

# **Mutationssuche im metabotropen Glutamatrezeptor Typ 1 Gen (*GRM1*) bei Ataxie-Patienten**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Fiedler, Micha Marjan Frederik  
aus Bad Nauheim

Gießen 2021

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Institut für Humangenetik

Gutachterin: Prof. Dr. Dagmar Nolte

Gutachter: Prof. Dr. Andreas Bräuninger

Tag der Disputation: 26.01.2023

## Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Ataxie als Symptom.....	1
1.2	Klassifikation der Ataxien.....	2
1.2.1	Erworbene Ataxien.....	2
1.2.1.1	Toxische Ursache.....	3
1.2.1.2	Paraneoplastisch.....	3
1.2.1.3	Glutamat-Decarboxylase-Antikörper-assoziiert .....	3
1.2.1.4	Sonstige erworbene Ataxien .....	4
1.2.2	Sporadische degenerative Ataxien .....	4
1.2.2.1	Ataxie bei Multisystematrophie vom cerebellären Typ.....	4
1.2.2.2	Sporadische Ataxie unklarer Genese .....	4
1.2.3	Hereditäre Ataxien .....	4
1.2.3.1	Autosomal rezessive Ataxien.....	5
1.2.3.2	X-chromosomal vererbte Ataxien.....	7
1.2.3.3	Mitochondriale Ataxien .....	8
1.2.3.4	Spastische Ataxien .....	9
1.2.3.5	Autosomal dominante Ataxien .....	9
1.2.3.5.1	Episodische Ataxien.....	10
1.2.3.5.2	Spinocerebelläre Ataxien .....	10
1.3	Zielsetzung dieser Arbeit.....	22
2	Material & Methoden.....	23
2.1	Material.....	23
2.2	Methoden.....	26
2.2.1	Patientenkollektiv .....	26
2.2.2	DNA-Extraktion mit QIAamp DNA Blood Mini Kit .....	27
2.2.3	DNA-Konzentrationsbestimmung.....	27

2.2.4	cDNA-Synthese.....	28
2.2.4.1	Prinzip der cDNA-Synthese.....	28
2.2.4.2	Umschreiben von Gesamt-RNA in cDNA.....	28
2.2.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	29
2.2.5.1	Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion .....	29
2.2.5.2	Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion .....	31
2.2.6	Agarose-Gelelektrophorese .....	32
2.2.6.1	Prinzip der Agarose-Gelelektrophorese .....	32
2.2.6.2	Anwendung der Agarose-Gelelektrophorese .....	32
2.2.7	Aufreinigung der PCR-Produkte.....	33
2.2.8	Sequenzierung .....	34
2.2.8.1	Prinzip der Sequenzierung .....	34
2.2.8.2	Anwendung der Sequenzierung .....	36
2.2.8.2.1	Sequenzierung im Institut für Humangenetik und der Blutbank Gießen	36
2.2.8.2.2	Sequenzierung durch Microsynth SEQLAB, Göttingen.....	37
2.2.8.3	Aufreinigung des Sequenzierproduktes .....	37
2.2.8.4	Sequenzanalyse .....	38
2.2.8.5	Auswertung und Bioinformatische Analyse von Polymorphismen...	38
3	Ergebnisse .....	40
3.1	Studiendesign und Patientenpopulation.....	40
3.2	Nachweis von <i>GRM1</i> -Transkripten in verschiedenen Geweben.....	40
3.3	Sequenzanalyse von <i>GRM1</i> .....	41
3.3.1	Exon 1 .....	43
3.3.2	Exon 2 .....	44
3.3.3	Exon 3 .....	44
3.3.4	Exon 4 .....	44

3.3.5	Exon 5 .....	45
3.3.6	Exon 6 .....	47
3.3.7	Exon 7 .....	47
3.3.8	Exon 8 .....	50
3.3.9	Übersicht der nachgewiesenen Varianten .....	59
3.3.10	Fallbericht und Familienuntersuchung Patient 453.1, Variante c.2785G>A (p.Val929Ile).....	60
3.3.11	Fallbericht und Familienuntersuchung Patient 1119.1, Variante c.3214C>G (p.Pro1072Ala).....	63
4	Diskussion.....	65
4.1	Häufigkeit der spinocerebellären Ataxien .....	65
4.2	Mutationen in <i>GRM1</i> als Krankheitsursache.....	66
4.3	Pathogene Mutationen in <i>GRM1</i> (vorbeschrieben) .....	68
4.4	Nachgewiesene Varianten in <i>GRM1</i> .....	69
4.4.1	Varianten in nicht-codierenden Bereichen .....	70
4.4.2	Familie 453.....	71
4.4.3	Familie 1119.....	72
4.4.4	Putativ pathogene Mutation .....	72
4.5	<i>GRM1</i> -Gewebespezifische Expression und mGluR1-Pathophysiologie.....	73
4.6	Empfehlung zur molekulargenetischen Diagnostik.....	76
4.7	Ausblick.....	77
5	Zusammenfassung.....	79
5.1	Summary.....	80
6	Abkürzungsverzeichnis.....	81
7	Abbildungsverzeichnis.....	83
8	Tabellenverzeichnis .....	85
9	Literaturverzeichnis .....	86
10	Erklärung zur Dissertation .....	97



