP6*-Testung auch bei adulten SCA-Patienten unabhängig davon, ob die Ataxie isoliert oder als Teil eines Syndroms vorliegt (Stendel et al., 2020; Dautant et al., 2018).

### 1.1.5 Nicht-hereditäre Ataxien

Die Gruppe der nicht-hereditären Ataxien wird unterteilt in erworbene und sporadische Ataxien. Erworbenen Ataxien liegen exogene oder endogene Faktoren wie beispielsweise Alkoholabusus, immunvermittelte Erkrankungen (z.B. paraneoplastische Kleinhirndegeneration, Multiple Sklerose), Hypothyreose, Intoxikationen oder infektiöse Erkrankungen (Varizella Zoster Virus, Epstein Barr Virus) zugrunde (Ziefer & Lücking, 2009; Klockgether, 2005).

Bei Vorliegen einer sich im Erwachsenenalter manifestierenden, progredient verlaufenden Erkrankung mit Ataxie-Symptomatik, der weder eine hereditäre noch eine bekannte exogene oder endogene Krankheitsursache zugrunde liegt, spricht man von einer sporadischen Ataxie (Klockgether, 2005). Etwa ein Drittel der Patienten mit sporadischer Ataxie leidet an der Multisystematrophie (MSA), die durch unterschiedliche Kombination autonomer und motorischer Dysfunktion, Parkinsonismus und cerebellärer Ataxie charakterisiert ist (Jellinger, 2018). In Abhängigkeit von der klinisch dominanten Symptomatik werden die Subtypen MSA-C

(vorwiegend cerebelläre Symptomatik) und MSA-P (vorwiegend Parkinsonismus) voneinander unterschieden (Lin et al., 2014). Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 54 Lebensjahren (Saito et al., 1994). Sind neben einer cerebellären Symptomatik weder autonome Funktionsstörungen noch Parkinsonismus festzustellen, wird durch Ausschluss die Diagnose SAOA (sporadic adult onset ataxia) gestellt (Klockgether, 2005). Die Symptome umfassen eine cerebelläre Ataxie der Extremitäten und des Rumpfes sowie Polyneuropathie (Ziefer & Lücking, 2009).

## 1.2 Spinocerebelläre Ataxien

Die spinocerebellären Ataxien (SCA) repräsentieren eine heterogene Gruppe autosomal dominant vererbter neurodegenerativer Erkrankungen (Seidel et al., 2012). Zu den Leitsymptomen zählen cerebelläre Ataxie, Dysarthrie und Augenbewegungsstörungen; in Abhängigkeit vom vorliegenden SCA-Subtyp können bei Betroffenen weitere cerebelläre und extracerebelläre, teils spezifische und somit diagnostisch richtungsweisende Symptome vorhanden sein (Seidel et al., 2012). Diese sind in Tabelle 1.2 (Seite 9 ff.) aufgeführt.

Das Manifestationsalter liegt in der Regel zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr, wobei auch Fälle mit Manifestation krankheitsspezifischer Symptome im Kindesalter oder im Alter > 60 Jahren bekannt sind (Dueñas et al., 2006). Die Prognose ist abhängig vom Subtyp: Während bei einigen der häufigeren SCA-Subtypen mit krankheitsverursachender CAG-Repeatexpansion oftmals eine rasche Progredienz sowie ein schwerer Krankheitsverlauf festzustellen sind, ist eine Erkrankung an einem SCA-Subtyp mit zugrundeliegender Punktmutation tendenziell durch eine langsame Progredienz mit normaler Lebenserwartung gekennzeichnet (Durr, 2010).

Der weltweit häufigste Subtyp ist die SCA3, gefolgt von der SCA1, SCA2 sowie SCA6 und SCA7, wobei regionale Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung der SCA-Subtypen vorhanden sind, die wahrscheinlich auf Gründereffekte zurückzuführen sind (Dueñas et al., 2006). Abbildung 1.1 (Seite 7) liefert einen Überblick über die weltweite Häufigkeitsverteilung der SCAs.

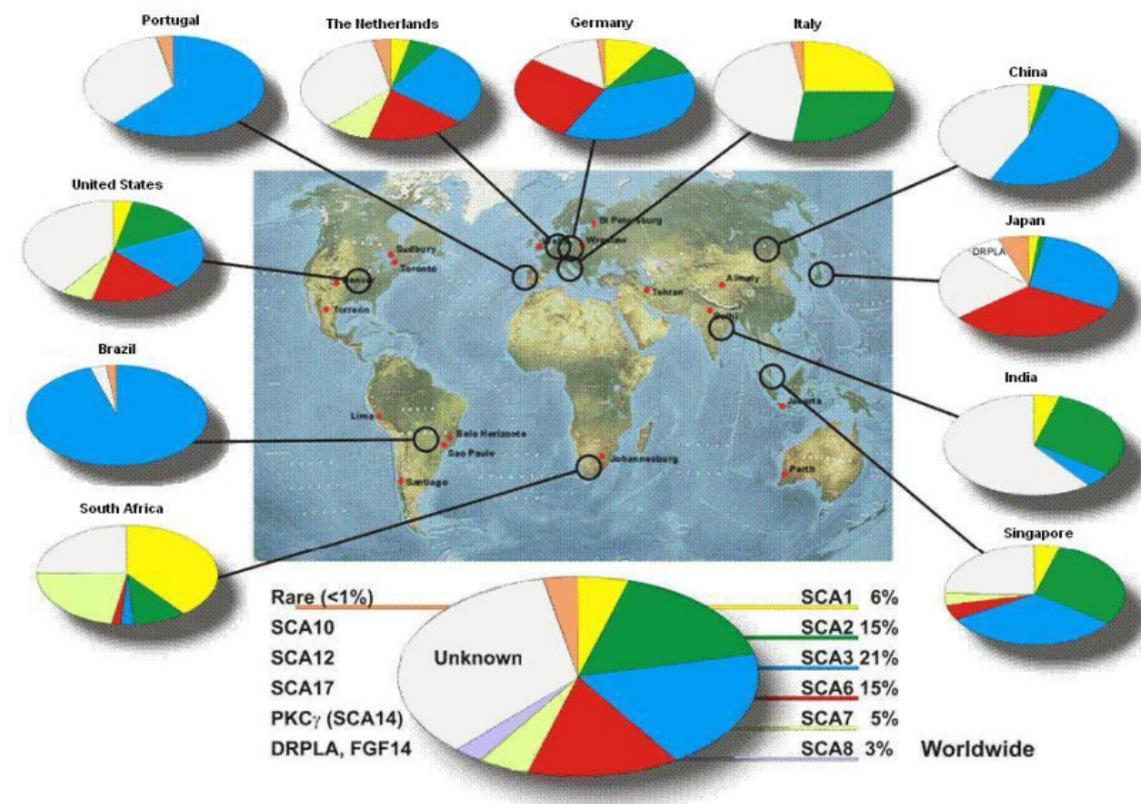


Abbildung 1.1: Überblick über die weltweite Häufigkeitsverteilung spinocerebellärer Ataxien (SCAs) (Bird, 2019).

### 1.2.1 Spinocerebelläre Ataxien: Genetik

Derzeit sind mindestens 45 SCA-Loci beschrieben, wobei bislang bei 39 dieser Subtypen die krankheitsverursachenden Gene bekannt sind. Die spinocerebellären Ataxien werden in Abhängigkeit von zugrundeliegenden Mutationen im krankheitsverursachenden Gen in drei Gruppen eingeteilt (Bettencourt et al. 2014; Soong & Paulson, 2007):

- SCA mit kodierender Repeatexpansion (CAG)<sub>n</sub>
- SCA mit nicht-kodierender Repeatexpansion (CAG/ CTG/ ATTCT/ TGGAA/ GGCCTG)<sub>n</sub>
- SCA mit Punktmutation und großen Deletionen/Duplikationen

Den häufigeren SCA-Subtypen, darunter SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7 und SCA17, liegt eine CAG-Repeatexpansion im proteinkodierenden Bereich der jeweiligen Gene zugrunde (Dueñas et al., 2006).

Das Basentriplett CAG kodiert für die Aminosäure Glutamin. Im korrespondierenden Protein führt eine CAG-Repeatexpansion zur Bildung eines Polyglutamin-Traktes (polyQ) (Dueñas et al., 2006). Man spricht daher auch von polyQ-Erkrankungen, zu denen auch die DRPLA gezählt wird. Die expandierte Sequenz ist typischerweise instabil (Jacobi et al., 2013). Ihre Länge kann sich während der Transmission ändern und führt meist zu einer Zunahme der Repeatexpansion, wobei eine inverse Korrelation zwischen der Repeatlänge und dem Erkrankungsalter besteht und eine entsprechende Zunahme zudem mit einer rascheren Progredienz einhergeht (Jacobi et al., 2013; Dueñas et al., 2006). Hieraus ergibt sich das Phänomen der Antizipation (Jacobi et al., 2013). Die Rolle der Aggregate im pathogenen Prozess ist nicht geklärt, diskutiert werden u.a. die Blockade des axonalen Transports (Seidel et al., 2010) bzw. der cellulären Proteinkontrolle (Seidel et al., 2011) (Seidel et al., 2012).

Bei anderen SCA-Subtypen (SCA8, SCA10, SCA12, SCA31, SCA36) liegt die Krankheitsursache in Repeatexpansionen, die außerhalb des kodierenden Bereichs des krankheitsverursachenden Gens liegen (Jacobi et al., 2013). Die Ursache ihrer Pathogenität ist nicht bekannt; diskutiert wird beispielsweise ein *gain of function* Mechanismus, der durch eine Akkumulation von Transkripten mit expandierten CUG- und CCUG-Repeats getriggert wird (Durr, 2010).

Eine Gruppe seltener SCA-Subtypen wird durch Punktmutationen wie missense-Mutationen, Deletionen und Duplikationen verursacht; derzeit stellt sie die am schnellsten wachsende Gruppe bekannter ADCAs dar (Durr, 2010). Die mutierten Gene betreffen eine Vielzahl von Stoffwechselwegen oder Signalkaskaden, darunter die mitochondriale Proteinkontrolle (SCA28), den Translationsprozess (SCA26), Transmittersysteme (SCA5, SCA23), die Calciumhomöostase (SCA15/16), die Verlängerung langkettiger ungesättigter Fettsäuren (SCA34, SCA38) und Ionenkanäle (SCA13, SCA19/22) (Jacobi et al., 2013). Bei weiteren bekannten SCA-Subtypen sind die mutierten Gene und/oder Mutationstypen derzeit nicht bekannt. Die Tabelle 1.2 (Seite 9 ff.) liefert einen Überblick über die Genetik der einzelnen SCA-Subtypen.

Tabelle 1.2: Spinocerebelläre Ataxien: Genetik und krankheitsspezifische Zusatzsymptome

Bezeichnung	Chromosomenregion	Gen	Genprodukt	Mutationstyp	Krankheitsspezifische Zusatzsymptome
SCA1	6p22.3	<i>ATXN1</i>	Ataxin-1	(CAG) <sub>n</sub> (k)	Dysphagie, Verlust von Propriozeption (Opal & Ashizawa, 2017)
SCA2	12q24.12	<i>ATXN2</i>	Ataxin-2	(CAG) <sub>n</sub> (k)	Ophthalmoparese, Parkinsonismus, Pyramidenbahnzeichen (Pulst, 2019)
SCA3	14q32.12	<i>ATXN3</i>	Ataxin-3	(CAG) <sub>n</sub> (k)	Faszikulationen (fazial, lingual), hervortretende Augen (Paulson, 2020)
SCA4	16q22.1	U	U	U	sensorische Neuropathie
SCA5	11q13.2	<i>SPTBN2</i>	Beta-III-Spectrin	missense in-frame-Deletion	rein cerebelläre Symptomatik, Downbeat-Nystagmus
SCA6	19p13.2	<i>CACNA1A</i>	Calciumkanal P/Q-Typ, $\alpha$ -1A Untereinheit	(CAG) <sub>n</sub> (k)	Dysphagie, Dystonie, Blepharospasmus (Casey & Gomez, 2019)
SCA7	3p14.1	<i>ATXN7</i>	Ataxin-7	(CAG) <sub>n</sub> (k)	Pigmentöse Makuladegeneration, Ophthalmoparese
SCA8	13q21.33	<i>ATXN8</i> <i>ATXN8AS</i>	Ataxin-8	CTG-Repeat (nk) CAG-Repeat (k)	sensorische Neuropathie, Spastik
SCA9	U	U	U	U	U
SCA10	22q13.31	<i>ATXN10</i>	Ataxin-10	(ATTCT) <sub>n</sub> (nk)	Epilepsie
SCA11	15q15.2	<i>TTBK2</i>	Tau-Tubulin-Kinase-2	Frameshift	Pyramidenbahnzeichen, Nystagmus (Chen et al., 2019)
SCA12	5q32	<i>PPP2R2P</i>	Serin/Threonin-Protein-Phosphatase 2A	(CAG) <sub>n</sub> (nk)	Aktionstremor (Holmes et al., 2003)
SCA13	19q13.33	<i>KCNC3</i>	K <sub>v</sub> 3.3	missense	mentale Retardierung, Kleinwuchs
SCA14	19q13.42	<i>PRKCG</i>	Proteinkinase C $\gamma$	missense	Myoklonien, kognitive Beeinträchtigung, Tremor (Chen et al., 2020)
SCA15/16	3p26.1	<i>ITPR1</i>	Inositol-Triphosphat-Rezeptor, Typ1	missense, Deletionen	Kopftremor
SCA17	6q27	<i>TBP</i>	TATA-box binding Protein	CAG-Repeat (k)	Dystonie, Chorea, psychiatrische Symptome (Toyoshima et al., 2019)
SCA18	7q22-q32	<i>IFRD1</i>	Interferon-related developmental regulator 1	Punktmutationen	sensorische/motorische Neuropathie, Nystagmus, Dysarthrie
SCA19/ SCA22	1p13.2	<i>KCND3</i>	K <sub>v</sub> 4.3	Punktmutationen	Kognitive Beeinträchtigungen, <i>early onset</i> Form mit Epilepsie (Pollini et al., 2020)
SCA20	11q12	U	U	260Kb-Duplikation (mind. 12 Gene)	Dysarthrie, Dysphonie, Pyramidenbahnzeichen (Storey & Gardner, 2019)
SCA21	7p21.3-p15.1	<i>TMEM240</i>	Transmembranprotein 240	Punktmutationen	Parkinson-Symptome, mentale Retardierung
SCA23	20p13	<i>PDYN</i>	Prodynorphin	missense	Sensorische Neuropathie, Pyramidenbahnzeichen
SCA25	2p21-p13	U	U	U	sensorische Neuropathie, gastrointestinale Beschwerden
SCA26	19p13.3	<i>EEF2</i>	Eukaryotic translation elongation factor 2	missense	rein cerebelläre Symptomatik
SCA27	13q33.1	<i>FGF14</i>	Fibroblast-growth-factor 14	Punktmutationen	Haltetremor, Dyskinesie, mentale Retardierung
SCA28	18p11.21	<i>AFG3L2</i>	ATPase-family-gene-3-like-2	Punktmutationen	Dysarthrie, Ptosis (Brussino et al., 2018)
SCA29	3p26.1	<i>ITPR1</i>	Inositol-Triphosphat-Rezeptor, Typ1	missense	früh beginnend, nichtprogredient, Lernprobleme
SCA30	4q34.3-q35.1	U	U	U	Hyperreflexie

SCA31	16q21	<i>BEAN1</i>	Brain expressed associated with NEDD-4	(TGGAA) <sub>n</sub> (nk)	Hörstörungen, muskuläre Hypotonie
SCA34	6q14.1	<i>ELOVL4</i>	Fettsäurelongase 4	missense	papulosquamöse, erythematöse, ichthyosiforme Plaques
SCA35	20p13	<i>TGM6</i>	Transglutaminase 6	missense	Tortikollis
SCA36	20p13	<i>NOP56</i>	Nucleolar protein 56	(GGCCTG) <sub>n</sub> (nk)	Muskelatrophie und Denervation (v.a. Zunge), Pyramidenbahnzeichen (Arias et al., 2017)
SCA37	1p32.2-p32.1	<i>DABI</i>	DAB Adapter Protein 1	U	veränderte vertikale Augenbewegungen (Matilla-Dueñas & Volpini, 2019)
SCA38	6p12	<i>ELOVL5</i>	Fettsäurelongase 5	Punktmutationen	Pes cavus, Hyposmie, Hörverlust (Brusco et al., 2019)
SCA39	11q21-11q22.3	U	U	7,5 Mb-Duplikation	spastische Ataxie (Johnson et al., 2014)
SCA40	14q.32.11-q32.12	<i>CCDC88C</i>	Coiled-coil Domain-containing protein 88c	missense	Hyperreflexie (Tsoi et al., 2014)
SCA41	4q27	<i>TRPC3</i>	Transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 3	missense	progrediente Gangataxie (Fogel et al., 2014)
SCA42	17q21.33	<i>CACNA1G</i>	Calcium channel, voltage-dependent, T-type, alpha 1G subunit (Cav3.1)	missense	Hyperreflexie, Spastizität (Coutelier et al., 2015)
SCA43	3q25.2	<i>MME</i>	Membrane metalloendopeptidase	missense	Polyneuropathie, Pectus carinatum (Depondt et al., 2016)
SCA44	6q24.3	<i>GRM1</i>	Glutamate receptor, metabotropic, 1	missense	Hyperreflexie, Spastizität, <i>early onset</i> Form mit verzögerter motorischer-/Sprachentwicklung (Watson et al., 2017)
SCA45	5q33.1	<i>FAT2</i>	Fat atypical cadherin 2	missense	rein cerebellär (Extremitäten-/ Gangataxie, Nystagmus, Dysarthrie) (Nibbeling et al., 2017)
SCA46	19q13.2	<i>PLD3</i>	Phospholipase D family member 3	missense	sensorische axonale Polyneuropathie (Van Dijk et al., 1995)
SCA47	1p35.2	<i>PUM1</i>	Pumilio RNA binding family member 1	missense	<i>early onset</i> Form mit Ataxie, verzögerter motorischer Entwicklung und Krampfleiden (Gennarino et al., 2018)
SCA48	16p13.3	<i>STUB1</i>	STIP1 homologous and U-box containing protein 1	Frameshift, Punktmutationen	Chorea, Parkinsonismus, Harnwegssymptome, kognitive/psychiatrische Symptome (De Michele et al., 2020)

(k) = kodierend, (nk) = nicht-kodierend, U= unbekannt

(OMIM®; Bird, 2019; Jacobi et al., 2013 und weitere, gesondert gekennzeichnete Quellen)

### 1.3 Spinocerebelläre Ataxie Typ 19 (SCA19)

Der SCA19-Locus wurde bei einer ADCA-Familie niederländischer Herkunft identifiziert und der chromosomalen Region 1p21-q21 zugeschrieben (Verbeek et al., 2002). Als richtungsweisend in der anschließenden Suche nach Kandidatengenen erwiesen sich die bei Betroffenen in der Familie beobachteten Symptome Tremor und Myoklonie, die zur Fokussierung auf Gene, die für Ionenkanäle kodieren, führten. Zeitlich überlappend wurde eine chinesische Familie mit Fällen von ADCA über vier Generationen untersucht (Chung et al., 2003), wobei der SCA-Locus der

chromosomalen Region 1p21-q23 zugeschrieben, und einem neuen Subtyp, der SCA22, zugeordnet wurde. Im Jahr 2012 gelang es, Mutationen im *KCND3*-Gen, das für den spannungsabhängigen Kalium-Kanal  $K_v4.3$  kodiert, in beiden Familien als krankheitsverursachend zu identifizieren (Duarri et al., 2012; Lee et al., 2012). So bestätigte sich die bereits früher geäußerte Vermutung, dass die Subtypen SCA19 und SCA22 einen identischen Krankheitslocus zur Ursache haben (Schelhaas, 2004). Auf die Doppelbezeichnung SCA19/22 wird in dieser Arbeit weitgehend verzichtet. Wird direkter Bezug zur Klinik oder Sequenzveränderungen im *KCND3*-Gen genommen, die Studien zur SCA22 entstammen, wird darauf an gegebener Stelle gesondert hingewiesen.

Im Jahr 2006 waren bereits bei der SCA13 Mutationen im *KCNC3*-Gen, das für den spannungsabhängigen Kalium-Kanal  $K_v3.3$  (*Shaw*-Subfamilie) kodiert, als krankheitsverursachend identifiziert worden (Waters et al., 2006). SCA19/22 repräsentiert somit den zweiten mutierten Kalium-Kanal in der Gruppe der SCAs.

### 1.3.1 Spinocerebelläre Ataxie Typ 19 (SCA19): Klinik

2020 wurde eine Übersichtsarbeit zur Klinik bekannter SCA19-Patienten publiziert (Pollini et al.). Es waren initial 86 publizierte Fälle aus 14 Studien gesichtet und schließlich 68 Fälle aus 13 Studien ausgewählt worden, zu denen ausreichende klinische Daten bzgl. Symptomen und deren Entwicklung verfügbar waren. Zusammengefasst kann das klinische Bild der SCA19 demnach wie folgt skizziert werden:

- Leitsymptom ist Ataxie (langsame Progredienz), u.a. mit Gangunsicherheiten, Extremitätendysmetrie, Dysdiadochokinese, cerebellärer Dysarthrie und Dysphagie
- Störungen der Okulomotorik (insbesondere Sakkaden, Nystagmen)
- Bewegungsauffälligkeiten/-störungen (insbesondere Parkinsonismus, Tremor, Myoklonie, Dystonie)
- Neurologische Entwicklungsstörungen/kognitive Beeinträchtigungen (auch als Erstsymptom relevant)
- Epilepsie bei frühem Manifestationsalter (auch als Erstsymptom relevant)
- seltenere Symptome: Depression, Pyramidenbahnzeichen, periphere Neuropathie

### 1.3.2 Spinocerebelläre Ataxie Typ 19 (SCA19): Neuropathologie

Im Jahr 2014 wurden die Ergebnisse der ersten pathoanatomischen Untersuchung des Gehirns einer SCA19-Patientin publiziert (Seidel et al.). Neben einem makroskopisch sichtbaren Volumenverlust des Cerebrums und Cerebellums und einer für SCAs charakteristischen Degeneration cerebellärer Purkinje-Zellen wurden auch eine neuronale Degeneration im Bereich der Nuclei olivares inferiores und Veränderungen im Bereich des in die Generation von Sakkaden involvierten Nucleus raphe interpositus festgestellt (Seidel et al., 2014; Seidel et al., 2012). In den vergangenen Jahren wurden einige SCA19-Patienten zudem cMRT-Untersuchungen zugeführt. Pollini et al. veröffentlichten 2020 eine Übersichtsarbeit, in der die Befunde von 35 entsprechenden Bildgebungen zusammengefasst wurden: Prominentester Ausdruck der Erkrankung war die cerebelläre Atrophie (30/35), welche bei 17 Patienten global, bei 11 Patienten im Bereich des Vermis cerebelli und bei 2 Patienten im Bereich der Kleinhirnhemisphären nachgewiesen wurde. Bei weiteren 5 Patienten trat das bildgebende Korrelat einer cerebralen Atrophie, bei 3 Patienten Läsionen der Substantia alba zutage. 5 Patienten wiesen einen unauffälligen cMRT-Befund auf.

## 1.4 Das humane *KCND3*-Gen

Das humane *KCND3*-Gen ist im Bereich der chromosomalen Region 1p13.2 lokalisiert und kodiert für die sechs Transmembransegmente und intrazellulären N- und C-Termini des spannungsabhängigen Kalium-Kanals  $K_{v}4.3$  (OMIM<sup>®</sup>, 2017). Mittels RT-PCR und Sequenzanalyse wurde die Existenz einer Spleißvariante des Gens nachgewiesen, die auch als *KCND3L* (long) oder *KCND3-001* bezeichnet wird. Sie weist eine Insertion in Form eines zusätzlichen Exons auf, die für weitere 19 Aminosäuren kodiert und eine Phosphorylierungsstelle enthält (OMIM<sup>®</sup>, 2017). Die kürzere Isoform wird auch als *KCND3S* (short) oder *KCND3-002* bezeichnet. Das kurze Transkript (Länge 7396 bp) umfasst 6 Exons und kodiert für 636 Aminosäuren. Es ist insbesondere im Bereich des frontalen Cortex, Lobus occipitalis und cerebellären Cortex vorzufinden (Isbrandt et al., 2000). Das lange Transkript (Länge 2716 bp) umfasst 8 Exons, von denen 7 kodierend sind. Das abgeleitete Protein umfasst 655 Aminosäuren.

Es überwiegt im Bereich des Thalamus, des Nucleus caudatus, der Substantia alba und der Epiphyse (Isbrandt et al., 2000). Im Pons liegen die beiden Transkripte in nahezu gleicher Konzentration vor (Isbrandt et al., 2000) Im Herzen wird nur das lange Transkript exprimiert (Dilks et al., 1999). Studien legen nahe, dass zwischen den beiden Spleißvarianten (im Grundzustand) keine funktionellen Unterschiede hinsichtlich ihrer Spannungsabhängigkeit oder Inaktivierungskinetik vorhanden sind (OMIM<sup>®</sup>, 2017; Dilks et al., 1999; Kong et al., 1998). Die Tabelle 1.3 und die Abbildungen 1.2 und 1.3 (Seite 13 ff.) liefern einen Überblick über Struktur und Aufbau. Nach Abschluss unserer Untersuchungen wurde eine weitere Spleißvariante des *KCND3*-Gens (*KCND3-201*) nachgewiesen. Diese wurde in Tabelle 1.3 (Seite 13) ergänzt.

**Tabelle 1.3: Struktur der Transkripte *KCND3-001*, *KCND3-002* und *KCND3-201*. (nach <https://www.ensembl.org>)**

	<i>KCND3-001</i> ( <i>KCND3-202</i> )* <sup>2</sup>	<i>KCND3-002</i> ( <i>KCND3-203</i> )* <sup>2</sup>	<i>KCND3-201</i>
<b>Transkript ID</b>	ENST00000315987 (ENST00000315987.6)* <sup>2</sup>	ENST00000369697 (ENST00000369697.5)* <sup>2</sup>	ENST00000302127.5
<b>Länge des Transkripts</b>	2716 bp	7396 bp	7619 bp
<b>Aminosäuren</b>	655	636	655
<b>Anzahl der Exons</b>	8	6	8
<b>Anzahl kodierender Exons</b>	7	6	7
<b>Länge der Exons</b>	Exon 1* <sup>1</sup> 408 bp Exon 2 1178 bp Exon 3 163 bp Exon 4 102 bp Exon 5 90 bp Exon 6 57 bp Exon 7 248 bp Exon 8 470 bp  * <sup>1</sup> nicht-kodierend	Exon 1 1176 bp Exon 2 163 bp Exon 3 102 bp Exon 4 90 bp  Exon 5 248 bp Exon 6 5617 bp	Exon 1* <sup>1</sup> 164 bp Exon 2 1178 bp Exon 3 163 bp Exon 4 102 bp Exon 5 90 bp Exon 6 57 bp Exon 7 248 bp Exon 8 5617 bp  * <sup>1</sup> nicht-kodierend

\*<sup>2</sup> Aktualisierte Nomenklatur und Transkript-ID der Spleißvarianten gemäß <https://www.ensembl.org> (letzter Zugriff: 29.01.2021)

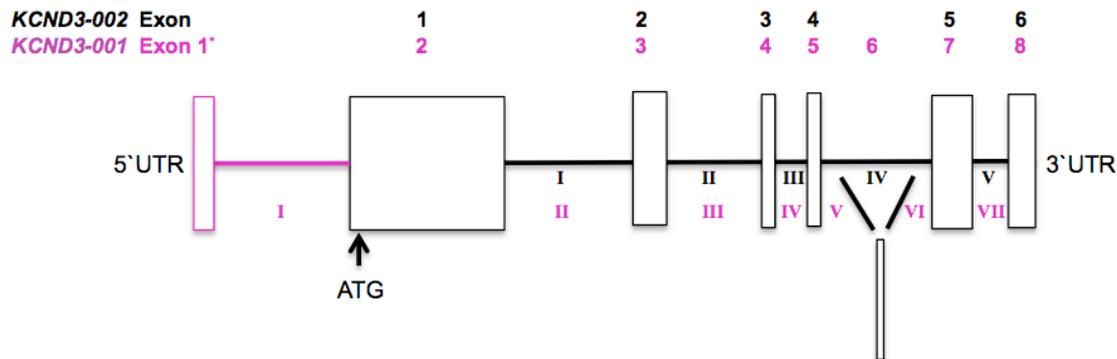


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Aufbaus des humanen *KCND3*-Gens und der Spleißvarianten *KCND3-002* und *KCND3-001*.  
1-8 = Exons, I-VII = Introns. Introns >2500 bp werden in gleicher Länge dargestellt. \* = nicht-kodierend.



Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des Spleiß-Produktes der Transkripte *KCND3-002* und *KCND3-001*.

#### 1.4.1 *KCND3*-Gen: Bekannte Mutationen

Derzeit sind 16 Mutationen beschrieben, die in Zusammenhang mit der Erkrankung an Spinocerebellärer Ataxie Typ 19/22 stehen. Sie führen zu Aminosäuresubstitutionen in hoch konservierten Bereichen des Proteins (Duarri et al., 2012). Die meisten der bekannten Mutationen liegen im Bereich der Exons 1 und 2 (*KCND3-002*) bzw. der Exons 2 und 3 (*KCND3-001*) und betreffen dort insbesondere die porenformenden Transmembrandomänen S5 und S6 oder den die beiden Transmembrandomänen verbindenden Loop (siehe Abbildung 1.4, Seite 16). Mit Ausnahme einer Duplikation (p.R293\_F295dup) und einer in frame-Deletion (p.F227del), handelt es sich um missense-Mutationen. Drei der bekannten Mutationen sind *de novo* Mutationen (p.R293\_F295dup, p.S301P, p.G384S). Bei deutschen Ataxie-Patienten wurden bislang keine Mutationen im *KCND3*-Gen beschrieben. Fünf der bekannten Mutationen wurden zwischenzeitlich bei mehreren betroffenen Individuen und ggf. deren Familien international beschrieben, teilweise im Kontext unterschiedlicher Krankheitsbilder (siehe Tabelle 1.4, Seite 15).

Tabelle 1.4: Bekannte SCA19-verursachende Mutationen im *KCND3*-Gen.

Sequenzveränderung	Aminosäureaustausch	Exon <sup>*1</sup>	Ethnizität	N <sup>*4</sup>	Autor
c.641A>G	p.Lys214Arg	1	unbekannt	1	Coutelier et al., 2018
c.679_681delTTC	p.Phe227del	1	chinesisch französisch	4	Lee et al., 2012 <sup>*2</sup> ; Huin et al. 2017
c.877_885dupCGCGTCTTC	p.Arg293_Phe295dup	1	dänisch	1	Smets et al., 2015
c.901T>C	p.Ser301Pro	1	unbekannt	1	Pollini et al., 2020
c.950G>A	p.Cys317Tyr	1	vermutet taiwanesisch	1	Hsiao et al., 2019
c.1013T>C	p.Val338Glu	1	japanisch, vermutet taiwanesisch	2	Lee et al., 2012 <sup>*2</sup> ; Hsiao et al., 2019
c.1034G>T	p.Gly345Val	1	US AJ <sup>*3</sup> japanisch	2	Lee et al., 2012 <sup>*2</sup>
c.1054A>C	p.Thr352Pro	1	niederländisch	1	Duarri et al., 2012
c.1119G>A	p.Met373Ile	2	niederländisch	1	Duarri et al., 2012
c.31123C>T	p.Pro375Ser	2	vermutet taiwanesisch	1	Hsiao et al., 2019
c.1130C>T	p.Thr377Met	2	japanisch, vermutet taiwanesisch, schwedisch	3	Lee et al., 2012. <sup>*2</sup> ; Hsiao et al., 2019; Paucar et al., 2018
c.1150G>A	p.Gly384Ser	2	japanisch	1	Kurihara et al., 2017
c.1169G>A	p.Ser390Asn	2	niederländisch, japanisch	2	Duarri et al., 2012; Wang et al., 2015
c.1174G>A <sup>*4</sup>	p.Val392Ile	2	chinesisch, unbekannt,	3 (1//2)	Wang et al., 2019 Nakajima et al., 2020; Giudecessi et al., 2012
c.1291C>T <sup>*5</sup>	p.Arg431Cys	3	koreanisch	1	Choi et al., 2017
c.1348C>T	p.Leu450Phe	3	französisch	2 (1//1)	Duarri et al., 2013; Giudicessi et al., 2011

<sup>\*1</sup>Transkript *KCND3*-002, <sup>\*2</sup> SCA22, <sup>\*3</sup> AJ= Ashkenazi Jewish, <sup>\*4</sup>Anzahl betroffener Familien mit neurologischem Phänotyp//kardiologischem Phänotyp bzw. gemischt kardiologisch-neurologischem Phänotyp



Die neuronalen  $K_v4$ -Kanalkomplexe setzen sich nach Covarrubias et al. (2008) zusammen aus:

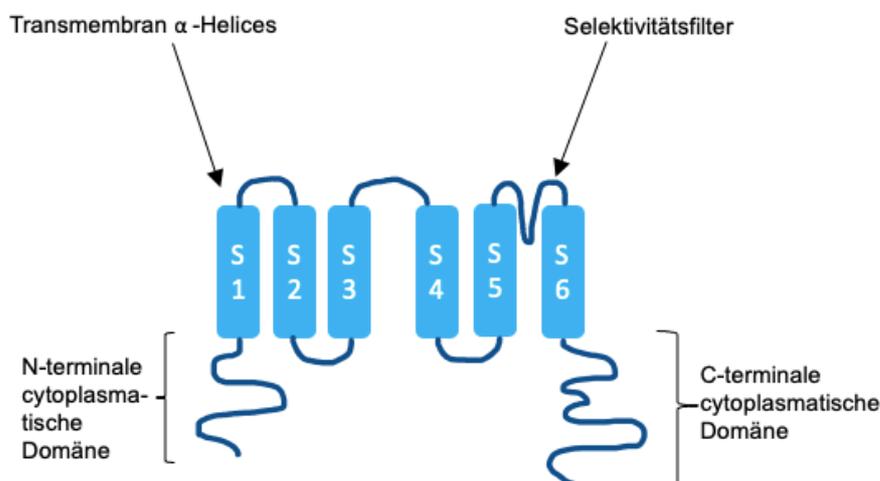
- porenformenden  $\alpha$ -Untereinheiten (*Shal*/  $K_v4.1$  bis  $K_v4.3$ ) und
- auxiliären  $\beta$ -Untereinheiten in Form von KChIPs ( $K^+$ -Channel-Interacting-Proteins) und DPLPs (Dipeptidyl-Peptidase-Like-Proteins)

Jede  $\alpha$ -Untereinheit weist wiederum sechs Transmembrandomänen (S1 bis S6) mit intrazellulären N- und C-Termini auf (Birnbaum et al., 2004; Yellen, 2002):

- Der Spannungssensor umfasst die Transmembrandomäne S4
- Der Loop zwischen den Transmembrandomänen S5 bis S6 bildet den schmalsten Teil der Kanalpore, den so genannten Selektivitätsfilter.

Im Bereich des N-Terminus ist die Tetramerisierungsdomäne (T1) lokalisiert. Ihr kommen mehrere Funktionen zu, darunter die Bildung einer Anschlussstelle für auxiliäre  $\beta$ -Untereinheiten und die Regulierung der Kanalaktivierung (Covarrubias et al., 2008).

Abbildung 1.5 (nach Birnbaum et al., 2004) visualisiert einige der strukturellen Elemente.



**Abbildung 1.5:** Schematische Darstellung einiger struktureller Elemente von Kalium-Kanälen. (in Anlehnung an Birnbaum et al., 2004, Seite 807)

## 1.5 Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Hinweise auf die Häufigkeit der Spinocerebellären Ataxie Typ 19 (SCA19) bei Ataxie-Patienten zu erlangen. Zu diesem Zweck wurde die DNA von 51 deutschen Ataxie-Patienten (weiblichen und männlichen Geschlechts) auf Mutationen im *KCND3*-Gen untersucht, wobei alle Exons sowie flankierende intronische Areale in das Screening eingeschlossen wurden. Voraussetzungen für den Einschluss in das untersuchte Patientenkollektiv waren eine klinisch gesicherte Ataxie, eine Familienanamnese mit autosomal-dominanten Erbgang sowie der vorherige Ausschluss folgender Subtypen spinocerebellärer Ataxie: SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA12, SCA17, SCA13, SCA14, SCA27, SCA28. Zum Zeitpunkt des Beginns der Untersuchungen waren bei deutschen Ataxie-Patienten noch keine Mutationen im *KCND3*-Gen bekannt.

Die Durchführung eines solchen Screenings ist beispielsweise in Hinblick auf die Einordnung der Relevanz der SCA19 und ihren Stellenwert in der molekulargenetischen Diagnostik von Interesse.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Betain	Sigma, Taufkirchen
Borsäure	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
Desoxyribonukleotide	Promega, Mannheim
EDTA	Sigma, Taufkirchen
Ethanol	Sigma, Taufkirchen
Ethidiumbromidlösung (0,025%)	Roth, Karlsruhe
Gen-Agarose L.E.	Inno-train Diagnostik, Spechbach
Formamid	Sigma, Taufkirchen
pUC/DdeI-Größenstandard	Laboreigene Herstellung: pUC18-Plasmid DNA, restriktionsverdaut mit DdeI
Saccharose	Sigma, Taufkirchen
Sephadex™ G-50	GE-Healthcare, Freiburg
Tris-HCl	Roth, Karlsruhe
Xylene-Cyanol	Sigma, Taufkirchen

#### 2.1.2 Enzyme und Sequenzier-Kits

DNA Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden
Hinfl	New England Biolabs
Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
straightpcr-OLS Kit	OLS-Omni Life Science, Bremen
Taq-DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden

### 2.1.3 Lösungen und Puffer

Gel-Ladepuffer	40 g Saccharose
	10 ml 10x TBE
	0,25 g Bromphenolblau
	0,25 g Xylene Cyanol
	ad 100 ml H <sub>2</sub> O dd

TBE (Tris-Borat-EDTA)

10x TBE

545 g Tris

278 g Borsäure

200 ml EDTA

ad 5000 ml H<sub>2</sub>O dd

1x TBE

250 ml 10x TBE

ad 2500 ml H<sub>2</sub>O dd

10x Puffer CutSmart™

New England Biolabs

10x PCR-Puffer

Qiagen, Hilden

5x Sequenzier-Puffer

Applied Biosystems

### 2.1.4 Geräte

Eiszubereiter

Manitowoc, Wisconsin, USA

Elektrophoresekammer

BRL

Inkubator

Mikrowellenherd

LG

Monitor

Mitsubishi

Pipetten

20, 100, 200, 1000 µl

Gilson, Limburg an der Lahn

10 µl

HTL, Langenfeld

Spannungsquelle

Biometra, Göttingen

ThermoCycler (MJ Research PTC-200)

Biozym, Hessisch Oldendorf

UV-Illuminator MacroVue UV 25

Hofer

Waage	Mettler Toledo, Gießen
Zentrifugen	
Biofuge Pico	Heraeus, Hanau
Multifuge 3L-R	Heraeus, Hanau
Minicentrifuge	Labnet International

### 2.1.5 Verbrauchsartikel

Elutionsplatte 96 Multiply	Sarstedt AG, Nümbrecht
Filterplatte Multiscreen	Merck Millipore, Darmstadt
Handschuhe	
Nitril	Braun, Melsungen
Latex	Nobaglove, Wetter
Photopapier	
Pipettenspitzen	
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
0,2 ml - 8er Streifen	Sarstedt, Nümbrecht
0,5 ml und 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg

### 2.1.6 Sonstige Materialien

Gelträger, Gelkämme	von Keutz, Laborbedarf, Reiskirchen
Messkolben 250 ml	Schott AG, Mitterteich
Reaktionsgefäßständer	
Micro Test Tube Rock	Brand, Wertheim
Vortex Reax 2000	Heidolph, Schwabach

### 2.1.7 Oligonukleotid-Primer

Die Oligonukleotid-Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich hergestellt. In der Tabelle 2.1 (Seite 22) sind die Primersequenzen (F/R) zusammengefasst.

Tabelle 2.1: Oligonukleotid-Primer: Exon1, 2, 3-4, 5, 6, 6.001

Exon <sup>*1</sup>	Produktgröße (bp)	Primer (F/R)	Sequenz
1	1372 bp	F	5'-TCACTCACCAGTGATCCTTTCC-3'
		R	5'-GACTCCCTCCTCTACCCA-3'
	573 bp	Hinfl- F	5'-GGCAGCACGGAGAAGGAGT-3'
		Hinfl- R	5'-GCTGCGGATGAAGCGGTAGk-3'
2	335 bp	F	5'-AACAGGTGAATGATTGGCAG-3'
		R	5'-CCTGTGAGGAGCTCTAGTCC-3'
3-4	733 bp	3F	5'-AGCCAGCCTCACAGCTTCA-3'
		4R	5'-GCCCAGAGTGAAGATGTGAGT-3'
5	446 bp	F	5'-TCCAGAACAGAGACAGGCAG-3'
		R	5'-GAGCGGCTAGAGGATCCT-3'
6	493 bp	F	5'-TCCTCCTAGTTACCACGAGCA-3'
		R	5'-GCTAGCAGCGTGAACCTCAG-3'
6.001	311 bp	F	5'-GCAGAATGCTGGGAATGAG-3'
		R	5'-GAATCAGCAGCACATGCAC-3'

<sup>\*1</sup> Exon-Nomenklatur angegeben für Transkript *KCND3-002*. Exon 6.001 bezieht sich auf das zusätzliche Exon in Transkript *KCND3-001*.

### 2.1.8 Online-Datenbanken und Software

Ensembl Genome Browser	<a href="https://www.ensembl.org">https://www.ensembl.org</a>
Finch TV Sequenzanalyse	<a href="http://www.geospiza.com">http://www.geospiza.com</a>
Human Genome Variation Society	<a href="https://www.hgvs.org">https://www.hgvs.org</a>
MutationTaster	<a href="http://www.mutationtaster.org">http://www.mutationtaster.org</a>
National Center for Biotechnology Information	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov">https://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
OMIM	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim</a>
SNP	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp</a>
ClinVar	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar</a>
Gene	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene</a>
Online Mendelian Inheritance in Man	<a href="https://www.omim.org">https://www.omim.org</a>
Polyphen-2	<a href="http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/">http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/</a>
PROVEAN	<a href="http://provean.jcvi.org">http://provean.jcvi.org</a>
SeqAnalysis	Applied Biosystems
SeqScape	Applied Biosystems

SIFT	<a href="https://sift.bii.a-star.edu.sg">https://sift.bii.a-star.edu.sg</a>
1000 Genomes	<a href="https://www.internationalgenome.org">https://www.internationalgenome.org</a>

## 2.2 Proben

### 2.2.1 Auswahl der Patienten

Für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte SCA19-Diagnostik wurden DNA-Proben von 51 deutschen Ataxie-Patienten (weiblichen und männlichen Geschlechts) auf Mutationen im *KCND3*-Gen gescreent. Folgende Kriterien waren Voraussetzung für den Einschluss in das Patientenkollektiv:

1. Vorliegen einer klinisch gesicherten Ataxie
2. Vorliegen einer Ataxie mit autosomal dominantem Erbgang
3. Vorheriger Ausschluss einer Erkrankung an folgenden SCA-Subtypen: SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA12, SCA13, SCA14, SCA17, SCA27, SCA28.

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 DNA-Extraktion

Die benötigte Patienten-DNA wurde mithilfe des QIAamp DNA Blood Mini Kit der Firma Qiagen aus EDTA-Vollblut extrahiert. Die Durchführung erfolgte gemäß der Anleitung des Herstellers. In einem ersten Schritt wurden 20 µl Qiagen-Protease auf den Boden eines 1,5 ml Eppendorf-Gefäßes pipettiert und anschließend 200 µl EDTA-Vollblut und 200 µl Lysepuffer (Buffer AL) hinzugegeben. Der Ansatz wurde für ~15 sec auf einem Vortexmischer gemischt und dann für zehn Minuten bei 56 °C inkubiert. Im Anschluss wurde er kurz zentrifugiert. Es wurden 200 µl Ethanol (96-100%) hinzugegeben; dann wurde der Ansatz für ~15 sec gemischt und erneut kurz zentrifugiert. In einem nächsten Schritt wurde der Ansatz einer in einem

Auffanggefäß (2 ml) steckenden Schleudersäule zugeführt und für eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Die Schleudersäule wurde auf ein neues Auffanggefäß (2 ml) gesteckt.

Im Anschluss wurden 500  $\mu$ l Waschpuffer (Buffer AW1) auf die Schleudersäule pipettiert und erneut für eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Die Schleudersäule wurde erneut auf ein neues Auffanggefäß (2 ml) gesteckt. Anschließend wurden 500  $\mu$ l Waschpuffer (Buffer AW2) auf die Schleudersäule aufgetragen und für drei Minuten bei 13 000 rpm zentrifugiert. Die Schleudersäule wurde auf ein weiteres neues Auffanggefäß gesteckt. Flüssigkeitsreste an den Rändern der Schleudersäule wurden mit einer Pipette entfernt, dann wurde für eine weitere Minute bei 13 000 rpm zentrifugiert. Im letzten Schritt wurde die Schleudersäule auf ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gesteckt und es wurden 200  $\mu$ l Elutionspuffer (Buffer AE) hinzupipettiert. Der Ansatz wurde für eine Minute bei Raumtemperatur (15-25 °C) inkubiert und abschließend für eine weitere Minute bei 8000 zentrifugiert. Die extrahierte DNA im 1,5 ml-Eppendorfgefäß stand für die Weiterverarbeitung in der PCR (siehe 2.3.2, Seite 25 ff.) bereit.

### 2.3.1.1 Photometrische DNA-Konzentrations- und Reinheitsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in Lösung erfolgt photometrisch durch Messung der UV-Absorption bei 260 nm (Hauk, 2013). Das Ausmaß der Absorption wird als Extinktion bezeichnet (Río Bártulos et al., 2012a). Einer Extinktion oder optischen Dichte (OD) von 1 entsprechen hierbei 50  $\mu$ g dDNA pro ml (Río Bártulos et al., 2012b). Hierbei handelt es sich um eine rein quantitative Messung (Armbrecht, 2013). Die teilweise Überlagerung der Absorptionen von Nukleinsäuren bei 260 nm und Proteinen bei 280 nm wird dazu genutzt, um ergänzend die Qualität bzw. Reinheit einer Probe abschätzen zu können; bei einer reinen Nukleinsäureprobe sollte der Quotient  $E_{260}/E_{280}$  hierbei in einem Bereich zwischen 1,8 und 2,0 liegen (Armbrecht, 2013; Río Bártulos et al., 2012b).

### 2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung selektiver DNA-Sequenzen und beruht auf dem Grundprinzip der DNA-Replikation (Königshoff & Brandenburger, 2012). Entwickelt wurde das Verfahren, um eine schnelle und hochsensitive pränatale Testung auf das Vorliegen einer Sichelzellanämie zu ermöglichen (Saiki et al., 1985). Die Polymerase-Kettenreaktion läuft in drei Schritten ab (Königshoff & Brandenburger, 2012):

#### 1. Denaturierung:

Die vorliegende DNA-Doppelhelix wird durch Erhitzen (~ 90 °C bis 95 °C) in zwei DNA-Einzelstränge getrennt (Königshoff & Brandenburger, 2012).

#### 2. Annealing:

Das Annealing umfasst die Primer-Hybridisierung an die einzelsträngige DNA (Schmidt & Rothämel, 2012). Somit wird der DNA-Abschnitt, der vervielfältigt werden soll, mit spezifischen DNA-Primern flankiert (Königshoff & Brandenburger, 2012).

#### 3. Elongation:

Am 3'OH-Ende der Primer beginnt die hitzestabile Taq-Polymerase (Temperaturoptimum 72 °C) mit dem Einbau von Desoxyribonukleotiden (dNTPs), wodurch ein neuer, komplementärer DNA-Einzelstrang entsteht (Königshoff & Brandenburger, 2012). Die Verwendung der hitzestabilen DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* ermöglicht eine kontinuierliche Durchführung der PCR-Zyklen ohne zwischenzeitliche neue Enzymgabe pro Zyklus (Schmidt & Rothämel, 2012).

Das Prinzip der PCR liegt in der zyklischen Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte, was die exponentielle Amplifikation der Matrize ermöglicht (Schmidt & Rothämel, 2012). Die Zyklen werden in automatisierten Thermostaten durchlaufen (Königshoff & Brandenburger, 2012). Es werden je nach Menge des Ausgangsmaterials in den meisten Fällen 25-35 Zyklen benötigt, um eine hinreichende Ausbeute an Zielsequenz zu erhalten (Schmidt & Rothämel, 2012).

### 2.3.2.1 Durchführung: PCR

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die PCR zur Amplifizierung der sechs (*KCND3-002*) bzw. sieben (*KCND3-001*) kodierenden Exons des *KCND3*-Gens und der flankierenden intronischen Areale eingesetzt. Die Exons 3 und 4 (*KCND3-002*) wurden einschließlich des kleinen Introns 3 in einem PCR-Produkt amplifiziert.

Es wurden jeweils ~ 50 µl Mastermix zu 1 µl DNA-Probe pipettiert. Zu diesem Zweck wurde wahlweise ein Mastermix mit vierfachem (~ 200 µl) oder achtfachem (~ 400 µl) Volumen angefertigt, der zu gleichen Teilen auf vier oder acht DNA-Proben verteilt wurde. Die Zusammensetzung der jeweiligen Reaktionsansätze ist Tabelle 2.2 (Seite 26) zu entnehmen.

**Tabelle 2.2: Reaktionsansatz: Exon1, 2, 3-4, 5, 6, 6.001**

Reagenz	Volumen (für vier Proben)
H <sub>2</sub> O	112 µl
10xPuffer	20 µl
Betain	20 µl
Nukleotid-Mix	40 µl
Oligonukleotid- Primer F (50 pmol/µl)	3 µl
Oligonukleotid- Primer R (50 pmol/µl)	3 µl
Taq-Polymerase	1,8 µl
	= 200 µl

Teilweise wurden Reaktionsansätze ohne Betain hergestellt. Das Volumen von 20 µl (Volumen für vier Proben) wurde in diesem Fall durch 20 µl H<sub>2</sub>O ersetzt. Die Zusammensetzung des verwendeten Nukleotid-Mix kann Tabelle 2.3 entnommen werden (Seite 27).

## 2.3 Nukleotid-Mix

Reagenz	Volumen
dATP (10 mM)	50 $\mu$ l
dCTP (10 mM)	50 $\mu$ l
dGTP (10 mM)	50 $\mu$ l
dTTP (10 mM)	50 $\mu$ l
Tris-HCl (10mM, pH 8,0)	200 $\mu$ l
	= 400 $\mu$ l

Im Anschluss wurden die Ansätze in den Thermo-Cycler überführt. Es wurde eine PCR mit 35 Zyklen durchgeführt, wobei die Annealing-Temperatur in Abhängigkeit des zu amplifizierenden Exons variiert wurde. Die PCR-Bedingungen sind den Tabellen 2.4, 2.5 und 2.6 (Seite 27 ff.) zu entnehmen.

Tabelle 2.4: PCR-Bedingungen: Exon 1, 3-4

	Temperatur	Dauer (in sec/min)
1. Pre-heating	94 °C	
2. Initiale Denaturierung	94 °C	3 min
3. Denaturierung	94 °C	30 sec
4. Annealing	62 °C	30 sec
5. Elongation	72 °C	45 sec
6. Abschließende Elongation	72 °C	2 min
7. Abkühlen	15 °C	

Tabelle 2.5: PCR-Bedingungen: Exon 2

	Temperatur	Dauer (in sec/min)
1. Pre-heating	94 °C	
2. Initiale Denaturierung	94 °C	3 min
3. Denaturierung	94 °C	30 sec
4. Annealing	59 °C	30 sec
5. Elongation	72 °C	45 sec
6. Abschließende Elongation	72 °C	2 min
7. Abkühlen	15 °C	

**Tabelle 2.6: PCR-Bedingungen: Exon 5, 6, 6.001**

	Temperatur	Dauer (in sec/min)
1. <i>Pre-heating</i>	94 °C	
2. <i>Initiale Denaturierung</i>	94 °C	3 min
3. <i>Denaturierung</i>	94 °C	30 sec
4. <b><i>Annealing</i></b>	<b>60 °C</b>	30 sec
5. <i>Elongation</i>	72 °C	45 sec
6. <i>Abschließende Elongation</i>	72 °C	2 min
7. <i>Abkühlen</i>	15 °C	

### 2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Trennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe (Königshoff & Brandenburger, 2012). Es wird ein Agarosegel hergestellt, dessen Auftragsaschen mit DNA-Fragment beladen werden. Aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA führt das Anschließen eines elektrischen Feldes an das beladene Agarosegel dazu, dass die DNA-Fragmente in Richtung der positiv geladenen Anode wandern, und zwar umso weiter, je kürzer sie sind (Königshoff & Brandenburger, 2012). Es erfolgt die Anfärbung mit Ethidiumbromid; dieses interkaliert zwischen die Basen von Nukleinsäuren und der Komplex aus DNA-Fragment und Ethidiumbromid wird unter UV-Licht als leuchtende, rötliche Bande sichtbar (Dechert, 2012). Weiterhin werden zwecks Größenbestimmung und Zuordnung von Nukleinsäurefragmenten bei der elektrophoretischen Trennung Größenstandards mit aufgetrennt (Dechert, 2012). Das Auftragen eines Standards in eine der Geltaschen ermöglicht die Zuordnung der Banden zu der jeweiligen Molekülgröße (Königshoff & Brandenburger, 2012).

#### 2.3.3.1 Durchführung: Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese fand im Rahmen dieser Arbeit zu zwei Zeitpunkten Anwendung:

1. Im Anschluss an die PCR zur Überprüfung des Erfolgs und zur Bestimmung der in der nachfolgenden Aufreinigung des PCR-Produkts zu verwendenden Menge

an Elutionspuffer.

2. Im Anschluss an die Reinigung des PCR-Produkts zur Überprüfung der Konzentration des DNA-Fragments, das für den Sequenzieransatz eingesetzt wurde.

Es wurden jeweils Agarose-Gele mit einer Konzentration von 1% (Exon 1, 3-4) oder 1,5% (Exon 2, 5, 6, 6.001) in einem 100 ml-Maßstab hergestellt (1,0 oder 1,5g Agarose ad 100ml 1x TBE). Dem Gemisch wurde Ethidiumbromidlösung (0,025%, 3 Tropfen ad 100 ml) beigefügt. Etwa 30 ml des aufgekochten Gels wurden auf einen Gelschlitten gegossen. Das abgekühlte Gel wurde in eine mit 1x TBE befüllte Elektrophoresekammer eingebracht.

Dann wurden jeweils 8 µl H<sub>2</sub>O zu 3µl DNA-Fragment und 2 µl Ladepuffer pipettiert und gemischt. Damit wurden die Geltaschen anschließend befüllt. Weiterhin wurde jeweils eine Geltasche mit 5 µl eines Größenstandards (pUC/Ddel) versehen.

Dieser Größenstandard weist die folgenden Banden auf: 160 bp, 240 bp, 409 bp, 420 bp, 540 bp, 890 bp. Anschließend wurde ein elektrisches Feld mit einer Spannung von ~ 50 mA angelegt. Die anschließende Auswertung erfolgte unter UV-Licht. Die Banden wurden zwecks Dokumentation fotografiert und das Foto ausgedruckt.

#### 2.3.4 Aufreinigung von PCR-Produkten

In der vorliegenden Arbeit wurden die PCR-Produkte unter Verwendung des *straight pcr-OLS* Kit (Hersteller OLS - Omni Life Science) gereinigt. Es wurde für jedes PCR-Produkt ein Spin Filter auf ein Receiver Tube gesteckt. Die Spin Filter wurden mit je 500 µl Bindepuffer (BB) befüllt, dann wurde das PCR-Produkt hinzupipettiert. Durch dreimaliges Aufziehen mit der Pipette wurde der Ansatz gemischt. Im Anschluss wurde der Ansatz für zwei Minuten bei 10 000 rpm zentrifugiert.

Dann wurden die Receiver Tubes verworfen und die Spin Filter auf 1,5 ml Eppendorf-Gefäße gesteckt. Die Deckel der Spin Filter wurden für eine bis drei Minuten geöffnet. Es wurden in Abhängigkeit von der Stärke der Banden in der nach der PCR erfolgten Agarose-Gelelektrophorese eine adäquate Menge an Elutionspuffer (EB) - in der Regel 18 bis 30 µl - auf die Spin Filter aufgetragen. Anschließend wurde der Ansatz für eine Minute bei 6000 rpm zentrifugiert. Die Spin-Filter wurden verworfen, das Eluat in den

1,5 ml Eppendorf-Gefäßen weiterverwendet. Im Anschluss an die Aufreinigung wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

### 2.3.5 Sequenzierung nach Sanger

Die Sequenzierung nach Sanger (Sanger et al., 1977) ist derzeit das am weitesten verbreitete Verfahren zur DNA-Sequenzierung und auch als Kettenabbruch-Methode oder Didesoxy-Methode bekannt (Río Bártulos & Tappe, 2012c). Das Grundprinzip entspricht dem der PCR: Es ist das Vorliegen der DNA in DNA-Einzelsträngen erforderlich, wozu der zu sequenzierende DNA-Doppelstrang denaturiert wird (Reinard, 2018). Es erfolgt die Anlagerung eines spezifischen Primers an den DNA-Einzelstrang und die Synthese eines zur Matrize komplementären DNA-Stranges durch eine DNA-Polymerase (Río Bártulos & Tappe, 2012c). Anders als bei der PCR werden aber nicht nur Desoxyribonukleotide (dNTPs), sondern auch Didesoxyribonukleotide (ddNTPs) in den entstehenden DNA-Einzelstrang eingebaut (Reinard, 2018). Der Einbau dieser ddNTPs erfolgt per Zufall und führt aufgrund einer fehlenden 3' OH-Gruppe zum Kettenabbruch; in Abhängigkeit vom Zeitpunkt des Einbaus eines ddNTPs entstehen so unterschiedlich lange DNA-Fragmente (Reinard, 2018). Die ddNTPs (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) sind unterschiedlich fluoreszenzmarkiert, sodass aufgrund der Fluoreszenz in einer anschließenden Kapillarelektrophorese ermittelt werden kann, welche Base an der Abbruchstelle vorhanden ist (Reinard, 2018). Hierbei werden die unterschiedlich langen, fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente aufgetrennt und laufen an einem Laserstrahl und einem Detektor vorbei; dies ermöglicht die Zuordnung von Basen zu den Fragmenten (Reinard, 2018). Beim Vorbeifließen an dem Detektor wird weiterhin ein Chromatogramm aufgezeichnet (Reinard, 2018).

#### 2.3.5.1 Durchführung: Sequenzierung nach Sanger

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde in einem ersten Schritt eine Sequenzierungsreaktion angesetzt. Für jedes PCR-Produkt wurde ein Ansatz für den F-Primer und ein Ansatz für den R-Primer pipettiert.