# 1 Einleitung

## 1.1 Ataxie als Symptom

Mit dem Begriff Ataxie werden in der Medizin Störungen der Bewegungskoordination bezeichnet. Das aus dem Griechischen stammende Wort bedeutet übersetzt so viel wie *Unordnung*. Dies bezieht sich auf die Bewegungen, die aufgrund mangelnden Zusammenwirkens verschiedener Muskelgruppen (Asynergie) häufig unkontrolliert und infolge falscher Abmessung von Zielbewegungen (Dysmetrie) überschießend (Hypermetrie) oder vorzeitig abgebremst (Hypometrie) wirken. Darüber hinaus gehören zum klinischen Bild der Ataxie typischerweise neben Unsicherheiten beim Stehen und Gehen auch Störungen der Okulomotorik, Dysarthrie, Dysdiadochokinese und ein Zittern bei willkürlichen, gezielten Bewegungen (Intentionstremor). (Hentsch 2017; Ashizawa und Xia 2016)

Die klinischen Symptome gehen in aller Regel auf eine Schädigung des Kleinhirns oder der zuleitenden vestibulären und propriozeptiven Afferenzen zurück. Abhängig von der Lokalisation der Schädigung können sich unterschiedliche Ausfallerscheinungen manifestieren.

In der Ataxie-Diagnostik spielt die körperliche Untersuchung eine wichtige Rolle. Hier kommen neben der Beurteilung von Stand, Gang und Sprache auch diverse Tests zur standardisierten Beurteilung der auftretenden Bewegungsstörungen zum Einsatz. Mit dem Romberg-Stehversuch und dem Unterberger-Tretversuch wird das Gleichgewicht getestet. Der Finger-Nase-Versuch und der Knie-Hacken-Versuch dienen der orientierenden Untersuchung der Koordination bei Intentionbewegungen und dem Nachweis eines Intentionstremors. Weitere Symptome können in seltenen Fällen Hinweise auf vorliegende Ataxie-Subtypen geben. Neben der körperlichen Untersuchung spielt die Familienanamnese eine entscheidende Rolle in der Ataxie-Diagnostik, da sie Hinweise auf hereditäre Ataxie-Formen liefern kann. Die Bildgebung mittels MRT spielt eine wichtige Rolle bei der Abgrenzung fokaler von nicht-fokalen Kleinhirnschäden. Wird eine hereditäre Ataxieform vermutet, so kommen biochemische und molekulargenetische Methoden zur Differenzierung des Ataxie-Subtyps zum Einsatz. (Klockgether 2018a; Ashizawa und Xia 2016; Bird 2019)

In der Europäischen Union gelten Erkrankungen mit fünf oder weniger Betroffenen pro 10.000, also  $\leq 50/100.000$ , als selten. Mit einer geschätzten Prävalenz von 10-26/100.000 (Ruano et al. 2014; Salman 2018; Tsuji et al. 2008) handelt es sich bei Ataxien somit um seltene Krankheitsbilder, deren Symptomatik und Behandlung auch vom jeweils vorliegenden Subtyp abhängen.

Als Basistherapie dienen bei allen Ataxie-Formen physiotherapeutische Behandlungen mit koordinationsfördernden Übungen. Darüber hinaus sollte bei Formen mit behandelbarer Ursache (z.B. Vitaminmangel) eine kausale Therapie erfolgen. (Klockgether 2018a)

Anhand ihrer Ursachen lassen sich Ataxien in mehrere Gruppen einteilen (siehe Kapitel 1.2 Klassifikation der Ataxien). Die große Gruppe der spinocerebellären Ataxien zeichnet sich dadurch aus, dass sie autosomal dominant vererbt werden und ihnen pathogene Mutationen in bestimmten Genen zugeordnet werden können. SCA Typ 44, die in dieser Arbeit untersucht wird, ist durch Mutationen im *GRM1*-Gen definiert, ein Gen, welches für einen metabotropen Glutamatrezeptor codiert (siehe 1.2.3.5.2.1)

## **1.2 Klassifikation der Ataxien**

In den aktuellen Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (Klockgether 2018a) wird eine Unterteilung in folgende drei Kategorien vorgenommen:

- erworbene Ataxien
- sporadisch degenerative Ataxien
- hereditäre Ataxien

Dieses Kapitel soll einen Überblick über die genannten Kategorien einschließlich ihrer Untergruppen geben.