Die Sequenzierung wurde jeweils in einem 15 µl-Maßstab durchgeführt. Die Herstellung des Ansatzes kann Tabelle 2.7 (Seite 31) entnommen werden. Die zu verwendende Menge an DNA-Fragment wurde in Abhängigkeit von der jeweiligen Stärke der Bande in der nach der Reinigung des PCR-Produktes durchgeführten Agarose-Gelelektrophorese zwischen 0,5 µl und 6 µl festgelegt.

**Tabelle 2.7: Sequenzier-Ansatz: Exon 1, 2, 3-4, 5, 6, 6.001**

Reagenz	Volumen
DNA-Fragment	0,5 µl bis 6 µl
H <sub>2</sub> O	4 µl bis 9,5 µl
5xSequenzier-Puffer	1 µl
Primer R/F (10 pmol/ µl)* <sup>1</sup>	1,5 µl
ABI-Sequenziermix	2,5 µl
	<b>= 15 µl</b>

\*<sup>1</sup> siehe Tabelle 2.8 (Seite 31)

Zur Herstellung der Sequenzier-Primer (10 pmol/ µl) wurden die jeweiligen 50 pmol/ µl Oligonukleotid-Primer (Exon 1F/R, Exon 2F/R, Exon 3F und 4R, Exon 5F/R, Exon 6 F/R, Exon 6.001F/R) verdünnt:

**Tabelle 2.8: Sequenzier-Primer (10 pmol/ µl)**

Reagenz	Volumen
Oligonukleotid- Primer F/R (50 pmol/ µl)	5 µl
Tris-HCl (10 mM, pH 8,0 )	20 µl
	<b>= 25 µl</b>

Dann wurde eine Sequenzierung mit 25 Zyklen durchgeführt. Der Ablauf ist Tabelle 2.9 (Seite 32) zu entnehmen.

**Tabelle 2.9: Sequenzier-Programm**

	Temperatur	Dauer (in sec/min)
1. Pre-heating	96 °C	
2. Initiale Denaturierung	96 °C	1 min
3. Denaturierung	96 °C	10 sec
4. Annealing	60 °C	10 sec
5. Elongation	50 °C	3 min
6. Abkühlen	15° C	

Im Anschluss wurden die Sequenzier-Ansätze gereinigt. Hierzu wurde zunächst gequollenes Sephadex aus Sephadex™ G-50 und Tris-HCl (10 mM, pH 8,0) angesetzt. Dann wurde eine Mikrotiterplatte auf eine Abfallplatte gestellt. Es wurden je 300 µl gequollenes Sephadex pro benötigter Mikrotiterplattenvertiefung aufgetragen. Die Platte wurde mit einem Gegengewicht auf einer Waage austariert. Dann wurde für zwei Minuten bei 2100 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die Abfallplatte durch eine Elutionsplatte ersetzt. Es wurde je eine Sequenzier-Reaktion pro Sephadex-Well aufgetragen und die Platte im Anschluss mit einem Gegengewicht auf einer Waage austariert. Dann wurde erneut für zwei Minuten bei 2100 rpm zentrifugiert. Das Sequenziereluat (~15 µl) wurde in Multiwell-Streifen überführt; abschließend wurden zu jedem Eluat 10 µl Formamid hinzupipettiert. Die Proben wurden lichtgeschützt zum Sequenziergerät (ABI 3130XL Kapillarsequencer) transportiert.

### 2.3.6 Auswertung von Sequenzdaten

Die Sequenzanalyse erfolgte unter Verwendung des *ABI 3130XL Kapillarsequencer* der Firma *Applied Biosystems*. Zur anschließenden computergestützten Auswertung der DNA-Sequenzen der Patientenproben wurden die *Finch TV* (<http://www.geospiza.com>) sowie *SeqAnalysis* und *SeqScope V2.5* der Firma *Applied Biosystems* verwendet.

Als Referenzsequenz wurde die Wildtyp-Sequenz des humanen *KCND3*-Gens des *Ensembl Genome Browser* (<https://www.ensembl.org>) herangezogen. Berücksichtigt wurden die Transkripte *KCND3-002* (Transcript ID ENST00000369697) und *KCND3-001* (Transcript ID ENST00000315987). Die Datenbank wurde zudem zu einem späteren Zeitpunkt unserer Studie dazu genutzt, orthologe Aminosäuresequenzen anderer Organismen mit der des humanen K<sub>v</sub>4.3-Kanals abzugleichen, um so die Konservierung einer substituierten Aminosäure (c.455A>G, p.D152G) zu prüfen. Die Nomenklatur identifizierter Sequenzvarianten wurde gemäß den Empfehlungen der *Human Genome Variation Society* (<https://www.hgvs.org>) vorgenommen und bezieht sich auf die kodierende DNA (c.). Zusätzlich wurden Angaben zu Veränderungen auf Proteinebene gemacht (p.).

Weiterführend wurde geprüft, ob, und wenn ja mit welcher Häufigkeit, eine im Rahmen unserer Analysen identifizierte Sequenzvariante bereits als Single Nucleotide Polymorphismus (SNP) bekannt war. Der Begriff des Polymorphismus ist hierbei definiert als Sequenzvariante an einem definierten Genlocus, bei der das seltenere Allel mit einer Frequenz von  $\geq 1\%$  in der Bevölkerung auftritt (Arnemann, 2019). Die Häufigkeit des selteneren Allels wird in Form der globalen Minor Allele Frequency (MAF) angegeben. Entsprechende Informationen wurden der *Single Nucleotide Polymorphism Database* des *National Center for Biotechnology and Information* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) entnommen.

Weiterhin wurden die MAFs im untersuchten Patientenkollektiv gemäß des Hardy-Weinberg-Gesetzes ( $(p+q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1$ ) errechnet und angegeben.

Ergänzend wurde die Datenbank *1000 Genomes* in der vorliegenden Arbeit aufgerufen, um eine dortige Annotation der durch uns infizierten Sequenzvariante (c.455A>G, p.D152G) zu prüfen. Das *1000 Genomes Project* startete im Jahr 2008 mit dem Ziel, über die Sequenzierung des humanen Genoms entsprechend vieler Menschen möglichst umfassende Erkenntnisse zu Sequenzvarianten zu generieren (1000 Genomes Project Consortium, 2010). Die Daten wurden bis 2015 generiert, umfassen die Genome von 2504 Individuen aus 26 Populationen und enthalten Angaben zu über 88 Millionen Sequenzvarianten, darunter etwa 84,7 Millionen SNPs (1000 Genomes Project Consortium, 2015).

### 2.3.7 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme sind in einer Vielzahl von Prokaryonten vorzufinden, wo ihre Aufgabe in der Spaltung fremder DNA-Moleküle besteht (Berg et al., 2017a). In der Gentechnologie macht man sich ihre Fähigkeit, bestimmte Basensequenzen in einer DNA-Doppelhelix zu erkennen und beide DNA-Stränge an spezifischen Stellen zu schneiden, zur weiterführenden Analyse bzw. Manipulation der dadurch entstehenden spezifischen DNA-Fragmente zunutze (Berg et al., 2017a).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Restriktionsverdau im Anschluss an die Identifizierung der Sequenzvariante c.455A>G (p.D152G) in Exon 1 (*KCND3-002*) (siehe 3.3, Seite 52) durchgeführt, um Hinweise darauf zu erlangen, ob diese auch bei neurologisch Gesunden vorkommt. Hierzu wurde die Restriktionsendonuklease HinfI des Bakteriums *Haemophilus influenzae* verwendet. Dieses Enzym schneidet innerhalb einer fünf Basen umfassenden palindromischen Erkennungssequenz:



**Abbildung 2.1: Visualisierung der fünf Basen umfassenden Erkennungssequenz und der Schnittstellen der Restriktionsendonuklease HinfI des Bakteriums *Haemophilus influenzae*. (nach New England Biolabs®, <http://www.neb.com/products/r0155-hinfi>)**

Mithilfe der PCR wird ein 573 bp Teilfragment aus Exon 1 amplifiziert, das die c.455A>G (p.D152G) Variante beinhaltet, wenn diese in der DNA vorliegt. Bei Vorliegen des Wildtyps weist HinfI zwei Schnittstellen in diesem Fragment auf. Somit trennt es den Abschnitt in drei Fragmente. Bedingt durch die Transition A>G entfällt bei der identifizierten Sequenzvariante c.455A>G (p.D152G) eine der Schnittstellen, sodass der DNA-Abschnitt innerhalb des Exon 1 (*KCND3-002*) nicht in drei, sondern zwei Fragmente getrennt wird. In Tabellen 2.10 und 2.11 (Seite 35) sind Position und Längen der einzelnen Fragmente aufgeführt. Abbildung 2.1 (Seite 34) stellt die Schnittstellen des HinfI-Enzyms schematisch dar.

Tabelle 2.10: Überblick: HinfI-Wilotyp

	Orientierung	Position	Länge (bp)
1	HinfI- (Rechtes Ende)	275-570	299
2	(Linkes Ende)- Hinf I	1-256	256
3	HinfI- HinfI	257-274	18

Tabelle 2.11: Überblick: HinfI-Variante

	Orientierung	Position	Länge (bp)
1	HinfI- (Rechtes Ende)	275-570	299
2	(Linkes Ende)-HinfI	1-274	274

Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Schnittstellen des HinfI-Restriktionsenzym in einem 573 bp umfassenden Abschnitt im Exon1 (*KCND3-002*).

**HinfI\*** kennzeichnet die Schnittstelle, die durch die Transition A>G bei Vorliegen der Sequenzvariante c.455A>G (p.D152G) entfällt.

(nach [https://tools.neb.com/NEBcutter2/showdig.php?name=063d7985-Hinf1\\_WT](https://tools.neb.com/NEBcutter2/showdig.php?name=063d7985-Hinf1_WT), Zugriff: 19.09.2014)

Die so entstandenen Fragmente wurden in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die anschließende Auswertung der Banden ermöglichte den Nachweis oder Ausschluss des Vorliegens der Variante c.455A>G (p.D152G).

### 2.3.7.1 Durchführung: Restriktionsverdau

In einem ersten Schritt wurde ein 573 bp umfassendes Produkt innerhalb des Exon 1 mittels PCR amplifiziert. Die Produktsequenz weist beim Wildtyp zwei Schnittstellen

für das HinfI-Enzym auf. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes kann Tabelle 2.12 (Seite 36) entnommen werden.

**Tabelle 2.12: Reaktionsansatz: Exon 1 (PCR für Restriktionsverdau)**

Reagenz	Volumen für 17 Proben (je 16 Kontrollproben und 1 Positivkontrolle)
H <sub>2</sub> O	232 µl
10xPuffer	50 µl
Betain	100 µl
Nukleotid-Mix	100 µl
Oligonukleotid- Primer F (50 pmol/µl)	7 µl
Oligonukleotid- Primer R (50 pmol/µl)	7 µl
Taq-Polymerase	3,8 µl
	= <b>492,8 µl</b>

Es wurden je 27 µl des PCR-Ansatzes zu 1,5 µl DNA-Probe pipettiert. Die Ansätze wurden kurz zentrifugiert und dann in den Thermo-Cycler überführt. Es wurde eine PCR mit 35 Zyklen durchgeführt, deren Bedingungen Tabelle 2.13 (Seite 36) entnommen werden können. Die Zusammensetzung des Ansatzes ist in Tabelle 2.14 (Seite 37) aufgeführt.

**Tabelle 2.13: PCR-Bedingungen: Exon 1 (Restriktionsverdau, 573 bp; KCND3-002)**

	Temperatur	Dauer (in sec/min)
1. Pre-heating	94 °C	
2. Initiale Denaturierung	94 °C	3 min
3. Denaturierung	94 °C	30 sec
4. Annealing	64 °C	30 sec
5. Elongation	72 °C	40 sec
6. Abschließende Elongation	72 °C	2 min
7. Abkühlen	15 °C	

Tabelle 2.14: Ansatz: Restriktionsverdau HinfI

Reagenz	Volumen (für 18 Proben: 16 Kontrollproben und zwei Positivkontrollen)
H <sub>2</sub> O	82,0 µl
10x Puffer CutSmart™	36,0 µl
Enzym HinfI	8,0 µl
	= 126 µl

Es wurden je 7 µl des Ansatzes zu 13 µl PCR-Produkt pipettiert. Die Ansätze wurden für 2,5 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Im Anschluss wurden je 2,5 µl Ladepuffer zu den Ansätzen gegeben. Abschließend wurde eine Agarose-Gelelektrophorese auf einem 2,5%-igen Gel durchgeführt, wobei auf zehn Geltaschen je acht Kontrollproben, eine Positivkontrolle sowie ein Größenstandard (pUC/DdeI) aufgetragen wurden.

### 2.3.8 Bioinformatik

Es stehen zahlreiche verschiedene *in silico* Programme zur Verfügung, die das pathogene Potential von Sequenzvarianten auf Grundlage verschiedener Algorithmen bewerten (Richards et al., 2015).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde vorwiegend die Applikation *MutationTaster* verwendet. *MutationTaster* (Schwarz et al., 2010) kann sowohl intronische als auch exonische Einzelbasensubstitutionen und Insertionen/Deletionen (< 12 bp) analysieren (Schwarz, 2013). In den Berechnungen des Programms finden u.a. die evolutionäre Konservierung, die Auswirkungen einer veränderten DNA-Sequenz auf das resultierende Protein und der mögliche Einfluss auf bekannte Proteindomänen Berücksichtigung (Schwarz, 2013). Die Genotypen aus weiteren Datenbanken (*1000 Genomes Project*, HapMap) werden genutzt, um Polymorphismen als solche zu identifizieren, weiterhin werden Daten des NCBI (ClinVar) zu bekannten pathogenen Varianten abgefragt (Schwarz, 2013).

Externe, lokal installierte Computerprogramme detektieren eventuelle Veränderungen im Spleißmuster und Poly(A)-Signal (Schwarz, 2013). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden zusammengefasst und der integrierte Bayes Klassifikator prognostiziert das pathogene Potential einer Sequenzvariante (Schwarz, 2013). Es erfolgt eine Einstufung als „Polymorphismus“ („polymorphism“) oder „krankheitsverursachend“ („disease causing“).

Fakultativ wurden ergänzend die Programme *PROVEAN*, *Polyphen-2* und *SIFT* abgefragt.

*Polyphen-2* (Polymorphism Phenotyping V2) berechnet das pathogene Potential von Aminosäuresubstitutionen auf Grundlage von Auswirkungen einer entsprechenden Variante auf die Stabilität und Funktion des resultierenden Proteins (Adzhubei et al., 2013). Die Vorhersage basiert auf diversen phylogenetischen, strukturellen und Sequenzmerkmalen, die die entsprechende Substitution charakterisieren (Adzhubei et al., 2013). Aus den Ergebnissen wird ein Score zwischen 0,0 („benign“) und 1,0 („damaging“) errechnet und die Variante auf dieser Grundlage als „benigne“ („benign“), „möglicherweise schädlich“ („possibly damaging“) oder „wahrscheinlich schädlich“ („probably damaging“) eingestuft (Adzhubei et al., 2013).

*PROVEAN* (Protein Variation Effect Analyzer) operiert alignmentbasiert (Choi et al., 2012). Die Berechnungen des Programms fundieren auf der Annahme, dass eine Sequenzvariante, welche die Ähnlichkeit eines Proteins A zu einem homologen Protein B reduziert, mit einer höheren Wahrscheinlichkeit einen schädlichen Effekt auf dieses zuzufolge hat (Choi et al., 2012). Um das Ausmaß des Einflusses einer Variante auf die Proteinfunktion zu quantifizieren, werden *delta alignment scores* (oder kurz *delta scores*) für alle in die Berechnung eingeschlossenen homologen Sequenzen zuvor generierter *supporting sequence sets* ermittelt. Die einzelnen *delta scores* werden schließlich gemittelt und so der *PROVEAN Score* generiert, auf dessen Grundlage die Einstufung einer Variante als „neutral“ („neutral“) oder „schädlich“ („deleterious“) erfolgt (Choi et al., 2012).

*SIFT* (sorting intolerant from tolerant) berechnet die Wahrscheinlichkeit eines defizitären Effektes einer Sequenzvariante auf die resultierende Proteinfunktion auf Grundlage von Sequenzhomologie (Sim et al., 2012). Zugrunde liegt die Annahme, dass evolutionär konservierte Regionen weniger tolerabel gegenüber Sequenzvarianten sind und dass Aminosäuresubstitutionen oder Deletionen/Insertionen in diesen Bereichen konsekutiv eher Auswirkungen auf die Proteinfunktion nehmen als Varianten in weniger konservierten Regionen (Sim et al., 2012). Es werden homologe Proteinsequenzen zu einem entsprechenden Protein ermittelt und dann einem Alignment unterzogen (Sim et al., 2012). Für die betreffende Position wird ein *SIFT*-Score zwischen 0 und 1 ermittelt, wobei Werte zwischen 0 und 0,05 als „die Proteinfunktion beeinflussend“ eingestuft werden (Sim et al., 2012).

### 2.3.9 Klassifizierung von Sequenzvarianten

Die Klassifizierung der durch uns identifizierten Sequenzvariante c.455A>G (p.D152G) erfolgte nach dem ACMG Klassifizierungssystem (American College of Medical Genetics and Genomics) (Richards et al., 2015).

Die Zuordnung zu einer Klasse 1-5 erfolgt hierbei nach definierten Kriterien. Letztere werden zunächst einer von zwei übergeordneten Kategorien („benigne“ und „pathogen“) zugeordnet und im Weiteren innerhalb dieser Kategorien unterschiedlich gewichtet aufgeführt (Richards et al., 2015). Die für eine entsprechende Sequenzvariante zutreffenden Kriterien werden in einem letzten Schritt kombiniert und gemäß ACMG-Reglement dann der entsprechenden Klasse 1-5 zugeteilt. Die Tabelle 2.15 (Seite 40) und Abbildung 2.3 (Seite 41) visualisieren dies vereinfacht.

**Tabelle 2.15: Klassifizierung von Sequenzvarianten gemäß ACMG-Klassifizierungssystem. (nach Richards et al., 2015)**

<p><b>Klasse 1: benign (Normvariante ohne klinische Relevanz)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• BA 1 ODER</li> <li>• mindestens 2 „strong“ Kriterien (BS1-4)</li> </ul>
<p><b>Klasse 2: likely benign (wahrscheinliche Normvariante)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 „strong“ Kriterium (BS1-4) und 1 „supporting“ Kriterium (BP1-7) ODER</li> <li>• mindestens 2 „supporting“ Kriterien (BP1-7)</li> </ul>
<p><b>Klasse 3: VUS (Variante unklarer klinischer Relevanz)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• andere aufgeführte Kombinationsmöglichkeiten treffen nicht zu ODER</li> <li>• die Kriterien für „benigne“ und „pathogen“ sind nicht vereinbar/widersprüchlich</li> </ul>
<p><b>Klasse 4: likely pathogenic (wahrscheinlich pathogene Variante)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 „very strong“ Kriterium (PVS1) UND 1 „moderate“ Kriterium (PM1-6) ODER</li> <li>• 1 „strong“ Kriterium (PS1-4) UND 1-2 „moderate“ Kriterien (PM1-6) ODER</li> <li>• mindestens 3 „moderate“ Kriterien (PM1-6) ODER</li> <li>• 2 „moderate“ Kriterien (PM1-6) UND mindestens 2 „supporting“ Kriterien (PP1-5) ODER</li> <li>• 1 „moderate“ Kriterium (PM1-6) UND mindestens 4 „supporting“ Kriterien (PP1-5)</li> </ul>
<p><b>Klasse 5: pathogenic (pathogene Variante)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1 „very strong“ Kriterium (PVS1) UND <ul style="list-style-type: none"> <li>• mindestens 1 „strong“ Kriterium (PS1-4) ODER</li> <li>• mindestens 2 „moderate“ Kriterien (PM1-6) ODER</li> </ul> </li> <li>• 1 „moderate“ UND 1 „supporting“ Kriterium (PP1-5) ODER</li> <li>• mindestens 2 „supporting“ Kriterien (PP1-5)</li> <li>• mindestens 2 „strong“ Kriterien (PS1-4) ODER</li> <li>• 1 „strong“ Kriterium (PS1-4) UND <ul style="list-style-type: none"> <li>• mindestens 3 „moderate“ Kriterien (PM1-6) ODER</li> <li>• 2 „moderate“ Kriterien (PM1-6) UND mindestens 2 „supporting“ Kriterien (PP1-5) ODER</li> <li>• 1 „moderate“ Kriterium (OM1-6) UND mindestens 4 „supporting“ Kriterien</li> </ul> </li> </ul>

Kriterien: Benigne Varianten		Kriterien: Pathogene Varianten	
<b>BA1</b>	Allelfrequenz >5% in Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project od. Exome Aggregation Consortium	<b>PVS1</b>	Nullvariante in einem Gen, in dem <i>loss of function</i> ein bekannter Erkrankungsmechanismus ist
<b>BS1</b>	Allelfrequenz größer als für Erkrankung erwartet	<b>PS1</b>	Etablierte <i>in vitro/in vivo</i> Studien sprechen für schädlichen Effektes auf das Gen oder Genprodukt
<b>BS2</b>	Beobachtet bei einem gesunden Erwachsenen Individuum für eine rezessive (homozygot), dominante (heterozygot) oder X-chromosomale (hemizygot) Erbkrankheit mit vollständiger Penetranz und frühem Erkrankungsalter	<b>PS2</b>	<i>De novo</i> (Mutter- u. Vaterschaft bestätigt) + Erkrankung + keine FA
<b>BS3</b>	Etablierte <i>in vitro/in vivo</i> Studien haben keinen schädlichen Effekt auf Proteinfunktion oder Spleißen gezeigt	<b>PS3</b>	Aminosäurewechsel wie bei vorbeschriebener pathogener Variante, ungeachtet der Nukleotidänderung
<b>BS4</b>	Fehlende Segregation bei betroffenen Familienmitgliedern	<b>PS4</b>	Die Prävalenz der Variante ist bei Betroffenen signifikant erhöht verglichen mit der Prävalenz bei Kontrollen
<b>BP1</b>	missense Variante in einem Gen, in dem v.a. trunkierende Varianten als krankheitsverursachend bekannt sind	<b>PM1</b>	Lokalisiert in <i>hot spot</i> und/oder kritischer funktionaler Domäne ohne bekannte benigne Varianten
<b>BP2</b>	<i>in trans</i> detektiert mit einer pathogenen Variante eines dominanten Gens ODER detektiert <i>in cis</i> mit pathogener Variante	<b>PM2</b>	Abwesenheit in Kontrollen in Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project, Exome Aggregation Consortium
<b>BP3</b>	In-frame-Deletionen/Insertionen in repetitiver Region ohne bekannte Funktion	<b>PM3</b>	Rezessiver Erbgang: <i>in trans</i> mit pathogener Variante detektiert
<b>BP4</b>	Multiple <i>in silico</i> Berechnungen sprechen gegen schädlichen Einfluss auf das Gen/-produkt	<b>PM4</b>	Veränderte Proteinlängen infolge von in-frame-Deletionen /Insertionen in nonrepeat-Region oder stop-loss-Varianten
<b>BP5</b>	Variante wurde bei einem Fall identifiziert, bei dem eine alternative molekulare Basis für die Erkrankung bekannt ist	<b>PM5</b>	Aminosäuresubstitution an einer Position, an der eine bekannt pathogene Variante zu anderer Aminosäuresubstitution führt
<b>BP6</b>	Reputable Quelle hat Variante als benigne eingeordnet, aber Befunde sind für das Labor und unabhängige Evaluation nicht verfügbar	<b>PM6</b>	mutmaßlich <i>de novo</i> , aber ohne nachgewiesene Mutter-/Vaterschaft
<b>BP7</b>	Stille Variante, für die Vorhersageprogramme keinen Einfluss auf das Spleißen angeben UND nicht hoch konserviertes Nukleotid	<b>PP1</b>	Die Variante cosegregiert bei multiplen Familienmitgliedern mit der Erkrankung
		<b>PP2</b>	missense Variante in Gen mit geringer Rate benigner missense Varianten + missense Varianten als üblichem Erkrankungsmechanismus
		<b>PP3</b>	Multiple <i>in silico</i> Berechnungen sprechen für einen schädlichen Einfluss auf das Gen/-produkt
		<b>PP4</b>	Phänotyp oder Familienanamnese hoch spezifisch für Erkrankung mit einziger genetischer Ätiologie
		<b>PP5</b>	Reputable Quelle hat Variante als pathogen eingeordnet, aber Befunde sind für das Labor und unabhängige Evaluation nicht verfügbar

Abbildung 2.3: Kriterien zur Klassifizierung von Sequenzvarianten gemäß ACMG-Klassifizierungssystem. (nach Richards et al., 2015)

**BA** = stand alone, **BS** = strong, **BP** = supporting, **PVS** = very strong, **PS** = strong  
**PM** = moderate, **PP** = supporting, **FA** = Familienanamnese

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Überblick: Untersuchungsalgorithmus

Es wurde die DNA von 51 Patienten (weiblichen und männlichen Geschlechts) mit klinisch gesicherter, autosomal dominant vererbter Ataxie nach vorherigem Ausschluss der SCA-Subtypen SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA12, SCA17, SCA13, SCA14, SCA27 und SCA28 auf Mutationen im *KCND3*-Gen (SCA19-Locus) untersucht. Für alle Proben wurde mittels PCR eine Amplifizierung der sechs (*KCND3-002*) bzw. sieben (*KCND3-001*) Exons des *KCND3*-Gens sowie flankierender intronischer Areale durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die Sequenzierung nach Sanger. In Abhängigkeit von den Ergebnissen der anschließend durchgeführten Sequenzanalyse wurden fakultativ weitere Untersuchungen angeschlossen. Abbildung 3.1 (Seite 42) ist die Vorgehensweise im Überblick zu entnehmen. Die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen werden im Folgenden detailliert dargelegt.

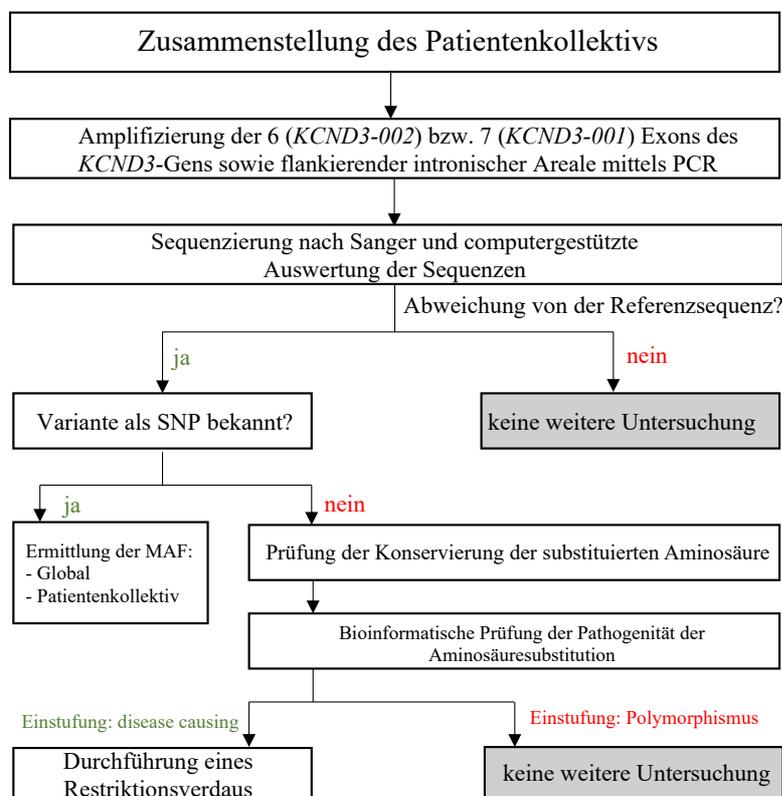


Abbildung 3.1: Untersuchungsalgorithmus.

PCR = Polymerase-Kettenreaktion, SNP = Single Nucleotide Polymorphism, MAF = Minor Allele Frequency.

## 3.2 Ergebnisse: Sequenzanalyse des *KCND3*-Gens

### 3.2.1 Exon 1 (*KCND3-002*)

#### (a) *c.264C>T* (*p.P88=*)

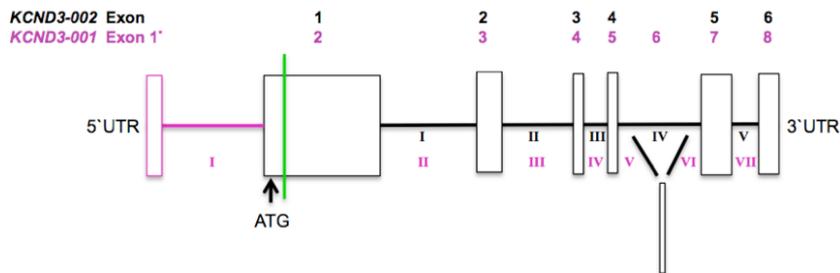


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Lokalisation der Sequenzvariante *c.264C>T* (grün) im Bereich des Exons 1 (*KCND3-002*).

Bei 18 Proben wurde die Sequenzvariante C>T an Position *c.264* identifiziert. Sie lag bei 17 Patienten heterozygot (Genotyp: C/T) und bei einer Probe homozygot (Genotyp: T/T) vor. Es handelt es sich um einen bekannten SNP (rs17221819), dessen MAF in der Bevölkerung auf T= 0,054 beziffert wird. Die Allelfrequenz im Patientenkollektiv betrug T= 0,186. Die Transition C>T hat eine Änderung des Basentriplets CCC zu CCT zur Folge, wobei beide Basentriplets für die Aminosäure Prolin (P) kodieren. Somit hat die Transition keine Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz des Proteins (*p.P88=*).

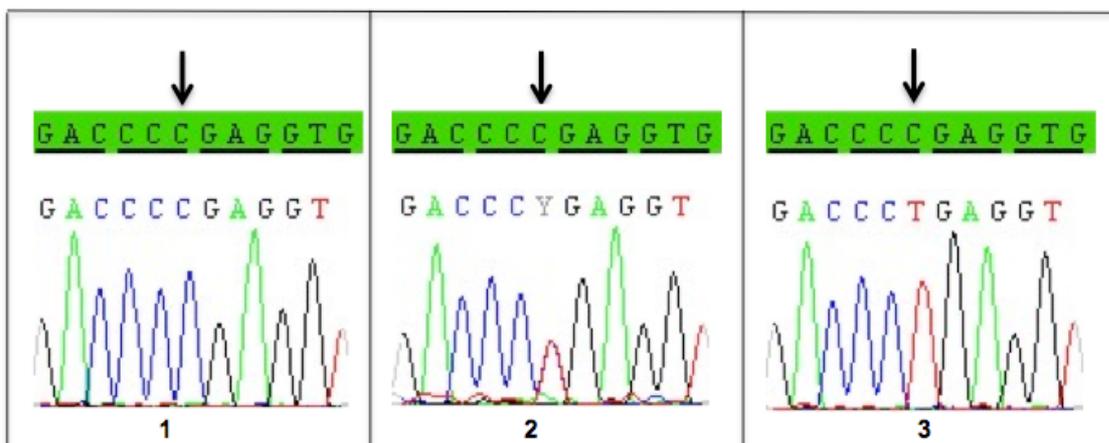


Abbildung 3.3: Sequenz-Ausschnitt des Exons 1 des *KCND3*-Gens (bezogen auf das Transkript *KCND3-002*)

1: Wildtyp, homozygot (Genotyp C/C)

2: Sequenzvariante, heterozygot (Genotyp C/T)

3: Sequenzvariante, homozygot (Genotyp T/T)

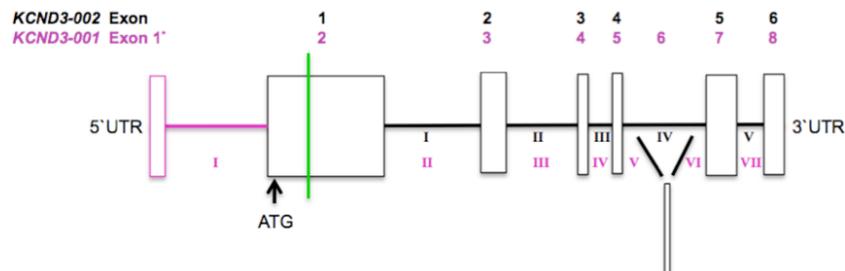
(b) *c.455A>G (p.D152G)*

Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der Lokalisation der Sequenzvariante *c.455A>G* (grün) im Bereich des Exons 1 (*KCND3-002*)

Bei einer Probe wurde heterozygot die Sequenzvariante *c.455A>G* identifiziert (Genotyp: A/G). Der Basenaustausch betrifft die zweite Position des Tripletts: Während das Basentriplett GAC für die Aminosäure Asparaginsäure (D) kodiert, führt die Transition A>G zu einer Änderung des Tripletts zu GGC, das für die Aminosäure Glycin (G) kodiert (*p.D152G*). In der Folge kommt es zu einer Änderung der Aminosäuresequenz des Proteins. Es handelt sich um eine bislang unbekannt Sequenzvariante, deren Allelfrequenz im Patientenkollektiv  $G = 0,0098$  betrug. Zur Abschätzung ihrer Pathogenität wurden weitere Untersuchungen angeschlossen (siehe Seite 52 ff.). Abbildung 3.20 (Seite 55) stellt die Lage der Variante auf Proteinebene dar.

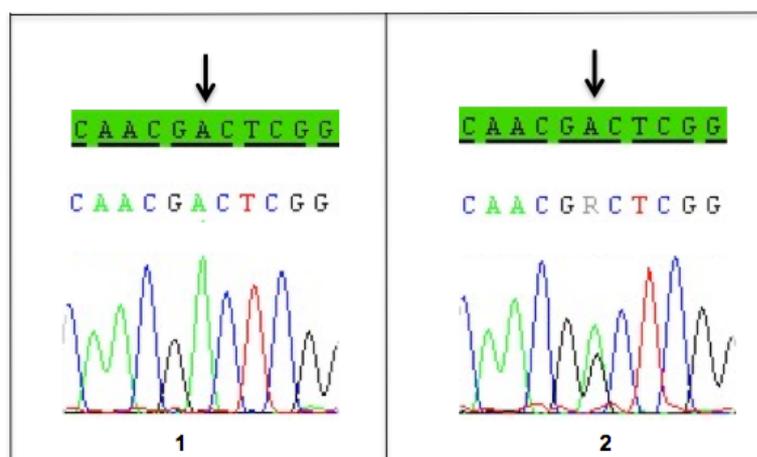


Abbildung 3.5: Sequenz-Ausschnitt des Exons 1 des *KCND3*-Gens (bezogen auf das Transkript *KCND3-002*)

1: Wildtyp, homozygot (Genotyp: A/A)

2: Sequenzvariante, heterozygot (Genotyp: A/G)

(c) *c.669G>C, (p.S223=)*

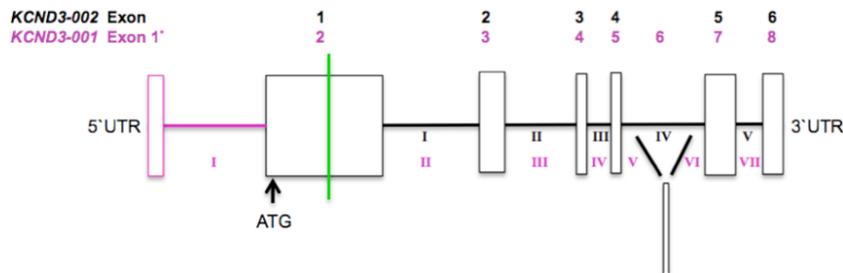


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung der Lokalisation der Sequenzvariante *c.669G>C* (grün) im Bereich des Exons 1 (*KCND3-002*)

Die Sequenzveränderung *c.669G>C* wurde bei zwei Proben nachgewiesen. Sie lag bei allen Betroffenen heterozygot vor (Genotyp: G/C). Es handelt sich um einen bekannten SNP (rs17215423), dessen MAF in der Bevölkerung auf C= 0,01 beziffert wird. Die Allelfrequenz im Patientenkollektiv betrug C= 0,0196.

Die Transversion G>C führt zu einer Änderung der dritten Base des Basentriplets TCG zu TCC, wobei beide Tripletts für die Aminosäure Serin (S) kodieren (*p.S223=*). Die Proteinsequenz bleibt somit erhalten.

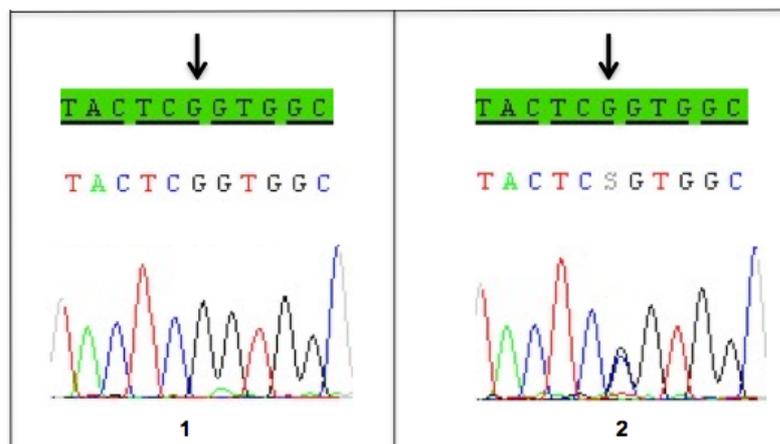


Abbildung 3.7: Sequenz-Ausschnitt des Exons 1 des *KCND3*-Gens (bezogen auf das Transkript *KCND3-002*)

1: Wildtyp, homozygot (Genotyp: G/G)

2: Sequenzvariante, heterozygot (Genotyp: G/C)

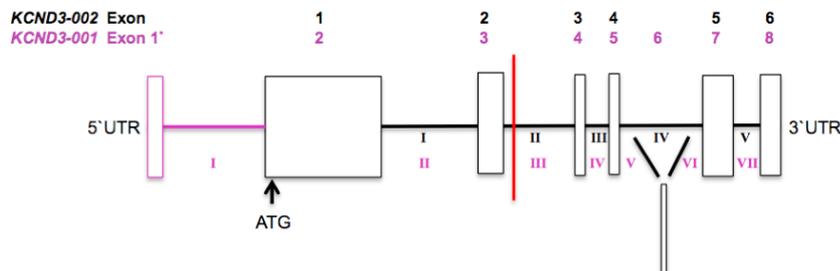
3.2.2 Exon 2 (*KCND3-002*)(a) *c.1339+15C>A*

Abbildung 3.8: Schematische Darstellung der Lokalisation der Sequenzvariante *c.1339+15C>A* (rot) im Bereich des Introns 2 (*KCND3-002*)

Die Sequenzanalyse im Bereich des Introns 2 ergab bei 13 Patienten heterozygot den Basenaustausch C>A an Position *c.1339+15* (Genotyp: C/A). Bei dieser Sequenzveränderung handelt es sich um einen bekannten SNP (rs3738298), dessen MAF in der Bevölkerung mit A=0,176 angegeben wird. Die Allelfrequenz lag im Patientenkollektiv bei A=0,127.

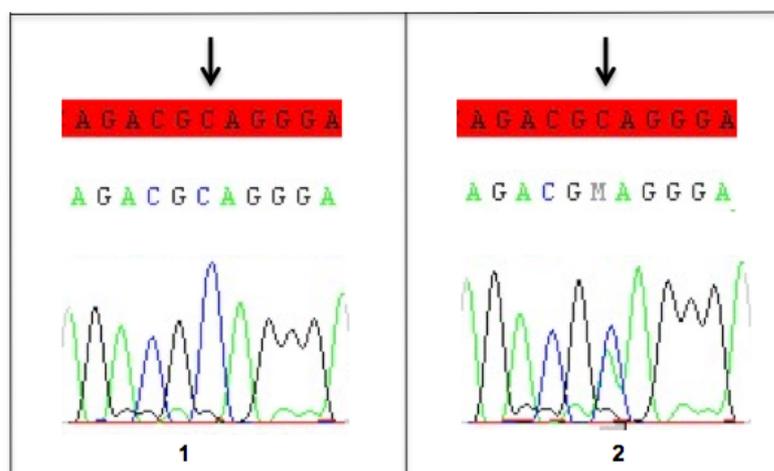


Abbildung 3.9: Sequenz-Ausschnitt des Introns 2 des *KCND3*-Gens (bezogen auf das Transkript *KCND3-002*)

- 1: Wildtyp, homozygot (Genotyp: C/C)
- 2: Sequenzvariante, heterozygot (Genotyp: C/A)

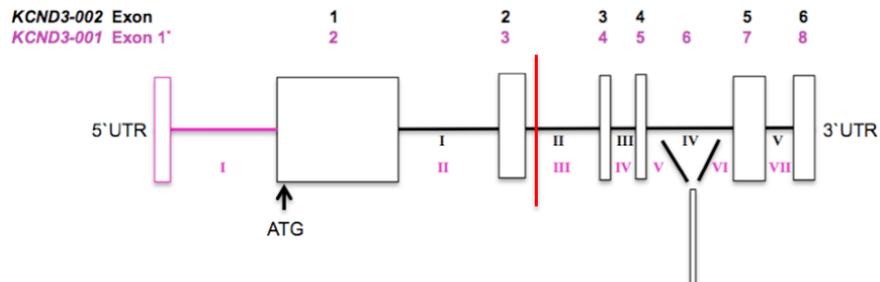
(b) *c.1339+21A>C*

Abbildung 3.10: Schematische Darstellung der Lokalisation der Sequenzvariante *c.1339+21A>C* (rot) im Bereich des Introns 2 (*KCND3-002*)

Bei einer Probe ergab die Sequenzanalyse den Basenaustausch A>C an Position *c.1339+21*. Dieser lag heterozygot vor (Genotyp: A/C) und war bislang unbekannt. Die Allelfrequenz im Patientenkollektiv betrug  $C = 0,0098$ .

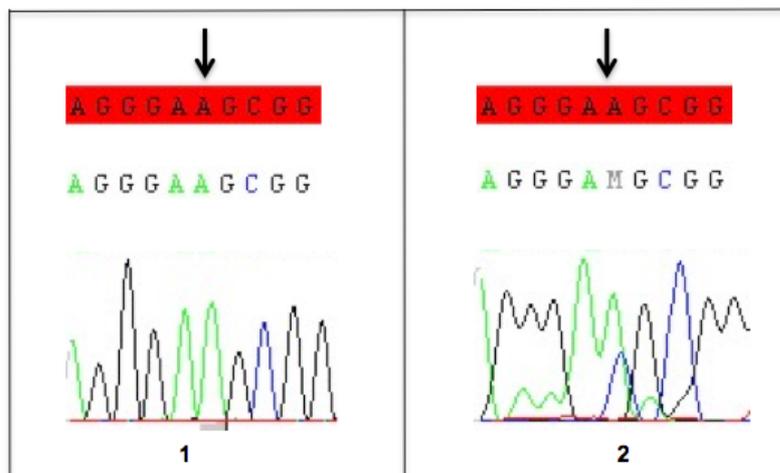


Abbildung 3.11: Sequenz-Ausschnitt des Introns 2 des *KCND3*-Gens (bezogen auf das Transkript *KCND3-002*)

1: Wildtyp, homozygot (Genotyp: A/A)

2: Sequenzvariante, heterozygot (Genotyp: A/C)

### 3.2.3 Exon 3-4 (*KCND3-002*)

#### (a) *c.1442-102\_1442-101insA*

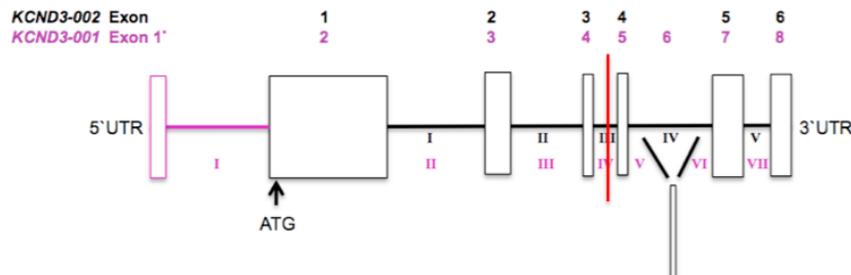


Abbildung 3.12: Schematische Darstellung der Lokalisation der Sequenzvariante *c.1442-102\_1442-101insA* (rot) im Bereich des Introns 3 (*KCND3-002*)

Bei einer Probe wurde heterozygot die Insertion eines Adenins (A) an Position 1442-102\_1442-101 des Introns 3 identifiziert. Dabei handelt es sich um einen SNP (rs72548727), dessen MAF in der Bevölkerung auf 0,044 beziffert wird. Die MAF im Patientenkollektiv lag bei 0,0098. Beim Wildtyp findet sich an dieser Position die Base Thymin (T) (siehe Abbildungen 3.13 und 3.14, Seite 48).

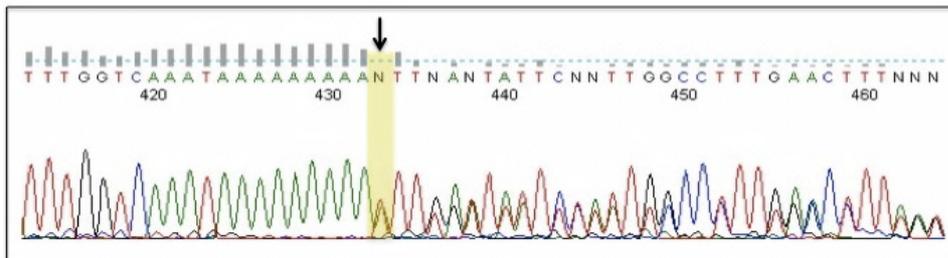


Abbildung 3.13: Sequenz-Ausschnitt des Introns 3 des *KCND3*-Gens (bezogen auf das Transkript *KCND3-002*). Der Pfeil markiert die Insertion des Adenin (A); sichtbar als zusätzlich zum roten Thymin (T)-Fluoreszenzsignal auftretendes grünes Fluoreszenzsignal. Nachfolgend sind jeweils zwei verschiedenfarbige Fluoreszenz-Peaks pro Basenposition vorhanden, was in der konsekutiven Verschiebung der Basenabfolge begründet ist. Ausnahmen sind Peaks, die sich aus einer zufälligen Übereinstimmung von Basen an der jeweiligen Position ergeben.

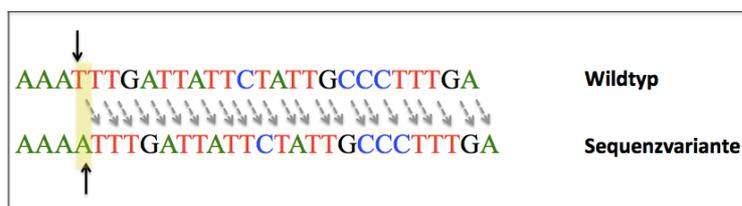


Abbildung 3.14: Sequenz-Ausschnitt des Introns 3 des *KCND3*-Gens (bezogen auf das Transkript *KCND3-002*). Die Pfeile markieren die Position der Adenin-Insertion (A).

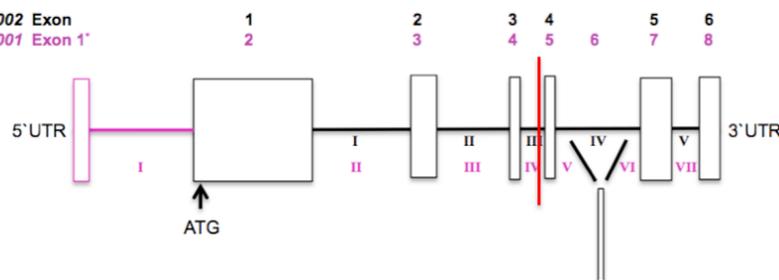
(b) *c.1442-7T>C*

Abbildung 3.15: Schematische Darstellung der Lokalisation der Sequenzvariante *c.1442-7T>C* im Bereich des Introns 3 (*KCND3-002*)

Bei einer Probe wurde heterozygot der Basenaustausch T>C an Position *c.1442-7* identifiziert (Genotyp: T/C). Dabei handelt es sich um eine neue Variante, deren Allelfrequenz im Patientenkollektiv bei  $C = 0,0098$  lag.

Die Variante ist in der Spleiß-Akzeptor-Sequenz am 3'-Ende des Introns 3 (*KCND3-002*) lokalisiert.

Die web basierte Applikation *MutationTaster* stuft sie als Polymorphismus, also benigne, ein.

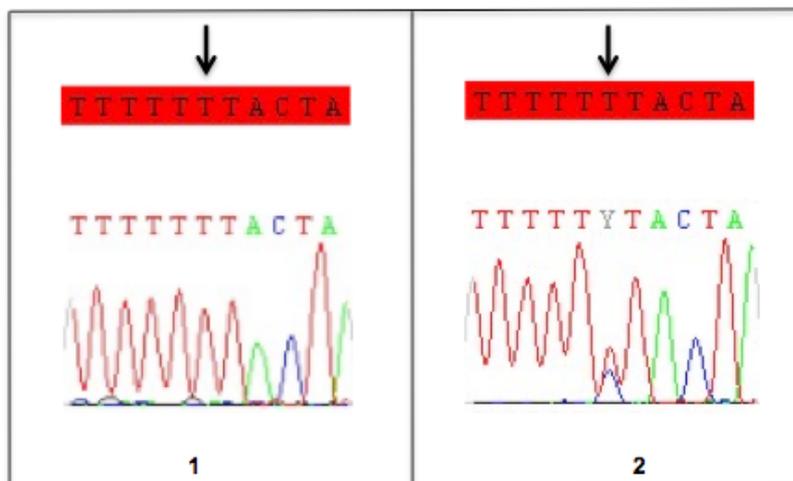


Abbildung 3.16: Sequenz-Ausschnitt des Introns 3 des *KCND3*-Gens (bezogen auf das Transkript *KCND3-002*)

1: Wildtyp, homozygot (Genotyp: T/T)

2: Sequenzvariante, heterozygot (Genotyp: T/C)

### 3.2.4 Exon 5 (*KCND3-002*)

Im Rahmen der Sequenzanalyse des Exons 5 sowie angrenzenden intronischen Arealen wurden keine Sequenzvarianten nachgewiesen.

### 3.2.5 Exon 6 (*KCND3-002*)

Im Rahmen der Sequenzanalyse des Exons 6 und angrenzenden intronischen Arealen wurden keine Sequenzvarianten nachgewiesen.

### 3.2.6 Exon 6.001 (*KCND-001*)

#### (a) *c.1591+26A>T*

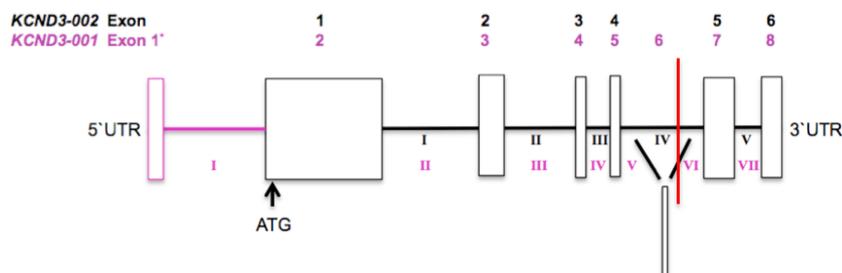


Abbildung 3.17: Schematische Darstellung der Lokalisation der Sequenzvariante *c.1591+26A>T* im Bereich des Introns 6 (*KCND3-001*).

Bei 13 Proben wurde heterozygot der Basenaustausch  $A>T$  an Position *c.1591+26A>T* identifiziert. Dabei handelt es sich um einen bekannten SNP (rs640029), dessen MAF in der Bevölkerung auf  $T=0,19$  beziffert wird. Die Allelfrequenz im Patientenkollektiv lag bei  $T=0,127$ .

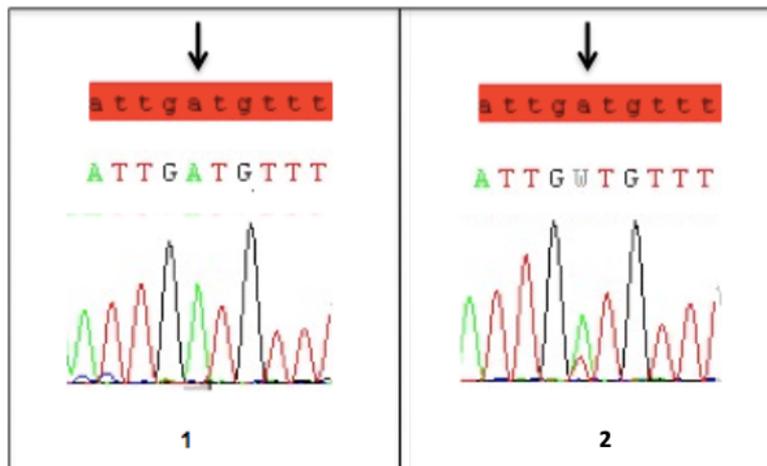


Abbildung 3.18: Sequenz-Ausschnitt des Introns 6 des *KCND3*-Gens (bezogen auf das Transkript *KCND3-001*)

1: Wildtyp, homozygot (Genotyp: A/A)

2: Sequenzvariante, heterozygot (Genotyp: A/T)

### 3.2.7 Überblick: Identifizierte Sequenzvarianten in *KCND3*

Insgesamt wurden im untersuchten Patientenkollektiv acht unterschiedliche Sequenzvarianten innerhalb exonischer und intronischer Areale des *KCND3*-Gens identifiziert, wobei drei der Varianten zum Zeitpunkt ihres Nachweises noch nicht bekannt waren. Die Tabelle 3.1 (Seite 51) liefert einen Überblick über die identifizierten Varianten, ihre Lokalisation und, soweit bekannt, ihre MAF (global und im Patientenkollektiv).

Tabelle 3.1: Identifizierte Sequenzveränderungen im Überblick

Nr.* <sup>1</sup>	Lokalisation	Sequenzveränderung	SNP-ID	MAF <sub>global</sub>	MAF <sub>Kollektiv</sub>
1.	Exon 1	c.264C>T (p.P88=)	rs17221819	0,054	0,186
2.	Exon 1	c.455A>G (p.D152G)	-	-	0,0098
3.	Exon 1	c.669G>C (p.S223=)	rs17215423	0,01	0,0196
4.	Intron 2	c.1339+15C>A	rs3738298	0,176	0,127
5.	Intron 2	c.1339+21A>C	-	-	0,0098
6.	Intron 3	c.1442-102_1442-101insA	rs72548727	0,044	0,0098
7.	Intron 3	c.1442-7T>C	-	-	0,0098
8.	Intron 6	c.1591+26A>T	rs640029	0,19	0,127

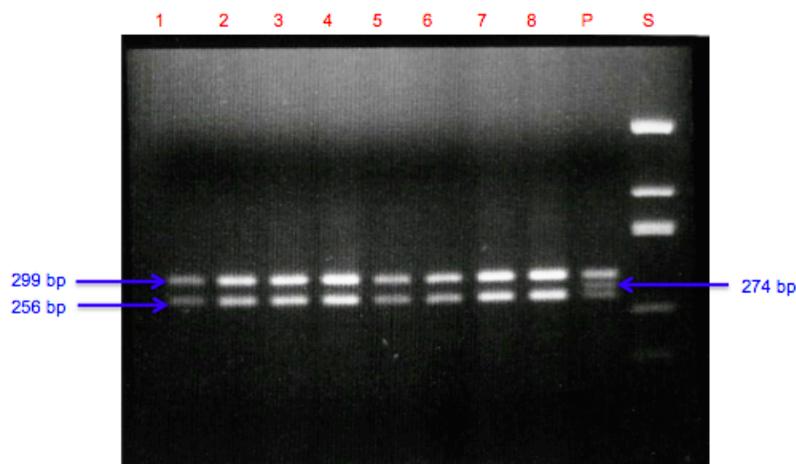
\*<sup>1</sup> Nr. 1 bis 7: Angaben zur Lokalisation beziehen sich auf das Transkript *KCND3-002*.

Nr. 8: Angabe zur Lokalisation bezieht sich auf das Transkript *KCND3-001*.

- = unbekannt, blau = die im Rahmen dieser Arbeit erstmals beschriebenen Sequenzvarianten

### 3.3 Restriktionsverdau Sequenzvariante c.455A>G (p.D152G)

Um die bei einer Patientin im Exon 1 identifizierte, heterozygot vorliegende Sequenzvariante c.455A>G (p.D152G) hinsichtlich der Abschätzung ihrer Pathogenität näher charakterisieren zu können, wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt. Dieser liefert Hinweise darauf, ob die Variante auch bei einem Kontrollkollektiv neurologisch gesunder Personen vorkommt. Es wurde die DNA von 100 Kontrollproben auf das Vorliegen der Sequenzvariante c.455A>G (p.D152G) getestet. Beim Wildtyp weist das HinfI-Enzym innerhalb eines 573 bp Fragments im Exon 1 (*KCND3-002*) zwei Schnittstellen auf: die Sequenz wird somit in drei Fragmente mit Längen von 299 bp, 256 bp und 18 bp getrennt. Mittels Agarose-Gelelektrophorese können zwei dieser Banden (299 bp und 256 bp) sichtbar gemacht werden. Die 18 bp-Bande wird hingegen nicht dargestellt. Liegt heterozygot die Sequenzvariante c.455A>G (p.D152G) vor, entfällt im Bereich des betroffenen DNA-Stranges eine der Schnittstellen, so dass dieser nicht in drei, sondern zwei Fragmente mit Längen von 299 bp und 274 bp getrennt wird. Im Agarose-Gel stellen sich bei heterozygoten Trägern der Variante drei Banden mit den Längen 299 bp, 274 bp und 256 bp dar. Abbildung 3.19 (Seite 52) verdeutlicht dies exemplarisch. Bei keiner der 100 Kontrollproben wurde eine 274 bp-Bande identifiziert. Die Sequenzvariante c.455A>G (p.D152G) wurde folglich bei keiner Kontrollprobe, entsprechend 200 Chromosomen, nachgewiesen.



**Abbildung 3.19:** Agarose-Gelelektrophorese nach Restriktionsverdau. Es handelt sich um eine exemplarische Darstellung (2,5 %-iges Agarose-Gel). **1-8** = Kontrollproben, **P** = Positivkontrolle (c.455A>G), **S** = Größenstandard (pUC/DdeI).

### 3.4 Konservierung der substituierten Aminosäure c.455A>G (p.D152G)

Die Sequenzvariante c.455A>G hat eine Aminosäuresubstitution zur Folge (p.D152G). Zur Ermittlung der Konservierung der substituierten Aminosäure Asparaginsäure (D) wurde die Online-Datenbank *Ensembl Genome Browser* herangezogen. Hierbei wurden orthologe Aminosäuresequenzen anderer Organismen mit der des humanen K<sub>v</sub>4.3-Kanals an Position 152 abgeglichen.