### **1.2.1 Erworbene Ataxien**

Ataxien, die durch Noxen verursacht werden und nicht hereditär sind, werden unter dem Begriff der erworbenen Ataxien zusammengefasst. Die Ursachen können hierbei vielfältig sein. Allen gemein ist in der Regel eine Schädigung des Kleinhirns oder seiner Afferenzen mit klinisch entsprechenden sensomotorischen Bewegungsstörungen.

Die erworbenen Ataxien spielen in der Diagnostik eine wichtige Rolle. Sie zu erkennen ist besonders relevant, da ihnen oftmals eine behandelbare Ursache zugrunde liegt, die

möglichst früh und gezielt therapiert werden sollte. Auf diese Weise kann ein Progress verhindert und in einigen Fällen eine Besserung der Symptomatik erreicht werden.

#### **1.2.1.1 Toxische Ursache**

Viele verschiedene Noxen können Ataxien verursachen. Häufigste Ursache ist die alkoholinduzierte Kleinhirndegeneration. Bei chronischem Alkoholabusus entwickelt sich eine Vitamin B<sub>1</sub>-Hypovitaminose mit konsekutiver Ausbildung einer Wernicke-Enzephalopathie, die mit hämorrhagischen Läsionen unter anderem im Kleinhirn einhergehen kann. Neben Vitamin B<sub>1</sub> Mangel können auch Vitamin B<sub>12</sub> und Vitamin E-Mangelzustände, etwa aufgrund von Malabsorption oder entsprechender Diät, Ataxie-Symptome bedingen.

Des Weiteren können einige Medikamente Auslöser von Ataxien sein, darunter verschiedene Antikonvulsiva (z.B. Diphenylhydantoin), Zytostatika sowie Lithiumsalze. Auch Drogen wie Cocain oder Heroin und Umweltgifte (Schwermetalle, Lösungsmittel) sind potentielle Auslöser. (Bürk 2016; Klockgether 2018a; Manto 2012)

#### **1.2.1.2 Paraneoplastisch**

Auch im Rahmen von Malignomen kann es zur Schädigung des zentralen Nervensystems (ZNS) kommen. Wenn Antikörper, die im Körper gegen Tumorstrukturen gebildet wurden, zugleich auch gegen Strukturen des ZNS gerichtet sind, kann es in der Folge zu einer paraneoplastischen Kleinhirndegeneration (paraneoplastic cerebellar degeneration, PCD) oder einer paraneoplastischen Enzephalomyelitis kommen. Vor allem bei kleinzelligen Bronchialkarzinomen (Anti-Hu-Antikörper, Anti-Ri-Antikörper und ZIC4-Antikörper), Mamma- und Ovarialkarzinomen (Anti-Yo-Antikörper) sowie Lymphomen (Anti-Tr-Antikörper) ist diese Paraneoplasie zu beobachten. Während in vielen Fällen zwar auch entsprechende Antikörper im Blut oder Liquor nachgewiesen werden können, ist der Nachweis eines malignen Tumors für die Diagnosestellung entscheidend. (Bürk 2016; Klockgether 2018a)

#### **1.2.1.3 Glutamat-Decarboxylase-Antikörper-assoziiert**

Der Subtyp der Glutamat-Decarboxylase-Antikörper-assoziierten Ataxie ähnelt im Pathomechanismus den paraneoplastisch verursachten Ataxien. Die gegen die vor allem im ZNS wichtige Glutamat-Decarboxylase gerichteten Antikörper sind jedoch

Ausdruck einer von Neoplasien unabhängigen Autoimmunerkrankung. (Graus et al. 2010)

#### **1.2.1.4 Sonstige erworbene Ataxien**

Weitere mögliche Ursachen einer Schädigung des Kleinhirns und daraus resultierender Ataxie-Symptomatik sind hämorrhagische sowie ischämische Schlaganfälle, ZNS-Infektionen, Prionenerkrankungen und Multiple Sklerose. (Ashizawa und Xia 2016)

#### **1.2.2 Sporadische degenerative Ataxien**

Zur Gruppe der sporadisch degenerativen Ataxien zählen neben Ataxien bei Multisystematrophie auch jene mit unklarer Genese.