**Tabelle 3.2: Vergleich von einer die Aminosäure 152 (D) einschließenden Aminosäuresequenz innerhalb des Exons 1 des humanen *KCND3*-Gens (*KCND3-002*) mit orthologen Aminosäuresequenzen anderer Organismen. (nach *Ensembl Genome Browser*, <https://www.ensembl.org>).**

Mensch	ENSP00000319591 ( <i>Homo sapiens</i> )	YGILPEIIGDCCYEEYKDRKRENAERLMDDN <b>D</b> SENNQE-SMP SLSFRQTMWRAFENPHTS
Gemeiner Schimpanse	ENSPTRP00000061222 ( <i>Pan troglodytes</i> )	YGILPEIIGDCCYEEYKDRKRENAERLMDDN <b>D</b> SENNQE-SMP SLSFRQTMWRAFENPHTS
Westlicher Flachlandgorilla	ENSGGOP00000015202 ( <i>Gorilla gorilla gorilla</i> )	YGILPEIIGDCCYEEYKDRKRENAERLMDDN <b>D</b> SENNQE-SMP SLSFRQTMWRAFENPHTS
Rhesusaffe	ENSMMP00000019025 ( <i>Macaca mulatta</i> )	YGILPEIIGDCCYEEYKDRKRENAERLMDDN <b>D</b> SENNQE-SMP SLSFRQTMWRAFENPHTS
Sumatra-Orang-Utan	ENSPPYP00000001194 ( <i>Pongo abelii</i> )	YGILPEIIGDCCYEEYKDRKRENAERLMDDN <b>D</b> SENNQE-SMP SLSFRQTMWRAFENPHTS
Anubispavian	ENSPANP00000000019 ( <i>Papio anubis</i> )	YGILPEIIGDCCYEEYKDRKRENAERLMDDN <b>D</b> SENNQE-SMP SLSFRQTMWRAFENPHTS
Grauer Mausmaki	ENSMICP00000010489 ( <i>Microcebus murinus</i> )	YGILPEIIGDCCYEEYKDRKRENAERLMDDN <b>D</b> SENNQE-SMP SLSFRQTMWRAFENPHTS
Wanderratte	ENSRNOP00000019997 ( <i>Rattus norvegicus</i> )	YGILPEIIGDCCYEEYKDRKRENAERLMDDN <b>R</b> SENNQE-SMP SLSFRQTMWRAFENPHTS
Hausmaus	ENSMUSP00000113436 ( <i>Mus musculus</i> )	YGILPEIIGDCCYEEYKDRKRENAERLMDDN <b>D</b> SENNQE-SMP SLSFRQTMWRAFENPHTS
Haushund	ENSCAFP00000020125 ( <i>Canis lupus familiaris</i> )	YGILPEIIGDCCYEEYKDRKRENAERLMDDN <b>D</b> SENNQE-SMP SLSFRQTMWRAFENPHTS
Hauskatze	ENSCAFP00000002460 ( <i>Felis catus</i> )	YGILPEIIGDCCYEEYKDRKRENAERLMDDN <b>D</b> SENNQE-SMP SLSFRQTMWRAFENPHTS
Rind	ENSBTAP00000042331 ( <i>Bos taurus</i> )	YGILPEIIGDCCYEEYKDRKRENAERLMDDN <b>D</b> SENNQE-SMP SLSFRQTMWRAFENPHTS
Hauspferd	ENSECAP00000009544 ( <i>Equus caballus</i> )	YGILPEIIGDCCYEEYKDRKRENAERLMDDN <b>D</b> SENNQE-SMP SLSFRQTMWRAFENPHTS
Hauschaf	ENSOARP00000021111 ( <i>Ovis aries</i> )	YGILPEIIGDCCYEEYKDRKRENAERLMDDN <b>D</b> SENNQE-SMP SLSFRQTMWRAFENPHTS
Wildschwein	ENSSPCP00000007233 ( <i>Sus scrofa</i> )	YGILPEIIGDCCYEEYKDRKRENAERLMDDN <b>D</b> SENNQE-SMP SLSFRQTMWRAFENPHTS
Wildkaninchen	ENSOCUP00000012275 ( <i>Oryctolagus cuniculus</i> )	YGILPEIIGDCCYEEYKDRKRENAERLMDDN <b>D</b> SENNQE-SMP SLSFRQTMWRAFENPHTS
Amerikanischer Pfeifhase	ENSOPRP00000003734 ( <i>Ochotona princeps</i> )	YGILPEIIGDCCYEEYKDRKRENAERLMDDN <b>D</b> SENNQE-AMP SLSFRQTMWRAFENPHTS
Zebrafink	ENSTGUP00000014058 ( <i>Taeniopygia guttata</i> )	YGILPEIIGDCCYEEYKDRKRENAERLMDDN <b>D</b> SENNQE-GSMPSLSFRQTMWRAFENPHTS
Halsbandschnäpper	ENSFALP0000000690 ( <i>Ficedula albicollis</i> )	YGILPEIIGDCCYEEYKDRKRENAERLMDDN <b>D</b> SENNQE-GSAPSLSFRQTMWRAFENPHTS
Dorsch	ENSGMOP00000005468 ( <i>Gadus morhua</i> )	FGI IPEIIGDCCYEEYKDRKRENAERLQDDL-EDNKDKKPPNMTCRETMWRAFENPHTS
Reiskärfpling	ENSORLP00000007358 ( <i>Oryzias latipes</i> )	FGI IPEIIGDCCYEEYKDRKRENLERLQDDQ-EEIKDKMLPNMSFRETMWRAFENPHTS
Kleine Taufliede	FBpp0111766 ( <i>Drosophila melanogaster</i> )	FGIMPDVIGDCCYEDYRDRKRENAERLMDD <b>K</b> LSENGDQNLQQLTNMRQKMWRAFENPHTS
Fadenwurm	Y73B6L.19 ( <i>Caenorhabditis elegans</i> )	FGIMPDLISDCCYEDYKDRKRENQERLQ <b>EE</b> RVENADISTL---KLSLKEKMWAAFENPHTT

**grün** = Bei der Aminosäure an Position 152 handelt es sich (wie bei *Homo sapiens*) um Asparaginsäure (D).

**rot** = Bei der Aminosäure an Position 152 handelt es sich (anders als bei *Homo sapiens*) nicht um Asparaginsäure (D)/ Die jeweilige Aminosäure stimmt nicht mit der entsprechenden humanen Aminosäure überein.

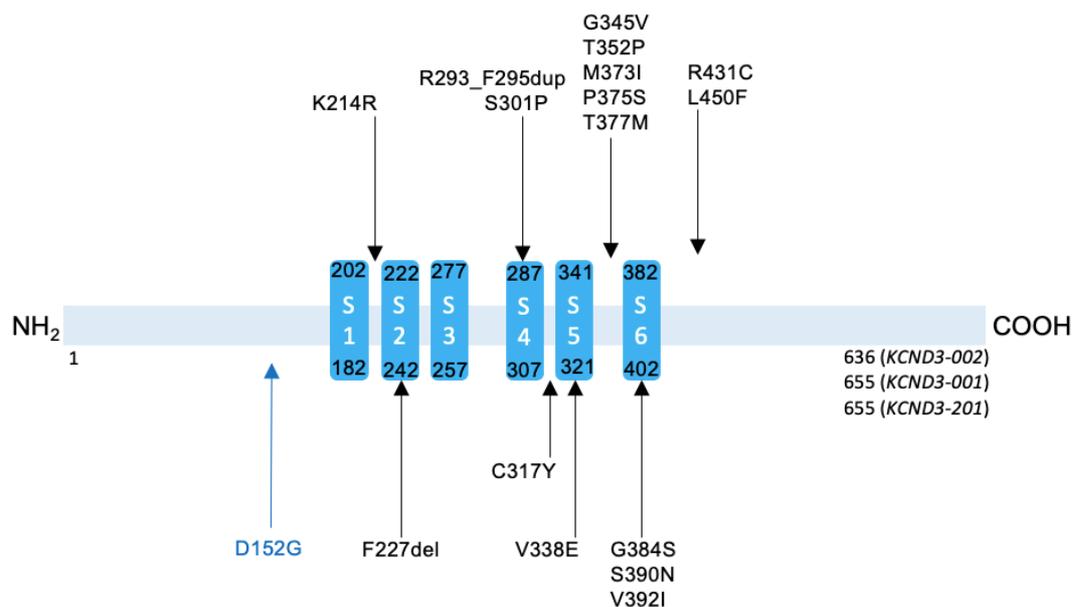
Wie Tabelle 3.2 (Seite 53) zu entnehmen, weisen weitere Primaten wie der Schimpanse (*Pan troglodytes*) und der Rhesusaffe (*Macaca mulatta*) ebenfalls die Aminosäure Asparaginsäure (D) an Position 152 auf. Zu beachten ist, dass auch die unmittelbar umliegenden Aminosäuren mit den humanen Aminosäuren der jeweiligen Position übereinstimmen. Somit sind innerhalb des ausgewählten Areals keine Abweichungen von der humanen Aminosäuresequenz festzustellen. Nagetiere wie die Hausmaus (*Mus musculus*) zeigen eine hohe Übereinstimmung ihrer Aminosäuresequenzen mit der humanen Sequenz im betrachteten Areal. Bei ihnen findet sich an Position 152 ebenfalls die Aminosäure Asparaginsäure. Eine Ausnahme stellt die Wanderratte (*Rattus norvegicus*) dar, bei der sich an dieser Position die (der Asparaginsäure strukturell jedoch sehr ähnlichen) Aminosäure Glutaminsäure (E) findet. Umliegende Aminosäuren stimmen jedoch mit den humanen Aminosäuren der jeweiligen Position überein. Weitere Organismen wie beispielsweise das Rind (*Bos taurus*), der Haushund (*Canis lupus familiaris*) oder Vogelarten wie der Zebrafink (*Taeniopygia guttata*) oder der Halsbandschnäpper (*Ficedula albicollis*) weisen an Position 152 wie der Mensch die Aminosäure Asparaginsäure (D) auf und zeigen auch im umliegenden Areal hohe Übereinstimmungen mit der humanen Aminosäuresequenz. Ausnahmen bilden hierbei etwa der Krallenfrosch (*Xenopus tropicalis*), die kleine Taufliege (*Drosophila melanogaster*) und der Fadenwurm (*Caenorhabditis elegans*). Insbesondere diverse Fischarten weisen teilweise erhebliche Sequenzabweichungen der Aminosäuresequenzen im Bereich um die Aminosäure 152 auf. Die in unserem Fall an Position 152 detektierte Aminosäure Glycin (G) kommt bei keiner Spezies vor. Dies spricht für eine hohe Konservierung des ursprünglichen Asparaginsäure-Restes.

### 3.5 Bioinformatische Berechnung der Pathogenität der Sequenzvariante c.455A>G (p.D152G)

Zur Abschätzung der Pathogenität der durch die Sequenzvariante c.455A>G bedingten Änderung der Aminosäuresequenz (p.D152G) wurde das Programm *MutationTaster* verwendet, welches das pathogene Potential von Sequenzvarianten berechnet. Die im Rahmen dieser Arbeit identifizierte neue Sequenzvariante c.455A>G (p.D152G) wurde als „disease causing“, also krankheitsverursachend, eingestuft.

Ergänzend wurden im Anschluss die *in silico* Programme *Polyphen-2*, *PROVEAN* und *SIFT* abgefragt, welche die Variante hingegen als „benign“ (*Polyphen-2*) bzw. „neutral“ (*PROVEAN*) einstufen. *SIFT* kam mit einem Score von 0,08 zu einer Einschätzung als „tolerated“.

Die Vorhersageprogramme kamen folglich zu einer uneinheitlichen Einschätzung des pathogenen Potentials von c.455A>G (p.D152G).



**Abbildung 3.20:** Schematische Darstellung der Lokalisation bekannter Mutationen des humanen *KCND3*-Gens einschließlich der im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifizierten Sequenzvariante c.455A>G (p.D152G).

### 3.6 Klinik der Patientin mit der Sequenzvariante c.455A>G (p.D152G)

Die Patientin mit der identifizierten Sequenzvariante c.455A>G (p.D152G) litt an einem progredienten cerebellär-ataktischen Syndrom im Rahmen einer Kleinhirnatrophie. Die Symptome umfassten:

- Dysarthrie und Dysphagie
  - Blickrichtungsnystagmus nach rechts und links
  - eine verlangsamte Feinmotorik der Hände und ein Restless-Legs-Syndrom
  - Gangunsicherheit und Fallneigung (Tandemstand nicht möglich, Seiltänzerengang nur zeitweise mit Unterstützung möglich)
  - ataktischer KHV
  - leichter Intentionstremor im FNV
  - positiver Romberg-Stehversuch
  - seitengleich schwach erhältlicher BSR, TSR, RPR, PSR. ASR nicht auslösbar
- SARA Score von 7

Genauere Informationen bezüglich des Alters der Patientin bei Symptommanifestation oder der zeitlichen Reihenfolge des Auftretens der jeweiligen Symptome liegen nicht vor.

Ein cMRT hatte mikroangiopathische Veränderungen im Bereich des Marklagers, der Stammganglien und der Pons ergeben. Nebenbefundlich bestanden bei der Patientin u.a. eine alkoholtoxische und diabetische Polyneuropathie, ein Diabetes mellitus Typ 2, eine arterielle Hypertonie sowie eine Depression. Eine kardiale Grunderkrankung war nicht beschrieben. Angaben der Patientin zufolge litten sowohl ihr Vater als auch ihre Schwester an einer Gangataxie mit Fallneigung, sodass der Verdacht auf das Vorliegen einer hereditär bedingten Ataxie fiel (siehe Abbildung 3.21, Seite 57). Die zunächst erfolgte humangenetische Testung auf die Erkrankung an einem der SCA-Subtypen 1, 2, 3, 6, 7, 14, 17 und 23 war negativ ausgefallen.

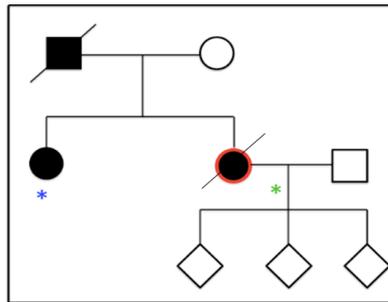


Abbildung 3.21: Stammbaum der Familie der Patientin mit der identifizierten Sequenzvariante c.455A>G (p.D152G).

**rot** = Kennzeichnung der Patientin mit der identifizierten Sequenzvariante c.455A>G (p.D152G)

**\*** = Kinder der Schwester anamnestisch unauffällig. Keine näheren Angaben bekannt.

**\*** = drei Kinder der Patientin anamnestisch unauffällig. Keine näheren Angaben bekannt.

**Rauten** = unbekanntes Geschlecht

Die Ergebnisse der Untersuchungen der Sequenzvariante c.455A>G (p.D152G) sind wie folgt zusammenzufassen:

- Die Variante c.455A>G (p.D152G) ist bis heute (Stand Juli 2021) nicht in Sequenzdatenbanken (*1000 Genomes*) annotiert
- Der Abgleich orthologer Aminosäuresequenzen anderer Organismen mit der des humanen K<sub>v</sub>4.3-Kanals an Aminosäure-Position 152 spricht für eine hohe Konservierung der substituierten Aminosäure (Asparaginsäure)
- Die Variante wurde im Rahmen einer Restriktionsanalyse in 100 Kontrollproben neurologisch gesunder Personen (entsprechend 200 Chromosomen) nicht nachgewiesen
- Bioinformatische Berechnungen kamen zu nicht einheitlichen Ergebnissen bzgl. des pathogenen Potentials der Sequenzvariante
- Die Klinik der Patientin entspricht einem progredienten cerebellär-ataktischen Syndrom im Rahmen einer Kleinhirnatrophie. Die anamnestischen Angaben sprechen für eine hereditäre Erkrankung.

Nähere Angaben zur Klassifizierung der Sequenzvariante gemäß ACMG-Klassifizierungssystem sind unter 4.2.2 (Seite 62 ff.) aufgeführt.

## 4 Diskussion

### 4.1 SCA19: Häufigkeit

Die Angaben zur Häufigkeit der SCAs basieren auf Schätzungen, wobei die Prävalenz der SCAs in Europa auf 1-5: 100 000 beziffert wird (Bird, 2019; Ruano et al., 2014; van de Warrenburg, 2002). Die SCA3 stellt hierbei den weltweit häufigsten Subtyp dar, gefolgt von weiteren Subtypen mit kodierender CAG-Repeatexpansion in Form der SCA1, 2, 6 und 7 (Bird, 2019).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchte SCA19 gehört der bislang als selten geltenden, aktuell jedoch schnell wachsenden Gruppe der SCA-Subtypen mit zugrundeliegenden Punktmutationen an (Sandford & Burmeister, 2014). Nicht zuletzt aufgrund der zeit- und kostenaufwendigen Testung ist insbesondere innerhalb dieser Gruppe von einer hohen Dunkelziffer auszugehen.

Schätzungen zur Gesamtprävalenz der SCA19 sind derzeit noch nicht verfügbar. Nach der Identifikation des Krankheitslocus (Verbeek et al., 2002) publizierten Duarri et al. im Jahr 2013 die erste Studie zur Häufigkeit der SCA19/22 in Europa in einem jedoch vorselektionierten Patientenkollektiv. Es wurden 366 Fälle familiärer Ataxie (zu großen Teilen französischer Ethnizität) nach Ausschluss von SCA1, 2, 3, 6, 7, 17, 23 und DRPLA auf *KCND3*-Mutationen getestet. Dabei wurde bei einem Patienten eine entsprechende Mutation detektiert. Duarri et al. zufolge wies das Studienergebnis mit einer Häufigkeit der SCA19 von < 0,5% somit auf eine eher untergeordnete Rolle der Erkrankung unter den selteneren SCA-Subtypen in Europa hin.

In den Folgejahren wurden Betroffene unterschiedlicher Ethnizitäten, vornehmlich aus dem europäischen und asiatischen Raum, diagnostiziert. Das augenscheinlich weltweite Vorkommen der SCA19 unterscheidet sie von anderen Subtypen - wie beispielsweise der SCA28, welche in Europa ca. 1,5% der ADCAs zugrunde liegt, in anderen großen Populationen (wie der chinesischen) aber noch nicht diagnostiziert wurde (Sandford & Burmeister, 2014; Cagnoli et al., 2010).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein vorselektiertes Patientenkollektiv von 51 Patienten deutscher Ethnizität mit klinisch gesicherter, autosomal dominant vererbter Ataxie nach Ausschluss anderer SCA-Subtypen (SCA1, 2, 3, 6, 7, 12, 17, 13, 14, 27 und 28) auf Mutationen im *KCND3*-Gen untersucht. Hierbei wurde eine Patientin, die eine Variante unklarer klinischer Relevanz (Klasse 3 nach ACMG) einzustufende Sequenzvariante (c.455A>G, p.D152G) aufwies, identifiziert. Die putative Pathogenität dieser Variante vorausgesetzt, weist die SCA19 in unserem Kollektiv eine Prävalenz von maximal 1,96% auf. Diese Angabe kann vorerst als Richtwert für die Relevanz der SCA19 in der molekulargenetischen Diagnostik oder Aufarbeitung bislang nicht geklärter ADCA-Erkrankungen erachtet werden, erlaubt aufgrund der Vorselektionierung jedoch keinen Aufschluss über die Prävalenz der SCA19 in der deutschen Gesamtbevölkerung.

Mit dem Einzug von Methoden wie dem sogenannten „Next Generation Sequencing“ (NGS) ist in den letzten Jahren eine schnelle und breit aufgestellte Testung vieler krankheitsassoziierter Gene möglich geworden, z.B. über eine Panel-Testung oder auch über die Sequenzierung von Exomen (Sullivan et al., 2019).

Mit einer steigenden Zahl an Testungen sind präzisere Angaben zur Häufigkeit des Krankheitsbildes zu erwarten.

## 4.2 SCA19: Genetik

### 4.2.1 Sequenzvariante c.455A>G (p.D152G)

Bei einer Patientin wurde heterozygot die Sequenzvariante c.455A>G identifiziert (Genotyp: A/G). Hierbei betrifft der Basenaustausch die zweite Position des Triplets und führt so zu einer Änderung des Triplets von GAC (kodiert für die Aminosäure Asparaginsäure (D)) zu GGC (kodiert für die Aminosäure Glycin (G)). In der Folge kommt es zu einer Änderung der Aminosäuresequenz des Proteins (p.D152G).

Die Sequenzvariante war zum Zeitpunkt ihrer Identifizierung nicht beschrieben und auch nicht in Sequenzdatenbanken, wie *1000 Genomes*, hinterlegt.

Zur Abschätzung ihres pathogenen Potentials wurden weitere Untersuchungen angeschlossen.

Zur Ermittlung der Konservierung der substituierten Aminosäure Asparaginsäure (D) wurde die Online-Datenbank *Ensembl Genome Browser* herangezogen. Es wurden orthologe Aminosäuresequenzen anderer Organismen mit der des humanen *KCND3*-Gens an Position 152 abgeglichen. Es konnte festgestellt werden, dass die Substitution eine evolutionär konservierte Aminosäure betrifft (siehe 3.4, Seite 53 ff.). Im Rahmen eines Restriktionsverdau wurde geprüft, ob die Variante auch bei neurologisch gesunden Personen vorkommt. Zu diesem Zweck wurde ein 100 Personen umfassendes Kontrollkollektiv (200 Chromosomen) auf das Vorliegen der Variante getestet. Sie wurde bei keiner Kontrollprobe nachgewiesen (siehe 3.3, Seite 52), so dass von einem seltenen Vorkommen der Variante auszugehen ist.

Auch heute (Stand Juli 2021) ist die Variante c.455A>G (p.D152G) nicht in Sequenzdatenbanken hinterlegt. Im gleichen Codon ist jedoch eine andere Variante (p.D152N, rs1183337083) beschrieben, die mit einer MAF von < 0,01 sehr selten vorkommt. Vorhersageprogramme kommen zu einem uneinheitlichen Ergebnis hinsichtlich ihrer putativen Pathogenität (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>; <https://www.ensembl.org>).

Auch die in dieser Arbeit beschriebene Variante c.455A>G (p.D152G) wurde mit Applikationen wie *MutationTaster*, *PolyPhen2*, *PROVEAN* und *SIFT* auf ihr pathogenes Potential geprüft. Die Programme kamen zu einem uneinheitlichen Ergebnis. Während *MutationTaster* die Variante als „krankheitsverursachend“ einstuft, wird sie von *PolyPhen2* und den in der Art der Auswertung sehr ähnlichen Programmen *PROVEAN* und *SIFT* hingegen als „neutral“ bzw. „tolerated“ bewertet.

Da die verschiedenen Softwareprogramme unterschiedliche Algorithmen für ihre Vorhersage nutzen, wird empfohlen, mehrere Softwareprogramme hinsichtlich der Einordnung einer Variante zu befragen (Richards et al., 2015). Zudem sollten sie nicht als alleiniges Werkzeug eingesetzt werden, um die pathophysiologische Konsequenz einer Variante zu beschreiben.

Die putativ pathogene Wirkung von c.455A>G (p.D152G) könnte dennoch durch eine weitere Klasse 3-Variante in unmittelbarer Nachbarschaft (p.D150H, rs1488410733), die von verschiedenen *in silico* Programmen (darunter *SIFT* und *PolyPhen2*) als pathogen eingestuft wird, gestützt werden (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>; <https://www.ensembl.org>). Der Bereich um die Aminosäuren 150 und 152 ist evolutionär hoch konserviert (siehe 3.4, Seite 53 ff.) und könnte als cytoplasmatische Domäne eine wichtige Rolle spielen. Experimentelle Untersuchungen sollten folgen.

Vor Untersuchungsbeginn waren acht verschiedene Mutationen im Bereich des *KCND3*-Gens vorbekannt (Duarri et al., 2012; Lee et al., 2012). Vier der Mutationen waren im Bereich des Exon 1 lokalisiert, drei im Bereich des Exon 2 und eine im Bereich des Exon 3 (bezogen auf das Transkript *KCND3-002*) und damit im Bereich der sechs Transmembrandomänen (S1 bis S6) bzw. der C-terminalen cytoplasmatischen Domäne des K<sub>v</sub>4.3-Kanals. Mutationen im Bereich der Exons 4 bis 6.001 sind bis heute bei Ataxie-Patienten nicht bekannt.

Seit 2015 wurden zudem insgesamt drei Fälle von *de novo* Mutationen beschrieben (R293\_F295dup, p.S301 und p.G384S), welche in Exon 1 und 2 (bezogen auf das Transkript *KCND3-002*) lokalisiert sind. Diese Varianten betreffen Bereiche der Transmembrandomäne S4 und somit den Spannungssensor des Kanals (R293\_F295dup, p.S301) bzw. die Transmembrandomäne S6 (p.G384S).

Die durch uns identifizierte Variante c.455A>G (p.D152G) ist die neunte im Exon 1 des *KCND3*-Gens lokalisierte Variante. Als bislang einzig bekannte Variante ist sie im Bereich der N-terminalen cytoplasmatischen Domäne des K<sub>v</sub>4.3-Kanals lokalisiert. Eine funktionelle Beeinträchtigung der Kanalfunktion *in silico* ohne entsprechende Experimente nachzuweisen, ist daher schwierig.

#### 4.2.2 Sequenzvariante c.455A>G (p.D152G): Klassifizierung gemäß ACMG

Die Variante c.455A>G (p.D152G) ist auf Grundlage der bekannten Daten aktuell einer Klasse 3-Variante (VUS) nach ACMG zuzuordnen. Die Möglichkeit einer definitiven Zuordnung zu dieser Klasse ist (derzeit) jedoch durch folgende Faktoren limitiert:

- Betreffend der Kriterien PS1 und BS3:

*in vitro/in vivo* Studien zum pathogenen Potential der Variante stehen aus

- Betreffend der Kriterien PP1 und BS4:

Angaben zu Familienangehörigen der Patientin sind auf anamnestische Angaben der Patientin beschränkt, für eine (molekulargenetische) Testung und/oder weiterführende Untersuchungen standen uns leider keine Familienmitglieder zur Verfügung.

- Betreffend der Kriterien PP3 und BP4:

*in silico* Programme (*MutationTaster*, *Polyphen-2*, *PROVEAN*, *SIFT*) kamen zu uneinheitlichen Vorhersagen hinsichtlich der putativen Pathogenität der Variante. Die Kriterien widersprechen sich somit und die Ergebnisse gehen konsekutiv weder in eine „benigne“ noch „pathogene“ Gewichtung ein.

Weiterhin wurden die zwei Kriterien PM1 und PM5 aktuell als nicht zutreffend gewertet, wobei diese Zuordnungen nicht mit letzter Sicherheit möglich sind:

Wenngleich die Region um die Variante derzeit nicht als *hot spot* für Mutationen gilt (als solcher ist derzeit die Region um den Selektivitätsfilter und die Transmembrandomäne S6 anzunehmen), wurde zwischenzeitlich eine in unmittelbarer Nachbarschaft befindliche Variante (p.D150H) identifiziert, welche von mehreren *in silico* Programmen als pathogen eingestuft wurde. Bezüglich des zweitgenannten Kriteriums, PM5, ist als limitierender Faktor zu berücksichtigen, dass, wie weiter oben ausgeführt, im gleichen Codon eine Variante (p.D152N) detektiert wurde, für die *in silico* Programme zu einem uneinheitlichen Ergebnis kamen und deren putative Pathogenität somit nicht abschließend geklärt ist.

Zusammenfassend sollte berücksichtigt werden, dass insbesondere weiterführende Untersuchungen etwaiger Auswirkungen der im Bereich der N-terminalen cytoplasmatischen Domäne des K<sub>v</sub>4.3-Kanals lokalisierten Sequenzvarianten auf die Proteinfunktion einen wesentlichen Beitrag zu einer Reklassifizierung der Sequenzvariante c.455A>G (p.D152G) leisten könnten.

#### 4.2.3 Identifizierte Single-Nucleotide-Polymorphismen (SNPs)

Der Identifikation von Abweichungen von Referenzsequenzen in der *KCND3*-Sequenzanalyse in unserem Patientenkollektiv folgten Anschlussuntersuchungen mit dem Ziel, diese als „gutartige“ Variante, also als Single Nucleotide Polymorphism (SNP), oder als „potentiell pathogene“ Variante, also als Mutation, einzuordnen.

Hierzu wurde auf die Datenbank *Single Nucleotide Polymorphism Database* des *National Center for Biotechnology and Information* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) zurückgegriffen. In diesem Zuge wurden fünf der acht im Rahmen dieser Arbeit detektierten Sequenzvarianten als Single Nucleotide Polymorphism (SNP), bzw. als Klasse 1-Varianten, also Normvarianten ohne klinische Relevanz, kategorisiert (c.264C>T, c.669G>C, c.1339+15C>A, c.1442-102\_1442-101insA, c.1591+26A>T). Zwei weitere Varianten waren nicht als SNP vorbekannt, konnten jedoch dieser Gruppe zugeordnet werden. Zum einen handelt es sich hierbei um die intronisch gelegene Variante c.1339+21A>C (Intron 2, *KCND3-002*), zum anderen um die Variante c.1442-7T>C (Intron 3, *KCND3-002*).

Letztgenannte ist im Bereich der Spleiß-Akzeptor-Sequenz am 3'-Ende von Intron 3 lokalisiert. Die Sequenzierung des menschlichen Genoms hat gezeigt, dass die meisten prä-mRNAs alternativ gespleißt werden, mit der Folge, dass eine größere Zahl unterschiedlicher Proteine gebildet wird, als es auf Grundlage der Anzahl unserer Gene zu erwarten wäre (Berg et al., 2017b). Entstehen im Rahmen des Spleißens aber Defekte bzw. Fehler (z.B. durch Punktmutationen), wird von aberrantem Spleißen gesprochen.

Für einige genetische Erkrankungen wurde bereits nachgewiesen, dass diese auf aberrantes Spleißen zurückzuführen sind; hierzu zählen beispielsweise die Cystische Fibrose (*CFTR*), die Hämophilie A (*FaktorVIII*) oder die Spinale Muskelatrophie (*SMN1/2*) (Berg et al., 2017b).

Die Sequenzvariante c.1442-7T>C wurde weiterführend mittels *MutationTaster* auf ihr pathogenes Potential geprüft. *MutationTaster* kam hierbei zu ihrer Einstufung als „Polymorphismus“. Wie unter 4.2.1 (Seite 59 ff.) ausgeführt, eignen sich entsprechende Vorhersageprogramme jedoch nicht als alleiniges Werkzeug, um die pathophysiologische Konsequenz einer Variante zu beurteilen. Letzte Sicherheit hinsichtlich einer putativen Pathogenität wäre hier durch weitere Untersuchungen zu erzielen, indem Patienten-RNA nach deren Isolation einer Prüfung bzgl. des Nachweises aberranten Spleißens unterzogen wird.

### **4.3 Auswirkungen von *KCND3*-Mutationen auf den $K_v4.3$ -Kanal**

Wie unter 1.4.2 (Seite 16 ff.) ausgeführt, liegt die Funktion des neuronalen  $K_v4$ -Kanalkomplexes durch den von ihm vermittelten Typ-A Kalium-Strom in der dendritischen Erregbarkeit, der somatodendritischen Signalintegration und der Langzeitpotenzierung (Covarrubias et al., 2008).  $K_v4$ -Kanäle vom Typ  $K_v4.3$  liegen im Cerebellum hoch konzentriert vor (Lee et al., 2012). Sie werden zudem auch in Kardiomyocyten exprimiert, weshalb das *KCND3*-Gen auch Gegenstand der Herzforschung ist, darunter in den Bereichen plötzlicher Herztod (SUD), dem zu den hereditären Arrhythmie-Syndromen zählenden Brugada-Syndrom (BrS), dem Vorhofflimmern und dem Early Repolarization Syndrom (ERS) (z.B. Low et al., 2017; Giudecchi et al., 2011).

Obwohl der zugrundeliegende Pathomechanismus als nicht vollständig verstanden gilt, werden *loss of function KCND3*-Mutationen mit dem neurologischen Phänotyp, *gain of function KCND3*-Mutationen mit dem kardiologischen Phänotyp assoziiert (Pollini et al., 2020).

Bis dato wurden 16 verschiedene *KCND3*-Mutationen mit neurologischem Phänotyp beschrieben. Diese sind zwischen der S1-Transmembrandomäne und der C-terminalen cytoplasmatischen Domäne des Proteins lokalisiert. Auf Grundlage der zur Verfügung stehenden Daten können aufgrund der Anzahl der dort lokalisierten Mutationen der Bereich des Selektivitätsfilters und der Transmembrandomäne S6, auf die acht der bekannten Mutationen entfallen (p.G345V, p.T352P, p.M373I, p.P375S, p.T377M, p.G384S, p.S390N, p.V392I), als *hot spots* für Mutationen angenommen werden.

Es wurden zudem Studienergebnisse (Duarri et al., 2015) publiziert, die sich den krankheitsauslösenden Pathomechanismen von *KCND3*-Mutationen widmeten und insbesondere auf die Frage abzielten, ob der manifesten SCA19 eine rein durch *K<sub>v</sub>4.3-loss of function* bedingte Haploinsuffizienz zugrunde liegt und/oder eine Modifizierung der Funktion der *WT-K<sub>v</sub>4.3*-Kanaluntereinheiten durch mutierte Proteine als entscheidender ursächlicher Faktor zu werten ist.

Es wurde gezeigt, dass mutierte SCA19-Untereinheiten den intrazellulären Transport des *WT-K<sub>v</sub>4.3*-Proteins beeinträchtigten, was eine intrazelluläre Retention und eine, in Anwesenheit von KChIP2 reversiblen, erhöhten Instabilität des *WT*/mutierten-Kanalheterokomplexes zur Folge hatte (Duarri et al., 2015). Ferner wurden im Rahmen dieser Studie u.a. eine dosisabhängig beeinträchtigte Kanalaktivität sowie eine Modifizierung der *K<sub>v</sub>4.3*-Kanalöffnungskinetik festgestellt. Die Untersuchungsergebnisse wurden mit der Klinik der zugehörigen Patienten korreliert. Es wurde postuliert, dass die Beeinträchtigung der Kanalaktivität mit einer früheren Symptommanifestation und einer starken phänotypischen Ausprägung, die vornehmliche Modifizierung der *K<sub>v</sub>4.3*-Kanalöffnungskinetik hingegen mit vergleichsweise weniger stark ausgeprägten Symptomkomplexen einherging (Duarri et al., 2015).

2020 erschien eine Übersichtsarbeit von Pollini et al., welche die bis dato vorliegenden Angaben zu mutierten  $K_v4.3$ -Proteinen bei Patienten mit neurologischem Phänotyp zusammenfasste. Demnach sind insbesondere folgende Mechanismen beschrieben:

- erhöhter Proteinabbau
- verminderter (intrazellulärer) Proteintransport
- reduzierter Kalium-Auswärtsstrom

Diese Mechanismen wurden, isoliert und/oder kombiniert, für neun der bekannten Mutationen beschrieben, die somit als *loss of function* Mutationen zusammengefasst werden können (siehe Abbildung 4.1, Seite 67).

Ausnahmen bilden die zwei bekannten *gain of function* Mutationen p.L450F (Duarri et al., 2013; Giudicessi et al., 2011) und p.V392I (Nakajima et al., 2020; Wang et al., 2019; Giudicessi et al., 2012). Beachtenswerterweise handelt es sich hierbei um Mutationen, die interdisziplinär (neurologisch und kardiologisch) beschrieben sind.

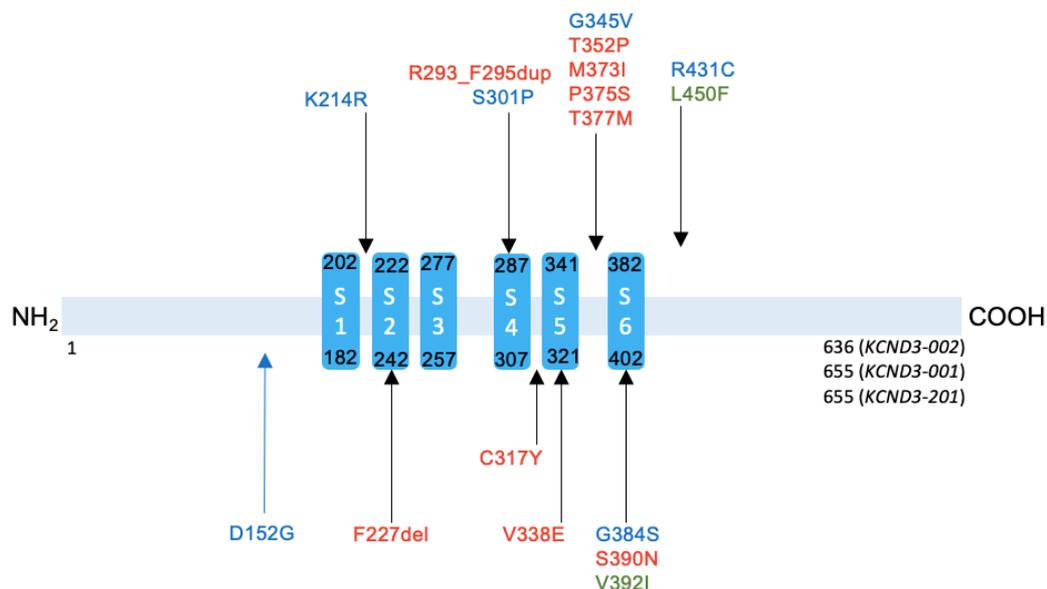
Erstgenannte war 2011 (Giudicessi et al.) bei einem Patienten mit BrS, 2013 (Duarri et al.) dann im Rahmen einer Studie zur Häufigkeit der SCA19 unter europäischen Ataxie-Patienten beschrieben worden und steht somit in ursächlichem Zusammenhang mit beiden Krankheitsbildern (Duarri et al., 2013). Die Mutation p.V392I wurde 2012 (Giudicessi et al.) erstmals bei einem SUD-Fall beschrieben, im weiteren Verlauf bei einem Patienten mit ungeklärter Epilepsie (Wang et al., 2019) und 2020 schließlich bei einer Familie identifiziert, in der bei betroffenen Mitgliedern *sowohl* kardiale (ERS, paroxysmales Vorhofflimmern) *als auch* cerebrale (Epilepsie, Intelligenzminderung) Symptome manifest waren (Nakajima et al.). Untersuchungen des  $K_v4.3$ -Proteins ergaben, dass die Mutation in einem „gemischten“ elektrophysiologischen Phänotyp, also einerseits einem funktionsgesteigerten mutierten  $K_v4.3$ -Protein (durch eine erhöhte Stromdichte und eine verzögerte Kanalinaktivierung) und andererseits einer Verminderung der Verfügbarkeit des funktionsgesteigerten mutierten  $K_v4.3$  (durch eine verzögerte Erholung von Kanalinaktivierung), resultierte (Nakajima et al., 2020; Giudicessi et al., 2012).

Es wurde ein Zusammenhang dieser Kanaleigenschaften zu sogenannten cardiocerebralen Phänotypen postuliert und ihre Manifestation entsprechend als kardiocerebrale Ionenanalerkrankung kategorisiert (Nakajima et al., 2020). Künftige Studien können hier zur Abschätzung einer Relevanz als eigenständiges Krankheitsbild beitragen.

Für weitere fünf Mutationen (p.K214R, p.S301P, p.G345V, p.G384S, p.R431C) lagen (noch) keine entsprechenden Daten vor.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifizierte Sequenzvariante c.455A>G (p.D152G) ist im Bereich der N-terminalen cytoplasmatischen Domäne des K<sub>v</sub>4.3-Kanals lokalisiert. Elektrophysiologische Untersuchungen bezüglich ihrer Auswirkungen auf die Kanalfunktion stehen derzeit aus.

Abbildung 4.1 (Seite 67) liefert einen Überblick über die Kategorien der Kanalfunktionsänderungen der bekannten Mutationen.



**Abbildung 4.1: Visualisierung der bekannten *KCND3*-Mutationen hinsichtlich der Funktionseigenschaften des mutierten K<sub>v</sub>4.3-Proteins.**  
**rot = loss of function, grün = gain of function, blau = nicht bekannt.**

#### 4.4 Klinik bekannter SCA19-Patienten im Vergleich

2020 (Pollini et al.) wurde eine Übersichtsarbeit zur Klinik bekannter SCA19-Patienten publiziert. Es waren initial 86 publizierte Fälle aus 14 Studien gesichtet und schließlich 68 Fälle aus 13 Studien ausgewählt worden, zu denen ausreichende klinische Daten bzgl. Symptomen und deren Entwicklung verfügbar waren. Auf Grundlage dieser Studie stellte die Ataxie das Leitsymptom bei *late onset* Patienten (53/68) dar, während Patienten mit frühem Manifestationsalter (15/68) vornehmlich ein Mischbild aus neurologischen Entwicklungsstörungen, gefolgt von Ataxie und Störungen der Okulomotorik, präsentierten. Eine Sonderstellung nahm die Epilepsie ein, welche ausschließlich bei Patienten mit frühem Krankheitsbeginn, und hier mit einer Häufigkeit von 7/15, beschrieben wurde.

Die Autoren nahmen auf dieser Grundlage eine Einteilung in zwei klinische Phänotypen der SCA19 vor:

- 1. *early onset* Form: Neurologische Entwicklungsstörung mit Epilepsie und/oder ataktischen Bewegungsstörungen v.a. im weiteren Krankheitsverlauf
- 2. *late onset* Form: Ausgeprägtes ataktisches Syndrom mit möglicher Abnahme kognitiver Funktionen/Fähigkeiten, Bewegungsstörungen und peripherer Neuropathie

Ataxie war bei 42 von 68 Patienten das Erstmanifestationssymptom und insgesamt bei 64 der 68 berücksichtigten Patienten beschrieben. Hierbei zeigte sich eine variable Ausprägung von Gangunsicherheiten, Extremitätendysmetrie, Dysdiadochokinese, cerebellärer Dysarthrie und Dysphagie (Pollini et al., 2020). Der Verlauf bei *late onset* Patienten wurde großteils als langsam progredient (Bettlägerigkeit bzw. Rollstuhlabhängigkeit nach 30-50 Jahren Krankheitsverlauf) beschrieben (Pollini et al., 2020; Hsiao et al., 2019; Huin et al., 2017). In der Gruppe der *early onset* Patienten wurden beachtenswerterweise ausnahmslos (15/15) kognitive Beeinträchtigungen und/oder neurologische Entwicklungsstörungen berichtet, somit waren diese in dieser Kohorte noch häufiger vertreten als die Ataxie. Unter den *late onset* Patienten waren kognitive Beeinträchtigungen weniger häufig beschrieben, ca. 25% der Patienten zeigten tendentiell geringgradig ausgeprägte kognitive Beeinträchtigungen (Pollini et al., 2020; Paucar et. al, 2018; Huin et al., 2017; Schelhaas et al., 2001).

Da unsere Patientin (c.455A>G, p.D152G) vor der molekularen Diagnosestellung leider verstarb, standen uns nur die in der Vergangenheit erhobenen anamnestischen Daten und Untersuchungsbefunde zur Auswertung zur Verfügung. Es war ein progredient cerebellär-ataktisches Syndrom mit explizit genannter Dysarthrie und Dysphagie, Gangunsicherheit und Fallneigung bekannt. Angaben zu einem Manifestationsalter lagen ebenso wenig vor wie Informationen über kognitive Defizite, wobei jedoch nicht bekannt ist, ob die Patientin hiernach zu Lebzeiten befragt bzw. hierauf getestet worden war. Eine Zuordnung der Patientin zu der von Pollini et al. postulierten *late onset* Form ist zusammenfassend nicht mit letzter Sicherheit möglich, aber als sehr wahrscheinlich anzunehmen.

Kognitive Defizite werden auch bei anderen Ionenkanalerkrankungen beschrieben: Einer Studie aus dem Jahr 2017 (Coutelier et al.) zufolge waren bei 23% von 59 untersuchten SCA-Patienten (*KCND3*, *KCNC3*, *KCNAI*, *CACNA1A*, *CACNA1G*) frühe kognitive Defizite bekannt.

Ergebnissen der SCA19-Übersichtsarbeit (Pollini et al., 2020) zufolge weiterhin häufig (36/68) beschrieben wurden Störungen der Okulomotorik (v.a. Sakkaden und Nystagmen) sowie Bewegungsauffälligkeiten/-störungen (23/68) (hierunter insbesondere Parkinsonismus, Tremor, Myoklonien). Neurologischen Untersuchungsergebnissen zufolge waren bei unserer Patientin (c.455A>G, p.D152G) ein Blickrichtungsnystagmus nach rechts und links sowie ein leichter Intentionstremor im FNV manifest.

Bei insgesamt 9 von 68 Patienten war Pollini et al. (2020) zufolge zudem eine depressive Erkrankung mit leicht bis stark ausgeprägten Symptomen beschrieben (Schelhaas et al., 2001; Huin et al., 2017). Eine nicht näher bezeichnete Depression war auch den Vordiagnosen unserer Patientin zu entnehmen. Trotz ihrer multifaktoriellen Ätiopathogenese sollte die Depression als dem SCA19-Symptomkomplex zugehörige Manifestation Beachtung finden. Einer Studie (Leroi et al., 2002) zufolge liegen bei etwa 77% der Patienten mit degenerativen Kleinhirnerkrankungen psychopathologische Störungen, insbesondere der Stimmung und in Form von Persönlichkeitsänderungen, vor.

Eine Sonderstellung im SCA19-Symptomkomplex nimmt die Epilepsie ein, welche innerhalb der *early onset* Kohorte bei 7 von 15 Patienten beschrieben wurde; bei 5 davon als Symptom der Erstmanifestation (Pollini et al., 2020; Wang et al., 2019; Huin et al., 2017).

Gesondert zu betrachten sind zwei Fälle zwischenzeitlich identifizierter *de novo* *KCND3*-Mutationen (Pollini et al., 2020; Smets et al., 2015). Die Klinik der betroffenen Patienten imponierte v.a. durch folgende Punkte:

- Bei den Patienten kam es bereits im Alter von drei Jahren (Smets et al.) bzw. um das 3. Lebensjahr (Pollini et al.) zur Manifestation erster Symptome, hierunter vornehmlich:
  - eine sistierende motorische Entwicklung mit zunehmend breitbasigem Gangbild (Smets et al.) bzw. motorisches Ungeschick im Sinne häufiger Stürze (Pollini et al.)
  - eine staccatoartige Sprache (Smets et al.) bzw. Sprachschwierigkeiten (Pollini et al.)
  - kognitive Einschränkungen (Smets et al.) bzw. mild ausgeprägte Intelligenzminderung (Pollini et al.)
- Strabismus, eine stark ausgeprägte orale Apraxie mit einhergehender Hypersalivation sowie eine abnorm erhöhte Gelenkbeweglichkeit (Smets et al.)

Eine weitere *de novo* *KCND3*-Mutation war 2017 (Kurihara et al.) bei einem 30-jährigen Patienten japanischer Ethnizität mit *early onset* Ataxie und Intelligenzminderung identifiziert worden. Begleitend waren Myoklonie und Dystonie manifest.

Bezüglich einer potentiellen Antizipation bei familiären SCA19-Fällen beschrieben sowohl Schelhaas et al. (2001) als auch Lee et al. (2012) in von ihnen untersuchten Familien ein mitunter zunehmend niedrigeres Manifestationsalter in den jüngeren Generationen, ohne dass jedoch begleitend eine Zunahme der klinischen Ausprägung der Erkrankung festzustellen war, was zusammenfassend auf Antizipation hinweisen, allerdings auch den Problemen bei der, insbesondere retrospektiven, Festlegung des individuellen Manifestationsalters geschuldet sein könnte. Über diese Frage könnten *follow up* Studien der bekannten SCA19-Familien in den kommenden Jahren Aufschluss geben.

Wenngleich das Patientenkollektiv derzeit klein ist und die Angaben zur Manifestationsform der SCA19 entsprechend limitiert sind, scheint eine Zusammenfassung wie folgt sinnvoll:

*Allgemein:*

- Leitsymptom: Ataxie (u.a. Gangunsicherheiten, Dysmetrie, Dysdiadochokinese, cerebelläre Dysarthrie und Dysphagie)
- Störungen der Okulomotorik (insbesondere Sakkaden, Nystagmen)
- Bewegungsauffälligkeiten/-störungen (insbesondere Parkinsonismus, Tremor, Myoklonie)
- seltener beobachtete Symptome: Depression, Pyramidenbahnzeichen, periphere Neuropathie

*Insbesondere bei Patienten mit frühem Manifestationsalter:*

- Epilepsie (auch als Erstsymptom relevant)
- Neurologische Entwicklungsstörungen/kognitive Beeinträchtigungen (auch als Erstsymptom relevant)

Der Symptomkomplex unserer Patientin (c.455A>G, p.D152G) deckt sich zusammenfassend in weiten Teilen mit den der Übersichtsarbeit von Pollini et al. (2020) zu entnehmenden Angaben zum SCA19-Symptomkomplex mit *late onset*. Als bedeutender interferierender Faktor ist der anamnestisch vorbekannte langjährige Alkoholabusus der Patientin zu erwähnen.

Cerebelläre Degeneration gilt als bekannte mögliche Langzeitfolge von Alkoholismus und manifestiert sich Studien zufolge bei über 60% der chronischen Alkoholiker in Form einer langsam progredienten Gangataxie (Oyinbo et al., 2016; Harper, 2009). Auch Manifestationen in Form von Extremitätenataxie, Dysarthrie, Tremor und Choreoathetose sind möglich (Singer & Teyssen, 2001; Gass & Hennerici, 1999). Im Rahmen einer cerebralen Bildgebung (cCT, cMRT) kommen regelmäßig eine kortikale cerebelläre Atrophie sowie ein atropher oberer Vermis zur Darstellung (Singer & Teyssen, 2001), wo die cerebelläre Degeneration häufig aus bislang ungeklärter Ursache beginnt, um sich dann in die Bereiche der Kleinhirnhemisphären fortzusetzen (Oyinbo et al., 2016).

Als typisch gilt eine Manifestation cerebellärer Symptome bei Abhängigen im mittleren Lebensalter mit lang bestehender Suchtproblematik (Oyinbo et al., 2016; Barsottini et al., 2014). Auf neuropsychologischer Ebene werden mitunter Depressionen beobachtet (Singer & Teyssen, 2001). Vor diesem Hintergrund sind die bei unserer Patientin beschriebenen Symptome nicht vorbehaltlos auf die Erkrankung an SCA19 zurückzuführen. Beachtung sollten an dieser Stelle jedoch Angaben der Patientin finden, deren zufolge auch Vater und Schwester an einer Gangataxie mit Fallneigung litten, was eine Symptominterpretation als manifeste SCA19 stützt.

#### **4.5 Empfehlungen: Vorgehen in der molekulargenetischen Diagnostik**

Eine molekulargenetische Testung auf das Vorliegen einer ADCA ist indiziert, wenn sich ein Patient mit einer klinisch gesicherten Ataxie vorstellt, dessen Familienanamnese auf einen autosomal dominanten Erbgang hinweist. Bei Abbildung 4.2 (Seite 74) handelt es sich um einen Vorschlag eines Diagnosealgorithmus unter Einbeziehung der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten SCA19.

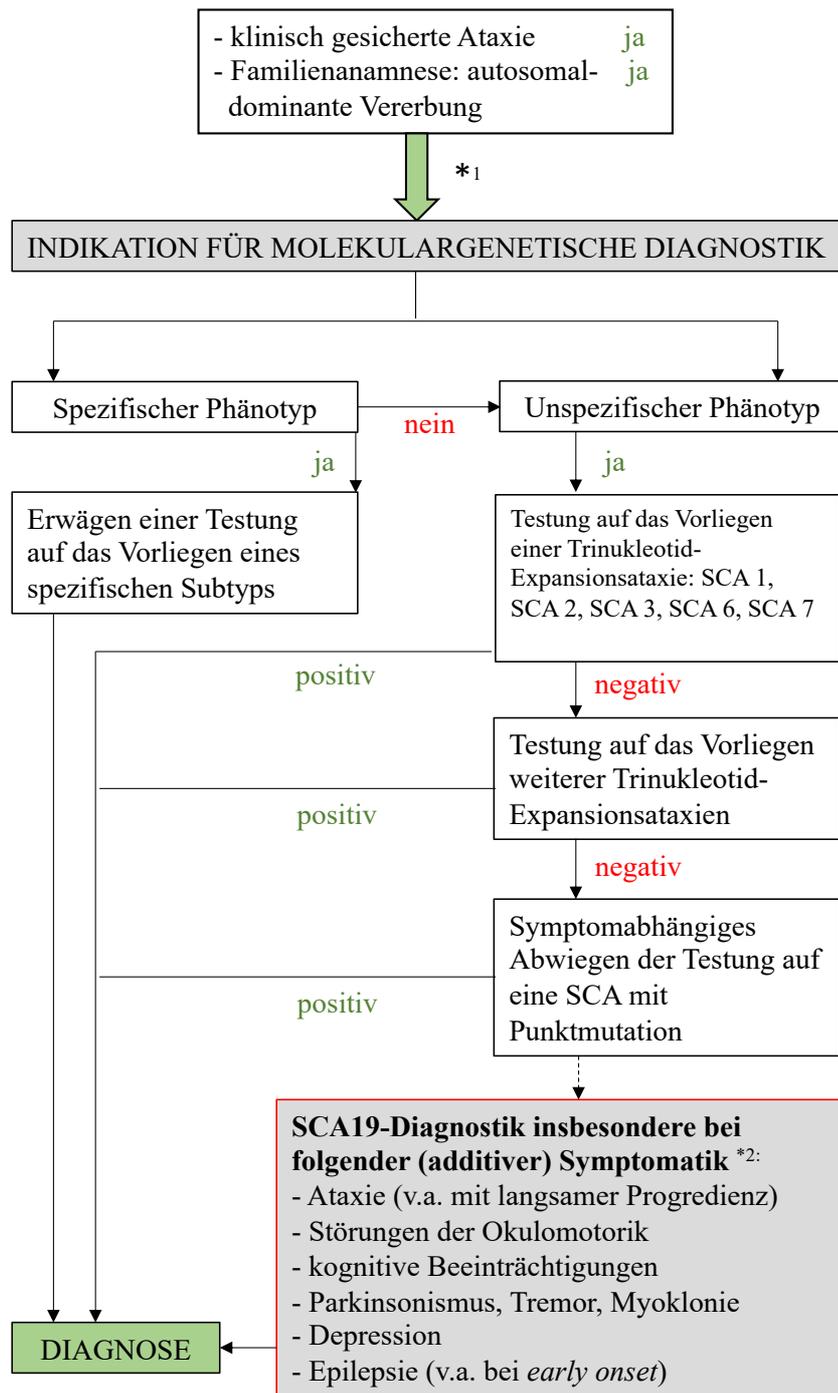


Abbildung 4.2: Empfehlung zum Vorgehen in der molekulargenetischen Stufendiagnostik.

\*<sup>1</sup> In Einzelfällen kann die Testung auf *KCND3*-Mutationen auch bei leerer Familienanamnese und atypischem Manifestationsalter/Symptomkomplex erwogen werden (siehe 4.4, Seite 68 ff.).

\*<sup>2</sup> Basierend auf der Symptomatik der bislang diagnostizierten SCA19/22-Patienten und der Patientin mit der Sequenzvariante c.455A>G (p.D152G). Unter Berücksichtigung der Lokalisationen bislang identifizierter Mutationen empfiehlt sich zunächst eine Testung auf Mutationen im Bereich des Exon 1, gefolgt von Exon 2 und Exons 3 bis 6/6.001 (*KCND3-002/KCND3-001*) (siehe Tabelle 3.1 Seite 51).

## 4.6 Ausblick

*KCND3*-Mutationen wurden in den vergangenen Jahren weltweit bei Patienten mit unterschiedlichen Ethnizitäten nachgewiesen. Dies rechtfertigt die Berücksichtigung dieses Subtyps in der molekulargenetischen Stufendiagnostik, oder in der Panel-Diagnostik bei Patienten mit ADCA und/oder anderweitig typischem Symptomkomplex. Über die Identifizierung weiterer pathogener Varianten und die damit einhergehenden größeren SCA19-Fallzahlen sind bessere Prognoseeinschätzungen zu erwarten, die z.B. für die private und berufliche Zukunftsplanung von Betroffenen relevant sein können (Sandford & Burmeister, 2014).

Zudem können weiterführende Untersuchungen der mutierten  $K_v4.3$ -Kanäle über ein besseres Verständnis der Pathomechanismen längerfristig zur Entwicklung (kurativer) Therapieansätze beitragen. Entsprechende elektrophysiologische und zellbiologische Untersuchungen stehen für unsere Variante (c.455A>G, p.D152G) derzeit aus.

*KCND3*-Gen-Mutationen sind aktuell nicht nur Gegenstand der neurologischen, sondern auch der Herzforschung. Im Jahr 2020 wurde erstmals eine Mutation (p.V392I) bei einer Familie identifiziert, in der bei betroffenen Mitgliedern sowohl kardiale als auch cerebrale Symptome manifest waren (Nakajima et al.). Im Rahmen weiterführender Untersuchungen des mutierten  $K_v4.3$ -Kanals wurde ein Zusammenhang seiner Eigenschaften zu sogenannten kardiocerebralen Phänotypen postuliert und die Manifestation als kardiocerebrale Ionenanalerkrankung kategorisiert (Nakajima et al., 2020). Ihre Relevanz kann durch künftige Testungen beurteilt werden.

Bezüglich des Umfanges molekulargenetischer Tests und Studien werden hierbei v.a. die zur Verfügung stehenden Testverfahren entscheiden. Die vorliegende Arbeit bediente sich zur Feststellung von Abweichungen von Referenzsequenzen der Sequenzierung nach Sanger. Diese Methode wird jedoch zunehmend durch Methoden des sogenannten „Next Generation Sequencing“ (NGS) abgelöst.

Diese Technologien ermöglichen die simultane Sequenzierung von vielen Genen, die mit einem Krankheitsbild assoziiert sind (Panel-Diagnostik), Exomen oder Genomen. Dadurch ist eine schnellere Umlaufzeit größerer Probenumfänge, ein größerer Probendurchsatz durch Multiplexverfahren sowie nicht zuletzt eine höhere Sensitivität bei der Detektion sogenannter *low frequency* Varianten möglich geworden (Zhong et al., 2021; Goodwin et al., 2016). Die Durchführung der entsprechenden Verfahren in der klinischen Labordiagnostik ist aktuell jedoch noch auf wenige große Zentren beschränkt, da sie mit einem hohen personellen Aufwand einhergehen und eine umfangreiche bioinformatische Auswertung voraussetzen. Auch die Validierung und Interpretation von (vielen) Sequenzvarianten als Zufallsbefund stellt eine Herausforderung dar (Zhong et al., 2021; Akkari et al., 2019).

## 5 Zusammenfassung

### 5.1 Zusammenfassung

Bei den Spinocerebellären Ataxien (SCAs) handelt es sich um eine heterogene Gruppe autosomal dominant vererbter, neurodegenerativer Erkrankungen, die derzeit 45 Loci umfasst. Zu den Leitsymptomen zählen cerebelläre Ataxie, Dysarthrie sowie Augenbewegungsstörungen, die kombiniert mit weiteren cerebellären und extracerebellären Symptomen auftreten können.

Der SCA19-Locus wurde im Jahr 2002 beschrieben und der chromosomalen Region 1p21-q21 zugeordnet. Im Jahr 2012 wurden Mutationen im für den spannungsabhängigen Kaliumkanal  $K_v4.3$  kodierenden *KCND3*-Gen als krankheitsverursachend identifiziert. Zwischenzeitlich wurden weltweit SCA19-Patienten zahlreicher unterschiedlicher Ethnizitäten diagnostiziert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde erstmals ein Patientenkollektiv deutscher Ataxie-Patienten auf das Vorliegen einer SCA19 untersucht. Insgesamt wurden acht verschiedene Sequenzvarianten innerhalb exonischer und intronischer Areale des *KCND3*-Gens detektiert, wobei drei der Varianten nicht vorbeschrieben waren. Bei einer Patientin wurde heterozygot die Variante c.455A>G (p.D152G) identifiziert, welche zusammenfassend als Klasse 3-Variante (VUS) eingeordnet wurde. Weiterhin neu identifiziert wurden die intronischen Varianten c.1339+21A>C (Intron 2) sowie die in der Spleiß-Akzeptor-Sequenz lokalisierte Variante c.1442-7T>C (Intron 3), welche heterozygot bei einer Probe vorlag und nach bioinformatischer Auswertung als Polymorphismus eingeordnet wurde. Vorbekannte Varianten wurden in Exon 1 in Form der SNPs c.264C>T (p.P88=, rs17221819) und c.669G>C (p.S223=, rs17215423), in Intron 2 in Form von c.1339+15C>A (rs3738298), in Intron 3 (c.1442-102\_1442-101insA, rs72548727) sowie in Intron 6.001 (c.1591+26A>T, rs640029, *KCND3-001*) nachgewiesen.

Die putative Pathogenität der Klasse 3-Variante c.455A>G (p.D152G) vorausgesetzt, beläuft sich die Häufigkeit der SCA19 in unserem Patientenkollektiv auf maximal 1,96% und legt auf dieser Grundlage ein eher seltenes Vorkommen der SCA19 bei deutschen Ataxie-Patienten nahe. In der ADCA-Stufendiagnostik sollte dieser Subtyp dennoch Berücksichtigung finden. Dies gilt insbesondere bei Vorliegen des klinischen Bildes eines langsam progredienten cerebellären Syndroms mit Gangunsicherheit, Dysarthrie, Störungen der Okulomotorik sowie psychischen/psychiatrischen Auffälligkeiten. Kognitive Defizite und Epilepsie sollten insbesondere bei frühem Manifestationsalter als potentiell spezifische SCA19-Symptome Berücksichtigung finden.

## 5.2 Summary

The spinocerebellar ataxias (SCAs) are a heterogenous group of autosomal dominant inherited neurodegenerative diseases, currently comprising 45 different SCA-loci. Main symptoms include cerebellar ataxia, dysarthria and eye-movement dysfunction, frequently accompanied by further cerebellar and extracerebellar symptoms.

The SCA19 locus was identified in 2002 and mapped to 1p21-q21. In 2012, mutations in *KCND3*, encoding the voltage-gated potassium channel K<sub>v</sub>4.3, were identified as disease-causing. Meanwhile, SCA19 patients of multiple ethnicities were diagnosed worldwide.

This study was the first to investigate the prevalence of SCA19 in ataxia-patients of German origin. Overall, we detected eight different sequence variants in exonic and intronic regions of *KCND3* gene, three of them were not annotated before.

In one female patient, the variant c.455A>G (p.D152G) was identified in exon 1 and classified as “variant of uncertain significance” (VUS). Furthermore, we identified the sequence variants c.1339+21A>C (intron 2) and c.1442-7T>C (intron 3), located in the splice acceptor site and heterozygously present in one patient. According to an *in silico* analysis of this variant, it was classified as a polymorphism.

Moreover, we identified five SNPs: c.264C>T (p.P88=, rs17221819) and c.669G>C (p.S223=, rs17215423) in exon 1, c.1339+15C>A (rs3738298) in intron 2, c.1442-102\_1442-101insA (rs72548727) in intron 3, and c.1591+26A>T (rs640029) in intron 6.001 (*KCND3-001*).

Assuming the putative pathogenicity of c.455A>G (p.D162G), the prevalence of SCA19 in our collective accounts for maximum 1.96%, suggesting a rather minor relevance of this subtype among German ataxia patients. Nonetheless, we recommend SCA19 to be considered in ADCA molecular workflow. In particular, a symptom complex consisting of a slowly progressive cerebellar syndrome including gait disturbances, dysarthria, eye-movement dysfunctions as well as psychological/psychiatric disturbances justifies its consideration and testing. In patients with *early onset*, cognitive impairment and epilepsy might be distinctive SCA19 symptoms.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
A	Ampere
ADCA	autosomal dominant cerebellar ataxia
ARCA	autosomal recessive cerebellar ataxia
ASR	Achillessehnenreflex
BrS	Brugada-Syndrom
BSR	Bizepssehnenreflex
cM	centimorgan
cMRT	craniale Magnetresonanztomographie
DNA	deoxyribonucleid acid (Desoxyribonukleinsäure)
DPLP	Dipeptidyl-Peptidase-Like-Proteins
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DRPLA	Dentatorubrale Pallido-Luysische Atrophie
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EA	Episodische Ataxie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERS	Early Repolarization Syndrome
F	forward
FNV	Finger-Nase-Versuch
FRDA	Friedreich-Ataxie, Morbus Friedreich
FXTAS	Fragiles-X-Tremor-Ataxie-Syndrom
H <sub>2</sub> O (dd)	Wasser (Bidestillatus)
KChIPs	K <sup>+</sup> -Channel-Interacting-Proteins
KHV	Knie-Hacken-Versuch
KSS	Kearns-Sayre Syndrom

---

l	Liter
M	molare Masse
m	milli ( $10^{-3}$ )
$\mu$	mikro ( $10^{-6}$ )
MERFF	Myoklonus-Epilepie mit ragged red fibers
min	Minute(n)
mol	Mol
MSA	Multisystematrophie
NARP	Neuropathie, Ataxie und Retinitis pigmentosa
NGS	Next Generation Sequencing
p	pico ( $10^{-12}$ )
p	kurzer Arm eines Chromosoms
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PSR	Patellarsehnenreflex
q	langer Arm eines Chromosoms
R	reverse
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPR	Radiusperiostreflex
SAOA	sporadic adult onset ataxia
SARA	Scale for the assessment and rating of ataxia
sec	Sekunde(n)
SCA	Spinocerebelläre Ataxie
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SUD	sudden unexplained death
TBE	TRIS- Borat- EDTA
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSR	Trizepssehnenreflex
UV	Ultraviolett
VUS	variant of uncertain significance
WES	whole exome sequencing

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Überblick über die weltweite Häufigkeitsverteilung spinocerebellärer Ataxien (SCAs) (Bird, 2019).....	7
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Aufbaus des humanen <i>KCND3</i> -Gens und der Spleißvarianten <i>KCND3-002</i> und <i>KCND3-001</i> .....	14
Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des Spleiß-Produktes der Transkripte <i>KCND3-002</i> und <i>KCND3-001</i> .....	14
Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Lokalisation bekannter Mutationen im <i>KCND3</i> -Gen/ $K_v4.3$ -Protein.....	16
Abbildung 1.5: Schematische Darstellung einiger struktureller Elemente von Kalium-Kanälen.....	17
Abbildung 2.1: Visualisierung der fünf Basen umfassenden Erkennungssequenz und der Schnittstellen der Restriktionsendonuklease <i>HinfI</i> des Bakteriums <i>Haemophilus Influenzae</i> .....	34
Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Schnittstellen des <i>HinfI</i> Restriktionsenzym in einem 573 bp umfassenden Abschnitt im Exon 1 ( <i>KCND3-002</i> ).....	35
Abbildung 2.3: Kriterien zur Klassifizierung von Sequenzvarianten gemäß ACMG-Klassifizierungssystem.....	41
Abbildung 3.1: Untersuchungsalgorithmus.....	42
Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Lokalisation der Sequenzvariante c.264C>T (grün) im Bereich des Exons 1 ( <i>KCND3-002</i> ).....	43
Abbildung 3.3: Sequenz- Ausschnitt des Exons 1 (Basen 259 bis 270) des <i>KCND3</i> -Gens (bezogen auf das Transkript <i>KCND3- 002</i> ).....	43
Abbildung 3.4: Schematische Darstellung der Lokalisation der Sequenzvariante c.455A>G (grün) im Bereich des Exons 1 ( <i>KCND3-002</i> ).....	44
Abbildung 3.5: Sequenz-Ausschnitt des Exons 1 (Basen 450 bis 460) des <i>KCND3</i> -Gens (bezogen auf das Transkript <i>KCND3- 002</i> ).....	44
Abbildung 3.6: Schematische Darstellung der Lokalisation der Sequenzvariante c.669G>C (grün) im Bereich des Exons 1 ( <i>KCND3-002</i> ).....	45

Abbildung 3.7: Sequenz- Ausschnitt des Exons 1 (Basen 664 bis 674) des <i>KCND3</i> -Gens (bezogen auf das Transkript <i>KCND3-002</i> ).....	45
Abbildung 3.8: Schematische Darstellung der Lokalisation der Sequenzvariante c.1339+15C>A (rot) im Bereich des Introns 2 ( <i>KCND3-002</i> ).....	46
Abbildung 3.9: Sequenz- Ausschnitt des Introns 2 (Basen 10 bis 20) des <i>KCND3</i> -Gens (bezogen auf das Transkript ( <i>KCND3-002</i> )).....	46
Abbildung 3.10: Schematische Darstellung der Lokalisation der Sequenzvariante c.1339+21A>C (rot) im Bereich des Introns 2 ( <i>KCND3-002</i> ).....	47
Abbildung 3.11: Sequenz-Ausschnitt des Introns 2 (Basen 16 bis 25) des <i>KCND3</i> -Gens (bezogen auf das Transkript ( <i>KCND3-002</i> )).....	47
Abbildung 3.12: Schematische Darstellung der Lokalisation der Sequenzvariante c.163+21A>C (rot) im Bereich des Introns 3 ( <i>KCND3-002</i> ).....	48
Abbildung 3.13: Sequenz-Ausschnitt des Introns 3 des <i>KCND3</i> -Gens (bezogen auf Transkript <i>KCND3-002</i> ).....	48
Abbildung 3.14: Sequenz-Ausschnitt des Introns 3 des <i>KCND3</i> -Gens (bezogen auf das Transkript <i>KCND3-002</i> ).....	48
Abbildung 3.15: Schematische Darstellung der Lokalisation der Sequenzvariante im Bereich des Introns 3 ( <i>KCND3-002</i> ).....	49
Abbildung 3.16: Sequenz- Ausschnitt des Introns 3 (Basen 65 bis 73) des <i>KCND3</i> -Gens (bezogen auf das Transkript <i>KCND3-002</i> ).....	49
Abbildung 3.17: Schematische Darstellung der Lokalisation der Sequenzvariante c.1591+26A>T im Bereich des Introns 6 ( <i>KCND3-001</i> ).....	50
Abbildung 3.18: Sequenz-Ausschnitt des Introns 6 des <i>KCND3</i> -Gens (bezogen auf das Transkript <i>KCND3-001</i> ).....	51
Abbildung 3.19: Agarose-Gelelektrophorese nach Restriktionsverdau.....	52
Abbildung 3.20: Schematische Darstellung der Lokalisation bekannter Mutationen des humanen <i>KCND3</i> -Gens einschließlich der im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifizierten Sequenzvariante c.455A>G (p.D152G).....	55
Abbildung 3.21: Stammbaum der Familie der Patientin mit der identifizierten Sequenzvariante c.455A>G (p.D152G).....	57

---

Abbildung 4.1: Visualisierung der bekannten <i>KCND3</i> -Mutationen hinsichtlich der Funktionseigenschaften des mutierten <i>Kv4.3</i> -Proteins.....	67
Abbildung 4.2: Empfehlung zum Vorgehen in der molekulargenetischen Stufendiagnostik.....	74

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Modifizierte Klassifizierung von ADCAs nach Harding.....	2
Tabelle 1.2: Spinocerebelläre Ataxien: Genetik und krankheitsspezifische Zusatzsymptome.....	9
Tabelle 1.3: Struktur der Transkripte <i>KCND3-001</i> und <i>KCND3-002</i> .....	13
Tabelle 1.4: Bekannte SCA19-verursachende Mutationen im <i>KCND3</i> -Gen.....	15
Tabelle 2.1: Oligonukleotid-Primer: Exon1, 2, 3-4, 5, 6, 6.001.....	22
Tabelle 2.2: Reaktionsansatz: Exon 1, 2, 3-4, 5, 6, 6.001.....	26
Tabelle 2.3: Nukleotid-Mix.....	27
Tabelle 2.4: PCR-Bedingungen: Exon 1, 3-4.....	27
Tabelle 2.5: PCR- Bedingungen: Exon 2.....	27
Tabelle 2.6: PCR-Bedingungen: Exon 5, 6, 6.001.....	28
Tabelle 2.7: Sequenzier-Ansatz: Exon 1, 2, 3-4, 5, 6, 6.001.....	31
Tabelle 2.8: Sequenzier-Primer (10 pmol/ µl).....	31
Tabelle 2.9: Sequenzier-Programm.....	32
Tabelle 2.10: Überblick: Hinf I-Wildtyp.....	35
Tabelle 2.11: Überblick: Hinf I-Variante.....	35
Tabelle 2.12: Reaktionsansatz: Exon 1 (PCR für Restriktionsverdau).....	36
Tabelle 2.13: PCR-Bedingungen: Exon 1 (Restriktionsverdau, 573 bp; <i>KCND3-002</i> )..	36
Tabelle 2.14: Ansatz: Restriktionsverdau HinfI.....	37
Tabelle 2.15: Klassifizierungssystem von Sequenzvarianten gemäß ACMG.....	40
Tabelle 3.1: Identifizierte Sequenzvarianten im Überblick.....	51
Tabelle 3.2: Vergleich von einer die Aminosäure 152 (D) einschließenden Aminosäuresequenz innerhalb des Exons 1 des humanen <i>KCND3</i> -Gens ( <i>KCND3-002</i> ) mit orthologen Aminosäuresequenzen anderer Organismen.....	53

## 9 Kurzschriftweisen von Aminosäuren (Berg et al., 2017c)

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

## 10 Literaturverzeichnis

- Adzhubei, I., Jordan, D. M. & Sunyaev, S. R. (2013). Predicting Functional Effect of Human Missense Mutations Using PolyPhen-2. *Current Protocols in Human Genetics*, 76(1). <https://doi.org/10.1002/0471142905.hg0720s76>
- Akkari, Y., Smith, T., Westfall, J. & Lupo, S. (2019). Implementation of cancer next-generation sequencing testing in a community hospital. *Molecular Case Studies*, 5(3), a003707. <https://doi.org/10.1101/mcs.a003707>
- Arias, M., García-Murias, M. & Sobrido, M. (2017). Spinocerebellar ataxia 36 (SCA36): “Costa da Morte ataxia”. *Neurología (English Edition)*, 32(6), 386–393. <https://doi.org/10.1016/j.nrleng.2014.11.004>
- Armbrecht, M., eppendorf AG (2013). Detektion von Kontaminationen in DNA und Protein- Proben durch photometrische Messungen. *Eppendorf Application Note*, 297, 1-6.
- Arnemann, J. (2019). Polymorphismus. In Gressner A.M., Arndt T. (Hrsg.). *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Springer Reference Medizin. Berlin, Heidelberg: Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4\\_3559](https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4_3559). Letzter Zugriff: 19.07.2021.
- Barsottini, O. G. P., Albuquerque, M. V. C. D., Braga Neto, P. & Pedroso, J. L. (2014). Adult onset sporadic ataxias: a diagnostic challenge. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 72(3), 232–240. <https://doi.org/10.1590/0004-282x20130242>
- Berg, J. M., Stryer, L., Tymoczko, J. L., Held, A., Lange, C., Mahlke, K., Maxam, G., Seidler, L., Zellerhoff, N., Häcker, B. & Jarosch, B. (2017a). *Stryer Biochemie* (8. Auflage, Seite 165-166). Heidelberg, Deutschland: Springer Verlag.
- Berg, J. M., Stryer, L., Tymoczko, J. L., Held, A., Lange, C., Mahlke, K., Maxam, G., Seidler, L., Zellerhoff, N., Häcker, B. & Jarosch, B. (2017b). *Stryer Biochemie* (8. Auflage, Seite 1050). Heidelberg, Deutschland: Springer Verlag.
- Berg, J. M., Stryer, L., Tymoczko, J. L., Held, A., Lange, C., Mahlke, K., Maxam, G., Seidler, L., Zellerhoff, N., Häcker, B. & Jarosch, B. (2017c). *Stryer Biochemie* (8. Auflage, Seite 41). Heidelberg, Deutschland: Springer Verlag.

- Bettencourt, C., Ryten, M., Forabosco, P., Schorge, S., Hersheson, J., Hardy, J. & Houlden, H. (2014). Insights From Cerebellar Transcriptomic Analysis Into the Pathogenesis of Ataxia. *JAMA Neurology*, 71(7), 831.  
<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2014.756>
- Bidichandani, S. & Delatycki, M. B. (1998, letzte Aktualisierung 01.06.2017). Friedreich Ataxia. In Pagon, R. A., Adam, M. P., Ardinger, H.H., et al., editors. *GeneReviews*® (Internet). Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2021. Zugang: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1281/>. Letzter Zugriff: 24.05.2021.
- Bird, T.D. (1998, letztes Update 25.07.2019). Hereditary Ataxia Overview. In Pagon, R. A., Adam, M. P., Ardinger, H.H., et al., editors. *GeneReviews*® (Internet). Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2021. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1138/>. Letzter Zugriff: 24.05.2021.
- Birnbaum, S. G., Varga, A. W., Yuan, L. L., Anderson, A. E., Sweatt, J. D. & Schrader, L. A. (2004). Structure and Function of Kv4-Family Transient Potassium Channels. *Physiological Reviews*, 84(3), 803–833.  
<https://doi.org/10.1152/physrev.00039.2003>
- Brusco, A., Di Gregorio, E. & Borroni, B. (2019). Spinocerebellar Ataxia Type 38. In Adam, M. P., Ardinger, H. H., Pagon, R. A., et al., editors. *GeneReviews*® (Internet). Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK543515/>. Letzter Zugriff: 20.06.2021
- Brussino, A., Brusco, A., Durr, A., et al. (2011, letzte Aktualisierung 22.03.2018). Spinocerebellar Ataxia Type 28. In Adam, M. P., Ardinger, H. H., Pagon, R. A., et al., editors. *GeneReviews*® (Internet). Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54582/>. Letzter Zugriff: 20.06.2021
- Cagnoli, C., Stevanin, G., Brussino, A., Barberis, M., Mancini, C., Margolis, R. L., Holmes, S. E., Nobili, M., Forlani, S., Padovan, S., Pappi, P., Zaros, C., Leber, I., Ribai, P., Pugliese, L., Assalto, C., Brice, A., Migone, N., Dürr, A. & Brusco, A. (2010). Missense mutations in the AFG3L2 proteolytic domain account for ~1.5% of European autosomal dominant cerebellar ataxias. *Human Mutation*, 31(10), 1117–1124. <https://doi.org/10.1002/humu.21342>

- Campuzano, V., Montermini, L., Moltò, M. D., Pianese, L., Cossée, M., Cavalcanti, F., Monros, E., Rodius, F., Duclos, F., Monticelli, A., Zara, F., Cañizares, J., Koutnikova, H., Bidichandani, S. I., Gellera, C., Brice, A., Trouillas, P., De Michele, G., Filla, A., De Frutos, R., Palau, F., Patel, P. I., Di Donato, S., Mandel, J. L., Coccozza, S., Koenig, M. & Pandolfo, M. (1996). Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science*, 271(5254),1423-7.  
[https://doi: 10.1126/science.271.5254.1423](https://doi.org/10.1126/science.271.5254.1423)
- Casey, H. L. & Gomez, C. M. (1998, letzte Aktualisierung 21.11.2019). Spinocerebellar Ataxia Type 6. In Adam, M. P., Ardinger, H. H., Pagon, R. A., et al., editors. *GeneReviews®* (Internet). Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1140/>. Letzter Zugriff: 20.06.2021.
- Chen, D. H., Bird, T.D. & Raskind, W. H. (2005, letzte Aktualisierung 20.02.2020). Spinocerebellar Ataxia Type 14. In Adam, M. P., Ardinger, H. H., Pagon, R. A., et al., editors. *GeneReviews®* (Internet). Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2021.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1399/>. Letzter Zugriff: 20.06.2021.
- Chen, Z., Puzriakova, A. & Houlden, H. (2008, letzte Aktualisierung 31.10.2019). Spinocerebellar Ataxia Type 11. In Adam, M. P., Ardinger, H. H., Pagon, R.A., et al., editors. *GeneReviews®* (Internet). Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993- 2021.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1757/>. Letzter Zugriff: 27.06.2021
- Chinnery, P. F. (2000, letzte Aktualisierung: 14.08.2014). Mitochondrial Disorders Overview. In Adam, M. P., Ardinger, H. H., Pagon, R. A., et al., editors. *GeneReviews®* (Internet). Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1224/>. Letzter Zugriff: 29.05.2021
- Choi, K. D., Kim, J. S., Kim, H. J., Jung, I., Jeong, S. H., Lee, S. H., Kim, D. U., Kim, S. H., Choi, S. Y., Shin, J. H., Kim, D. S., Park, K. P., Kim, H. S. & Choi, J. H. (2017). Genetic Variants Associated with Episodic Ataxia in Korea. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14254-7>

- Choi, Y., Sims, G. E., Murphy, S., Miller, J. R. & Chan, A. P. (2012). Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels. *PLoS ONE*, 7(10), e46688. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046688>
- Chung, M., Lu, Y., Cheng, N. & Soong, B. (2003). A novel autosomal dominant spinocerebellar ataxia (SCA22) linked to chromosome 1p21-q23. *Brain*, 126(6), 1293–1299. <https://doi.org/10.1093/brain/awg130>
- Cossée M, Dürr A, Schmitt M, Dahl N, Trouillas P, Allinson P, Kostrzewa M, Nivelon-Chevallier A, Gustavson KH, Kohlschütter A, Müller U, Mandel JL, Brice A, Koenig M, Cavalcanti F, Tammara A, De Michele G, Filla A, Coccozza S, Labuda M, Montermini L, Poirier J & Pandolfo M. (1999). Friedreich's ataxia: point mutations and clinical presentation of compound heterozygotes. *Annals of Neurology*, 45(2), 200-6. [https://doi: 10.1002/1531-8249\(199902\)45:2<200::aid-ana10>3.0.co;2-u](https://doi: 10.1002/1531-8249(199902)45:2<200::aid-ana10>3.0.co;2-u)
- Coutelier, M., Hammer, M. B., Stevanin, G., Monin, M. L., Davoine, C. S., Mochel, F., Labauge, P., Ewencyk, C., Ding, J., Gibbs, J. R., Hannequin, D., Melki, J., Toutain, A., Laugel, V., Forlani, S., Charles, P., Broussolle, E., Thobois, S., Afenjar, A., Anheim, M., Calvas, P., Castelnovo, G., de Broucker, T., Vidailhet, M., Moulignier, A., Ghnassia, R. T., Tallaksen, C., Mignot, C., Goizet, C., Le Ber, I., Ollagnon-Roman, E., Pouget, J., Brice, A., Singleton, A. & Durr, A. (2018). Efficacy of Exome-Targeted Capture Sequencing to Detect Mutations in Known Cerebellar Ataxia Genes. *JAMA Neurology*, 75(5), 591. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2017.5121>
- Coutelier, M., Coarelli, G., Monin, M. L., Konop, J., Davoine, C. S., Tesson, C., Valter, R., Anheim, M., Behin, A., Castelnovo, G., Charles, P., David, A., Ewencyk, C., Fradin, M., Goizet, C., Hannequin, D., Labauge, P., Riant, F., Sarda, P., Sznajder, Y., Tison, F., Ullmann, U., Van Maldergem, L., Mochel, F., Brice, A., Stevanin, G. & Durr, A. (2017). A panel study on patients with dominant cerebellar ataxia highlights the frequency of channelopathies. *Brain*, 140(6), 1579–1594. <https://doi.org/10.1093/brain/awx081>
- Coutelier, M., Blesneac, I., Monteil, A., Monin, M. L., Ando, K., Mundwiller, E., Brusco, A., Le Ber, I., Anheim, M., Castrioto, A., Duyckaerts, C., Brice, A., Durr, A., Lory, P. & Stevanin, G. (2015). A Recurrent Mutation in CACNA1G

- Alters Cav3.1 T-Type Calcium-Channel Conduction and Causes Autosomal-Dominant Cerebellar Ataxia. *The American Journal of Human Genetics*, 97(5), 726–737. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.09.007>
- Covarrubias, M., Bhattacharji, A., De Santiago-Castillo, J. A., Dougherty, K., Kaulin, Y. A., Na-Phuket, T. R. & Wang, G. (2008). The Neuronal Kv4 Channel Complex. *Neurochemical Research*, 33(8), 1558–1567. <https://doi.org/10.1007/s11064-008-9650-8>
- Dautant, A., Meier, T., Hahn, A., Tribouillard-Tanvier, D., di Rago, J. P. & Kucharczyk, R. (2018). ATP Synthase Diseases of Mitochondrial Genetic Origin. *Frontiers in Physiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00329>
- Dechert, U. (2012). Gelelektrophoresen. In Jansohn, M. & Rothhämel, S. (Hrsg.) *Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor* (5. Auflage, Seite 37-93). Heidelberg, Deutschland: Spektrum Akademischer Verlag.
- De Michele, G., Galatolo, D., Barghigiani, M., Dello Iacovo, D., Trovato, R., Tessa, A., Salvatore, E., Filla, A., De Michele & G., Santorelli, F. M. (2020). Spinocerebellar ataxia type 48: last but not least. *Neurological Sciences*, 41(9): 2423-2432. <https://doi: 10.1007/s10072-020-04408-3>.
- Depondt, C., Donatello, S., Rai, M., Wang, F. C., Manto, M., Simonis, N. & Pandolfo, M. (2016). MME mutation in dominant spinocerebellar ataxia with neuropathy (SCA43). *Neurology Genetics*, 2(5), e94. <https://doi.org/10.1212/nxg.0000000000000094>
- Diener, H. C., Weimar, C., Berlit, P., Deuschl, G., Elger, C. et al. (2012). Degenerative Erkrankungen. Ataxien des Erwachsenenalters. In *Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Herausgegeben von der Kommission „Leitlinien“ der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN)* (5. Auflage, Seite 264). Stuttgart, Deutschland: Georg Thieme Verlag. <https://doi: 10.1055/b-0034-37802>
- Dilks, D., Ling, H. P., Cockett, M., Sokol, P. & Numann, R. (1999). Cloning and Expression of the Human Kv4.3 Potassium Channel. *Journal of Neurophysiology*, 81(4), 1974–1977. <https://doi.org/10.1152/jn.1999.81.4.1974>

- Duarri, A., Lin, M. C. A., Fokkens, M. R., Meijer, M., Smeets, C. J. L. M., Nibbeling, E. A. R., Boddeke, E., Sinke, R. J., Kampinga, H. H., Papazian, D. M. & Verbeek, D. S. (2015). Spinocerebellar ataxia type 19/22 mutations alter heterocomplex Kv4.3 channel function and gating in a dominant manner. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(17), 3387–3399. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1894-2>
- Duarri, A., Nibbeling, E., Fokkens, M. R., Meijer, M., Boddeke, E., Lagrange, E., Stevanin, G., Brice, A., Durr, A. & Verbeek, D. S. (2013). The L450P mutation in KCND3 brings spinocerebellar ataxia and Brugada syndrome closer together. *neurogenetics*, 14(3–4), 257–258. <https://doi.org/10.1007/s10048-013-0370-0>
- Duarri, A., Jezierska, J., Fokkens, M., Meijer, M., Schelhaas, H. J., den Dunnen, W. F. A., van Dijk, F., Verschuuren-Bemelmans, C., Hageman, G., van de Vlies, P., Küsters, B., van de Warrenburg, B. P., Kremer, B., Wijmenga, C., Sinke, R. J., Swertz, M. A., Kampinga, H. H., Boddeke, E. & Verbeek, D. S. (2012). Mutations in potassium channel KCND3 cause spinocerebellar ataxia type 19. *Annals of Neurology*, 72(6), 870–880. <https://doi.org/10.1002/ana.23700>
- Dueñas, A. M., Goold, R. & Giunti, P. (2006). Molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxias. *Brain*, 129(6), 1357–1370. <https://doi.org/10.1093/brain/awl081>
- Durr, A. (2010). Autosomal dominant cerebellar ataxias: polyglutamine expansions and beyond. *The Lancet Neurology*, 9(9), 885–894. [https://doi.org/10.1016/s1474-4422\(10\)70183-6](https://doi.org/10.1016/s1474-4422(10)70183-6)
- Finsterer, J. (2009). Mitochondrial Ataxias. *Canadian Journal of Neurological Sciences / Journal Canadien des Sciences Neurologiques*, 36(5), 543–553. <https://doi.org/10.1017/s0317167100008027>
- Fogel, B. L., Hanson, S. M. & Becker, E. B. E. (2014). Do mutations in the murine ataxia gene TRPC3 cause cerebellar ataxia in humans? *Movement Disorders*, 30(2), 284–286. <https://doi.org/10.1002/mds.26096>
- Gass, A. & Hennerici, M.G. (1999). Alkohol und Neurologie. In: Singer, M. V. & Teyssen, S. (Hrsg.). *Alkohol und Alkoholfolgekrankheiten*. Springer Publishing, 461-471.

- Gennarino, V. A., Palmer, E. E., McDonell, L. M., Wang, L., Adamski, C. J., Koire, A., See, L., Chen, C. A., Schaaf, C. P., Rosenfeld, J. A., Panzer, J. A., Moog, U., Hao, S., Bye, A., Kirk, E. P., Stankiewicz, P., Breman, A. M., McBride, A., Kandula, T., Dubbs, H.A., Macintosh, R., Cardamone, M., Zhu, Y., Ying, K., Dias, K. R., Cho, M. T., Henderson, L.B., Baskin, B., Morris, P., Tao, J., Cowley, M. J., Dinger, M.E., Roscioli, T., Caluseriu, O., Suchowersky, O., Sachdev, R.K., Lichtarge, O., Tang, J., Boycott, K. M., Holder, J. L. Jr & Zoghbi, H. Y. (2018). A Mild PUM1 Mutation Is Associated with Adult-Onset Ataxia, whereas Haploinsufficiency Causes Developmental Delay and Seizures. *Cell*, 172(5), 924–936.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.006>
- Giudicessi, J. R., Ye, D., Kritzberger, C. J., Nesterenko, V. V., Tester, D. J., Antzelevitch, C. & Ackerman, M. J. (2012). Novel mutations in the KCND3-encoded Kv4.3 K<sup>+</sup> channel associated with autopsy-negative sudden unexplained death. *Human Mutation*, 33(6), 989–997. <https://doi.org/10.1002/humu.22058>
- Giudicessi, J. R., Ye, D., Tester, D. J., Crotti, L., Mugione, A., Nesterenko, V. V., Albertson, R. M., Antzelevitch, C., Schwartz, P. J. & Ackerman, M. J. (2011). Transient outward current (I<sub>to</sub>) gain-of-function mutations in the KCND3-encoded Kv4.3 potassium channel and Brugada syndrome. *Heart Rhythm*, 8(7), 1024–1032. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2011.02.021>
- Gomes, C. M. & Santos, R. (2013). Neurodegeneration in Friedreich’s Ataxia: From Defective Frataxin to Oxidative Stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2013/487534>
- Goodwin, S., McPherson, J. D. & McCombie, W. R. (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17(6), 333–351. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49>

- Hagerman, R. J., Hall, D. A., Coffey, S., Leehey, M., Bourgeois, J., Gould, J., Zhang, L., Seritan, A., Berry-Kravis, E., Olichney, J., Miller, J. W., Fong, A. L., Carpenter, R., Bodine, C., Gane, L. W., Rainin, E., Hagerman, H., & Hagerman, P. J. (2008). Treatment of fragile X-associated tremor ataxia syndrome (FXTAS) and related neurological problems. *Clinical interventions in aging*, 3(2), 251–262. <https://doi.org/10.2147/cia.s1794>
- Hagerman, R. J., Leehey, M., Heinrichs, W., Tassone, F., Wilson, R., Hills, J., Grigsby, J., Gage, B. & Hagerman, P. J. (2001). Intention tremor, parkinsonism, and generalized brain atrophy in male carriers of fragile X. *Neurology*, 57(1), 127–130. <https://doi.org/10.1212/wnl.57.1.127>
- Harding, A. E. (1982). The Clinical Features and Classification of the late onset autosomal dominant cerebellar ataxias. *Brain*, 105(1), 1–28. <https://doi.org/10.1093/brain/105.1.1>
- Harding, A. E. (1981). Friedreich's ataxia: a clinical and genetic study of 90 families with an analysis of early diagnostic criteria and intrafamilial clustering of clinical features. *Brain*, 104(3), 589–620. <https://doi.org/10.1093/brain/104.3.589>
- Harper, C. (2009). The Neuropathology of Alcohol-Related Brain Damage. *Alcohol and Alcoholism*, 44(2), 136–140. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agn102>
- Hauk, A. (2013). Quantifizierung von DNA durch Absorptionsmessung. *Biologie in unserer Zeit*, 43(5), 278. <https://doi.org/10.1002/biuz.201390093>
- Hentsch, S. (letzte Aktualisierung 2017). *Ataxie*. Psychrembel Online. <https://www.psychrembel.de/ataxie/K033G/doc/>. Letzter Zugriff: 10.07.2021.
- Holmes, S. E., O'Hearn, E. & Margolis, R.L. (2003). Why is SCA12 different from other SCAs? *Cytogenetic and Genome Research*, 100(1-4):189-97. <https://doi.org/10.1159/000072854>.
- Hsiao, C., Fu, S., Liu, Y., Lu, Y., Zhong, C., Tang, C., Soong, B. & Jeng, C. (2019). Novel SCA19/22-associated KCND3 mutations disrupt human K V 4.3 protein biosynthesis and channel gating. *Human Mutation*, 40(11), 2088–2107. <https://doi.org/10.1002/humu.23865>

- Hsu, Y. H., Huang, H. Y. & Tsaur, M. L. (2003). Contrasting expression of Kv4.3, an A-type K<sup>+</sup> channel, in migrating Purkinje cells and other post-migratory cerebellar neurons. *European Journal of Neuroscience*, 18(3), 601–612. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2003.02786.x>
- Huin, V., Strubi-Vuillaume, I., Dujardin, K., Brion, M., Delliaux, M., Dellacherie, D., Cuvellier, J. C., Cuisset, J. M., Riquet, A., Moreau, C., Defebvre, L., Sablonnière, B. & Devos, D. (2017). Expanding the phenotype of SCA19/22: Parkinsonism, cognitive impairment and epilepsy. *Parkinsonism & Related Disorders*, 45, 85–89. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2017.09.014>
- Huo, R., Sheng, Y., Guo, W. T., & Dong, D. L. (2014). The potential role of Kv4.3 K<sup>+</sup> channel in heart hypertrophy. *Channels (Austin, Tex.)*, 8(3), 203–209. <https://doi.org/10.4161/chan.28972>
- Isbrandt, D., Leicher, T., Waldschütz, R., Zhu, X., Luhmann, U., Michel, U., Sauter, K. & Pongs, O. (2000). Gene Structures and Expression Profiles of Three Human KCND (Kv4) Potassium Channels Mediating A-Type Currents ITO and ISA. *Genomics*, 64(2), 144–154. <https://doi.org/10.1006/geno.2000.6117>
- Jacobi, H., Minnerop, M. & Klockgether, T. (2013). Genetik der spinocerebellären Ataxien. *Der Nervenarzt*, 84(2), 137–142. <https://doi.org/10.1007/s00115-012-3637-z>
- Jellinger, K. A. (2018). Multiple System Atrophy: An Oligodendroglioneural Synucleinopathy 1. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 62(3), 1141–1179. <https://doi.org/10.3233/JAD-170397>
- Johnson, J. O., Stevanin, G., van de Leemput, J., Hernandez, D. G., Arepalli, S., Forlani, S., Zonozi, R., Gibbs, J. R., Brice, A., Durr, A. & Singleton, A. B. (2014). A 7.5-Mb duplication at chromosome 11q21-11q22.3 is associated with a novel spastic ataxia syndrome. *Movement Disorders*, 30(2), 262–266. <https://doi.org/10.1002/mds.26059>
- Klockgether, T. (2011). Update on degenerative ataxias. *Current Opinion in Neurology*, 24(4), 339–345. <https://doi.org/10.1097/wco.0b013e32834875ba>
- Klockgether, T. (2005). Ataxiekrankheiten. *Der Nervenarzt*, 76(10), 1275–1285. <https://doi.org/10.1007/s00115-005-1992-8>

- Kong, W., Po, S., Yamagishi, T., Ashen, M. D., Stetten, G. & Tomaselli, G. F. (1998). Isolation and characterization of the human gene encoding I to: further diversity by alternative mRNA splicing. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 275(6), H1963–H1970.  
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.1998.275.6.h1963>
- Königshoff, M. & Brandenburger, T. (2012). *Kurzlehrbuch Biochemie* (3. Auflage, Seite 376-381). Stuttgart, Deutschland: Georg Thieme Verlag.
- Krause, U. (letzte Aktualisierung 2018). *Episodische Ataxie*. Psychrembel Online.  
<https://www.psychrembel.de/Episodische%20Ataxie/K00T2/doc/>. Letzter Zugriff: 24.05.2021.
- Kurihara, M., Ishiura, H., Sasaki, T., Otsuka, J., Hayashi, T., Terao, Y., Matsukawa, T., Mitsui, J., Kaneko, J., Nishiyama, K., Doi, K., Yoshimura, J., Morishita, S., Shimizu, J. & Tsuji, S. (2017). Novel De Novo KCND3 Mutation in a Japanese Patient with Intellectual Disability, Cerebellar Ataxia, Myoclonus, and Dystonia. *The Cerebellum*, 17(2), 237–242. <https://doi.org/10.1007/s12311-017-0883-4>
- Lee, Y. C., Durr, A., Majczenko, K., Huang, Y. H., Liu, Y. C., Lien, C. C., Tsai, P. C., Ichikawa, Y., Goto, J., Monin, M. L., Li, J. Z., Chung, M. Y., Mundwiller, E., Shakkottai, V., Liu, T. T., Tesson, C., Lu, Y. C., Brice, A., Tsuji, S., Burmeister, M., Stevanin, G. & Soong, B. W. (2012). Mutations in KCND3 cause spinocerebellar ataxia type 22. *Annals of Neurology*, 72(6), 859–869.  
<https://doi.org/10.1002/ana.23701>
- Leroi, I., O’Hearn, E., Marsh, L., Lyketsos, C. G., Rosenblatt, A., Ross, C. A., Brandt, J. & Margolis, R. L. (2002). Psychopathology in Patients With Degenerative Cerebellar Diseases: A Comparison to Huntington’s Disease. *American Journal of Psychiatry*, 159(8), 1306–1314. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.159.8.1306>
- Lin, D. J., Hermann, K. L. & Schmahmann, J. D. (2014). Multiple system atrophy of the cerebellar type: Clinical state of the art. *Movement Disorders*, 29(3), 294–304.  
<https://doi.org/10.1002/mds.25847>

- Low, S. K., Takahashi, A., Ebana, Y., Ozaki, K., Christophersen, I. E., Ellinor, P. T., Ogishima, S., Yamamoto, M., Satoh, M., Sasaki, M., Yamaji, T., Iwasaki, M., Tsugane, S., Tanaka, K., Naito, M., Wakai, K., Tanaka, H., Furukawa, T., Kubo, M., Ito, K., Kamatani & Y. Tanaka, T. (2017). Identification of six new genetic loci associated with atrial fibrillation in the Japanese population. *Nature Genetics*, 49(6), 953–958. <https://doi.org/10.1038/ng.3842>
- Lücking C.H. et al. (2009). Motorische Symptome und Syndrome. In Hufschmidt, A. & Lücking, C. H. (Hrsg.). *Neurologie compact: Für Klinik und Praxis* (5., aktualisierte und erweiterte Auflage, Seite 23-25). Stuttgart, Deutschland: Georg Thieme Verlag.
- Masuhr K., Masuhr, F. & Neumann, M. Friedreich-Krankheit (FRDA) (2013). In: Masuhr, K., Neumann, M. (Hrsg.), *Duale Reihe Neurologie* (7. Auflage). Stuttgart, Deutschland: Thieme. doi: 10.1055/b-003-106487 (letzter Zugriff: 24.05.2021)
- Matilla-Dueñas, A., Volpini, V. (2019). Spinocerebellar Ataxia Type 37. In Adam, M. P., Ardinger, H. H., Pagon, R. A., et al., editors. *GeneReviews*® (Internet). Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993- 2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541729/>. Letzter Zugriff: 27.06.2021.
- Nakajima, T., Kawabata-Iwakawa, R., Kaneko, Y., Hamano, S. I., Sano, R., Tamura, S., Hasegawa, H., Kobari, T., Kominato, Y., Nishiyama, M. & Kurabayashi, M. (2020). Novel Cardiocerebral Channelopathy Associated with a *KCND3* V392I Mutation. *International Heart Journal*, 61(5), 1049–1055. <https://doi.org/10.1536/ihj.20-203>
- Nibbeling, E. A. R., Duarri, A., Verschuuren-Bemelmans, C. C., Fokkens, M. R., Karjalainen, J. M., Smeets, C. J. L. M., de Boer-Bergsma, J. J., van der Vries, G., Dooijes, D., Bampi, G. B., van Diemen, C., Brunt, E., Ippel, E., Kremer, B., Vlak, M., Adir, N., Wijmenga, C., van de Warrenburg, B. P. C., Franke, L., Sinke, R. J. & Verbeek, D. S. (2017). Exome sequencing and network analysis identifies shared mechanisms underlying spinocerebellar ataxia. *Brain*, 140(11), 2860–2878. <https://doi.org/10.1093/brain/awx251>

- Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: 300623: 28.01.2021.  
<https://www.omim.org/entry/300623?search=FXTAS&highlight=fxtas>. Letzter Zugriff: 29.05.2021
- Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: 125370: 31.03.2020.  
<https://www.omim.org/entry/125370?search=DRPLA&highlight=drpla>. Letzter Zugriff: 29.05.2021
- Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: 605411: 12.04.2017.  
<https://omim.org/entry/605411#8>. Letzter Zugriff: 29.06.2021
- Opal, P., Ashizawa, T. (1998, letzte Aktualisierung: 22.06.2017). Spinocerebellar Ataxia Type 1. In: Adam, M.P., Ardinger, H. H., Pagon, R. A., et al., editors. GeneReviews® (Internet). Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1184/>. Letzter Zugriff: 13.06.2021.
- Oyinbo, C. A., Igbigbi, P. S. & Avwioro, G. O. (2016). Landolphia owariensis Attenuates Alcohol-induced Cerebellar Neurodegeneration: Significance of Neurofilament Protein Alteration in the Purkinje Cells. *Folia Medica*, 58(4), 241–249. <https://doi.org/10.1515/folmed-2016-0034>
- Palau, F. & Espinós, C. (2006). Autosomal recessive cerebellar ataxias. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 1(1). <https://doi.org/10.1186/1750-1172-1-47>
- Paucar, M., Bergendal, S., Gustavsson, P., Nordenskjöld, M., Laffita-Mesa, J., Savitcheva, I. & Svenningsson, P. (2018). Novel Features and Abnormal Pattern of Cerebral Glucose Metabolism in Spinocerebellar Ataxia 19. *The Cerebellum*, 17(4), 465–476. <https://doi.org/10.1007/s12311-018-0927-4>
- Paulson H, Shakkottai V. Spinocerebellar Ataxia Type 3 (1998, letzte Aktualisierung 04.06.2020). Spinocerebellar Ataxia Type 3. In Adam M. P., Ardinger, H. H., Pagon, R. A., et al., editors. *GeneReviews®* (Internet). Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2021.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1196/>. Letzter Zugriff: 20.06.2021.

- Paulson, H. L. (2009). The Spinocerebellar Ataxias. *Journal of Neuro-Ophthalmology*, 29(3), 227–237. <https://doi.org/10.1097/wno0b013e3181b416de>
- Pfeffer, G., Blakely, E. L., Alston, C. L., Hassani, A., Boggild, M., Horvath, R., Samuels, D. C., Taylor, R. W. & Chinnery, P. F. (2012). Adult-onset spinocerebellar ataxia syndromes due to MTATP6 mutations. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 83(9), 883–886. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2012-302568>
- Pollini, L., Galosi, S., Tolve, M., Caputi, C., Carducci, C., Angeloni, A. & Leuzzi, V. (2020). KCND3-Related Neurological Disorders: From Old to Emerging Clinical Phenotypes. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16), 5802. <https://doi.org/10.3390/ijms21165802>
- Pulst, S. M. (1998, letzte Aktualisierung 14.02.2019). Spinocerebellar Ataxia Type 2. In Pagon, R. A., Adam, M. P., Ardinger, H. H., et al., editors. *GeneReviews®* (Internet). Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2021. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1275/>. Letzter Zugriff: 20.06.2021.
- Reinard, T. (2018). *Molekularbiologische Methoden 2.0* (2. Auflage, Seite 277-293). Stuttgart, Deutschland: UTB.
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K. & Rehm, H. L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*, 17(5), 405–423. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
- Río Bártulos, C., Tappe, H. & Rothhämel, S. (2012a). Allgemeine Methoden. Absorptionsmessungen. In Jansohn, M. & Rothhämel, S. (Hrsg.). *Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor* (5. Auflage, Seite 1-4). Heidelberg, Deutschland: Spektrum Akademischer Verlag.

- Río Bártulos, C., Tappe, H. & Rothhämel, S. (2012b). Isolierung von DNA. Analyse von Ausbeute, Reinheit und Länge der isolierten Nucleinsäure. In Jansohn, M. & Rothhämel, S. (Hrsg.). *Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor* (5. Auflage, Seite 132-134). Heidelberg, Deutschland: Spektrum Akademischer Verlag.
- Río Bártulos, C., Tappe, H. (2012c). Anhang 1. Sequenzierung von DNA. In Jansohn, M. & Rothhämel, S. (Hrsg.). *Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor* (5. Auflage, Seite 589-615). Heidelberg, Deutschland: Spektrum Akademischer Verlag.
- Ruano, L., Melo, C., Silva, M. C. & Coutinho, P. (2014). The Global Epidemiology of Hereditary Ataxia and Spastic Paraplegia: A Systematic Review of Prevalence Studies. *Neuroepidemiology*, 42(3), 174–183. <https://doi.org/10.1159/000358801>
- Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlich, H. & Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732), 1350–1354. <https://doi.org/10.1126/science.2999980>
- Saito, Y., Matsuoka, Y., Takahashi A. & Ohno, Y. (1994). Survival of Patients with Multiple System Atrophy. *Internal Medicine*, 33(6), 321–325. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.33.321>
- Sandford, E. & Burmeister, M. (2014). Genes and Genetic Testing in Hereditary Ataxias. *Genes*, 5(3), 586–603. <https://doi.org/10.3390/genes5030586>
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Schelhaas, H. J. (2004). SCA19 and SCA22: evidence for one locus with a worldwide distribution. *Brain*, 127(1), 6E – 6. <https://doi.org/10.1093/brain/awh036>
- Schelhaas, H., Ippel, P., Hageman, G., Sinke, R., van der Laan, E. & Beemer, F. (2001). Clinical and genetic analysis of a four-generation family with a distinct autosomal dominant cerebellar ataxia. *Journal of Neurology*, 248(2), 113–120. <https://doi.org/10.1007/s004150170245>

- Schmidt, H. & Rothhämel, S. (2012). Polymerase-Kettenreaktion. In Jansohn, M. & Rothhämel, S. (Hrsg.) *Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor* (5. Auflage, Seite 135-171). Heidelberg, Deutschland: Spektrum Akademischer Verlag.
- Schwarz, J. M. (2013). *MutationTaster – ein web-basiertes Computerprogramm zur Bewertung des Krankheitspotentials von DNA-Mutationen* (Dissertation, Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie). Freie Universität Berlin.  
<https://refubium.fu-berlin.de/handle/fub188/4800>. Letzter Zugriff: 26.05.2021
- Schwarz, J. M., Rödelberger, C., Schuelke, M. & Seelow, D. (2010). MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nature Methods*, 7(8), 575–576. <https://doi.org/10.1038/nmeth0810-575>
- Seidel, K., Küsters, B., den Dunnen, W. F. A., Bouzrou, M., Hageman, G., Korf, H. W., Schelhaas, H. J., Verbeek, D. & Rüb, U. (2014). First patho-anatomical investigation of the brain of a SCA19 patient. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 40(5), 640–644. <https://doi.org/10.1111/nan.12128>
- Seidel, K., Siswanto, S., Brunt, E. R. P., den Dunnen, W., Korf, H. W. & Rüb, U. (2012). Brain pathology of spinocerebellar ataxias. *Acta Neuropathologica*, 124(1), 1–21. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1000-x>
- Seidel, K., Meister, M., Dugbartey, G. J., Zijlstra, M. P., Vinet, J., Brunt, E. R. P., van Leeuwen, F. W., Rüb, U., Kampinga, H. H. & den Dunnen, W. F. A. (2011). Cellular protein quality control and the evolution of aggregates in spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3). *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 38(6), 548–558. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2011.01220.x>
- Seidel, K., den Dunnen, W. F. A., Schultz, C., Paulson, H., Frank, S., de Vos, R. A., Brunt, E. R., Deller, T., Kampinga, H. H. & Rüb, U. (2010). Axonal inclusions in spinocerebellar ataxia type 3. *Acta Neuropathologica*, 120(4), 449–460.  
<https://doi.org/10.1007/s00401-010-0717-7>
- Sim, N. L., Kumar, P., Hu, J., Henikoff, S., Schneider, G. & Ng, P. C. (2012). SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Research*, 40(W1), W452–W457. <https://doi.org/10.1093/nar/gks539>

- Singer, M. V. & Teyssen, S. (2001). Alkoholassoziierte Organschäden. Befunde in der Inneren Medizin, Neurologie und Geburtshilfe/Neonatologie. *Deutsches Ärzteblatt*, 98(33), A2109-A2120.
- Smets, K., Duarri, A., Deconinck, T., Ceulemans, B., van de Warrenburg, B. P., Züchner, S., Gonzalez, M. A., Schüle, R., Synofzik, M., Van der Aa, N., De Jonghe, P., Verbeek, D. S. & Baets, J. (2015). First de novo KCND3 mutation causes severe Kv4.3 channel dysfunction leading to early onset cerebellar ataxia, intellectual disability, oral apraxia and epilepsy. *BMC Medical Genetics*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12881-015-0200-3>
- Soong, B. W. & Paulson, H. L. (2007). Spinocerebellar ataxias: an update. *Current Opinion in Neurology*, 20(4), 438–446. <https://doi.org/10.1097/wco.0b013e3281fbd3dd>
- Stendel, C., Neuhofer, C., Floride, E., Yuqing, S., Ganetzky, R. D., Park, J., Freisinger, P., Kornblum, C., Kleinle, S., Schöls, L., Distelmaier, F., Stettner, G. M., Büchner, B., Falk, M. J., Mayr, J. A., Synofzik, M., Abicht, A., Haack, T. B., Prokisch, H., Wortmann, S. B, Murayama, K., Fang, F. & Klopstock, T. (2020). Delineating MT-ATP6-associated disease. *Neurology Genetics*, 6(1), e393. <https://doi.org/10.1212/nxg.0000000000000393>
- Storey, E., Gardner, R. J. M. (2007, letztes Update 18.04.2019). Spinocerebellar Ataxia Type 20. In Adam, M. P., Ardinger, H. H., Pagon, R. A., et al., editors. *GeneReviews®* (Internet). Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1471/>. Letzter Zugriff: 20.06.2021.
- Sullivan, R., Yau, W. Y., O'Connor, E., & Houlden, H. (2019). Spinocerebellar ataxia: an update. *Journal of neurology*, 266(2), 533–544. <https://doi.org/10.1007/s00415-018-9076-4>
- Tassone, F., Iong, K., Tong, T. H., Lo, J., Gane, L. W., Berry-Kravis, E., Nguyen, D., Mu, L. Y., Laffin, J., Bailey, D. B. & Hagerman, R. J. (2012). FMR1 CGG allele size and prevalence ascertained through newborn screening in the United States. *Genome Medicine*, 4(12), 100. <https://doi.org/10.1186/gm401>

- Toyoshima, Y., Onodera, O., Yamada, M., et al. (2005, letzte Aktualisierung: 12.09.2019). Spinocerebellar Ataxia Type 17. In Adam, M. P., Ardinger, H. H., Pagon, R.A., et al., editors. *GeneReviews*® (Internet). Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2021.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1438/>. Letzter Zugriff: 20.06.2021.
- Tsoi, H., Yu, A. C. S., Chen, Z. S., Ng, N. K. N., Chan, A. Y. Y., Yuen, L. Y. P., Abrigo, J. M., Tsang, S. Y., Tsui, S. K. W., Tong, T. M. F., Lo, I. F. M., Lam, S. T. S., Mok, V. C. T., Wong, L. K. S., Ngo, J. C. K., Lau, K. F., Chan, T. F. & Chan, H. Y. E. (2014). A novel missense mutation inCCDC88Cactivates the JNK pathway and causes a dominant form of spinocerebellar ataxia. *Journal of Medical Genetics*, 51(9), 590–595. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2014-102333>
- Van de Warrenburg, B. P., Sinke, R. J., Verschuuren-Bemelmans, C. C., Scheffer, H., Brunt, E. R., Ippel, P. F., Maat-Kievit, J. A., Dooijes, D., Notermans, N. C., Lindhout, D., Knoers, N. V., Kremer, H. P. (2002). Spinocerebellar ataxias in the Netherlands: prevalence and age at onset variance analysis. *Neurology*, 58(5), 702-708. <https://doi: 10.1212/wnl.58.5.702>.
- Van Dijk, G. W., Wokke, J. H. J., Oey, P. L., Franseen, H., Ippel, P. F. & Veldman, H. (1995). A new variant of sensory ataxic neuropathy with autosomal dominant inheritance. *Brain*, 118(6), 1557–1563. <https://doi.org/10.1093/brain/118.6.1557>
- Veneziano, L. & Frontali, M. (1999, letztes Update 09.06.2016). DRPLA. In Adam, M. P., Ardinger, H. H., Pagon, R. A., et al., editors. *GeneReviews*® (Internet). Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2021.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1491/>. Letzter Zugriff: 10.07.2021.
- Verbeek, D., Schelhaas, J., Ippel, E., Beemer, F., Pearson, P. & Sinke, R. (2002). Identification of a novel SCA locus ( SCA19 ) in a Dutch autosomal dominant cerebellar ataxia family on chromosome region 1p21-q21. *Human Genetics*, 111(4–5), 388–393. <https://doi.org/10.1007/s00439-002-0782-7>
- Wang, J., Wen, Y., Zhang, Q., Yu, S., Chen, Y., Wu, X., Zhang, Y. & Bao, X. (2019). Gene mutational analysis in a cohort of Chinese children with unexplained epilepsy: Identification of a new KCND3 phenotype and novel genes causing

- Dravet syndrome. *Seizure*, 66, 26–30.  
<https://doi.org/10.1016/j.seizure.2019.01.025>
- Wang, Y., Koh, K., Namekawa, M. & Takiyama, Y. (2015). Whole-exome sequencing reveals a missense mutation in the KCND3 gene in a patient with SCA19/22. *Neurology and Clinical Neuroscience*, 3(5), 197–199.  
<https://doi.org/10.1111/ncn3.12004>
- Waters, M. F., Minassian, N. A., Stevanin, G., Figueroa, K. P., Bannister, J. P. A., Nolte, D., Mock, A. F., Evidente, V. G. H., Fee, D. B., Müller, U., Dürr, A., Brice, A., Papazian, D. M. & Pulst, S. M. (2006). Mutations in voltage-gated potassium channel KCNC3 cause degenerative and developmental central nervous system phenotypes. *Nature Genetics*, 38(4), 447–451.  
<https://doi.org/10.1038/ng1758>
- Watson, L. M., Bamber, E., Schnekenberg, R. P., Williams, J., Bettencourt, C., Lickiss, J., Jayawant, S., Fawcett, K., Clokie, S., Wallis, Y., Clouston, P., Sims, D., Houlden, H., Becker, E. B. & Németh, A. H. (2017). Dominant Mutations in GRM1 Cause Spinocerebellar Ataxia Type 44. *The American Journal of Human Genetics*, 101(3), 451–458. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.08.005>
- Yellen, G. (2002). The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature*, 419(6902), 35–42. <https://doi.org/10.1038/nature00978>
- Zanni, G. & Bertini, E. S. (2011). X-linked disorders with cerebellar dysgenesis. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 6(1), 24. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-6-24>
- Zhong, Y., Xu, F., Wu, J., Schubert, J. & Li, M. M. (2021). Application of Next Generation Sequencing in Laboratory Medicine. *Annals of Laboratory Medicine*, 41(1), 25–43. <https://doi.org/10.3343/alm.2021.41.1.25>
- Ziefer, P & Lücking C. H. (2009). Degenerative Erkrankungen mit Leitsymptom Ataxie. In Hufschmidt, A. & Lücking, C. H. (Hrsg.). *Neurologie compact: Für Klinik und Praxis* (5., aktualisierte und erweiterte Auflage, Seite 273-280). Stuttgart, Deutschland: Thieme.
- 1000 Genomes Project Consortium, Auton, A., Brooks, L. D., Durbin, R. M., Garrison, E. P., Kang, H. M., Korbel, J. O., Marchini, J. L., McCarthy, S., McVean, G. A.

- & Abecasis G.R. (2015). A global reference for human genetic variation. *Nature*, 526(7571), 68–74. <https://doi.org/10.1038/nature15393>
- 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis, G. R., Altshuler, D., Auton, A., Brooks, L. D., Durbin, R.M., Gibbs R. A., Hurles, M. E. & McVean, G. A. (2010). A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*, 467(7319), 1061–1073. <https://doi.org/10.1038/nature09534>

## 11 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten. 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 an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Datum

Unterschrift

## 12 Danksagung

Zunächst gilt mein Dank dem Institut für Humangenetik, unter der damaligen Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Müller, für die Aufnahme meiner Person als Doktorandin sowie die großzügige Bereitstellung des Arbeitsplatzes, der Geräte und der Materialien im Labor.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. rer. nat. Dagmar Nolte. Bei ihr möchte ich mich von Herzen für die Vergabe des Themas, die fürsorgliche Betreuung sowie all die Unterstützung in den vergangenen Jahren bedanken. Sie war mit stets eine verlässliche Ansprechpartnerin. Die Zusammenarbeit mit ihr wird mir stets in bester Erinnerung bleiben und ich bin bis heute sehr dankbar dafür, dass sich unsere Wege im Rahmen dieses Projektes gekreuzt haben.

Weiterhin danke ich den Verantwortlichen für die Aufnahme in das Prägraduierertenkolleg des Fachbereichs Medizin der JLU Gießen.

Meinen Eltern danke ich für ihre bedingungslose Unterstützung.