##### **1.2.2.1 Ataxie bei Multisystematrophie vom cerebellären Typ**

Bei der Multisystematrophie handelt es sich um eine progressive neurodegenerative Erkrankung mit einem mittleren Erkrankungsalter von 55 Jahren. Charakteristisch sind im Zytoplasma der Oligodendrozyten nachweisbare  $\alpha$ -Synuclein-Einschlusskörperchen. Die Symptome können vielfältig sein und reichen von Parkinsonsymptomen über Pyramidenbahnzeichen bis hin zu Symptomen, die aus Schädigungen des autonomen Nervensystems oder des Kleinhirns resultieren. Entsprechend der dominierenden Symptomatik wird zwischen Multisystematrophie vom Parkinson-Typ (MSA-P) und Multisystematrophie vom zerebellären Typ (MSA-C) mit ataktischer Symptomatik unterschieden. (Gilman et al. 2008; Watanabe et al. 2002; Wenning et al. 2004)

##### **1.2.2.2 Sporadische Ataxie unklarer Genese**

Bei der sporadischen Ataxie unklarer Genese (Sporadic adult onset ataxia of unknown aetiology, SAOA) handelt es sich um eine Ausschlussdiagnose. Die Diagnose wird gestellt, wenn im Erwachsenenalter beginnende Ataxiesymptome vorliegen und hereditäre sowie erworbene Ataxie-Formen und das Vorliegen einer Multisystematrophie ausgeschlossen wurden. In der Bildgebung zeigt sich meist eine isolierte Kleinhirnatrophie. (Klockgether 2018b)

#### **1.2.3 Hereditäre Ataxien**

Zur Gruppe der hereditären Ataxien zählen all jene Formen, denen eine Veränderung der DNA als Auslöser der Symptome zugeordnet werden kann. Als mögliche Veränderungen kommt die ganze Bandbreite der Genmutationen in Frage.

Veränderungen einzelner Nukleotide werden als Punktmutationen bezeichnet. Wird eine Nukleotid gegen ein anderes ausgetauscht, handelt es sich um eine Transition oder Transversion, wird eine Base eingefügt um eine Insertion, das Entfernen einer Base bezeichnet man als Deletion. Insertionen, Deletionen sowie der Austausch von Nukleotiden sind jedoch nicht immer auf ein einzelnes Nukleotid begrenzt, sondern können auch größere DNA-Abschnitte betreffen.

Da die Basenabfolge der DNA die Aminosäuresequenz von Proteinen definiert, können Veränderungen der Nukleotidsequenz folglich zu Veränderungen der Aminosäuresequenz führen. Dies kann, muss jedoch nicht immer der Fall sein. Drei Nukleotide codieren den Einbau einer bestimmten Aminosäure. Dabei gibt es für viele Aminosäuren jedoch mehr als ein Triplet, da der genetische Code degeneriert ist. Veränderungen der Nukleotidsequenz, vor allem an dritter Stelle eines Triplets, führen oftmals zu keinem Aminosäureaustausch. Solche DNA-Veränderungen werden als stille Mutation bezeichnet. Kommt es durch eine Punktmutation jedoch zum Einbau einer anderen Aminosäure, so handelt es sich dabei um eine missense Mutation. Von einer Nonsense-Mutation spricht man, wenn durch eine DNA-Veränderung ein neues Stoppcodon und somit ein verkürztes Protein entsteht.

Für die Diagnosestellung einer hereditären Ataxie ist die Familienanamnese von entscheidender Bedeutung, gibt sie doch bereits Hinweise auf den möglichen zugrunde liegenden Erbgang. Basierend auf der Vererbung wird zwischen autosomal dominanten, autosomal rezessiven, X-chromosomal und mitochondrial vererbten Heredoataxien unterschieden. Aufgrund ihrer klinischen Besonderheit werden episodische sowie spastische Ataxien zu eigenen Entitäten zusammengefasst, obwohl sie sich im Einzelnen anhand ihres Erbgangs jeweils den vorgenannten Gruppen zuordnen ließen.

#### **1.2.3.1 Autosomal rezessive Ataxien**

Die autosomal rezessiven Ataxien (autosomal recessive cerebellar ataxias, ARCA) zeichnen sich durch rezessive Vererbung aus und gehen in aller Regel mit einem Symptombeginn vor dem 20. Lebensjahr einher. Anhand der zugrunde liegenden Gene lassen sich in der klinisch sehr heterogenen Gruppe der rezessiven Ataxien über 40 Vertreter (Beaudin et al. 2017) voneinander unterscheiden, von denen einige mit Schädigungen in DNA-Reparaturmechanismen oder metabolischen Störungen einhergehen.

Mit einer Prävalenz von 2-5/100.000 stellt die **Friedreich Ataxie** (FRDA) den häufigsten Vertreter dieser Gruppe dar, insbesondere handelt es sich um die häufigste Ataxie des Kindesalters. Es wird eine Häufung in bestimmten Regionen Europas (Zamba-Papanicolaou et al. 2009; Sandford und Burmeister 2014) und eine Heterozygotenfrequenz in Deutschland von 1:80 (Bürk 2016) beschrieben. Ursächlich sind Veränderungen im *Frataxin*-Gen (*FXN*). Meist kommt es im Intron 1 zur sogenannten Trinukleotid-Expansion, das bedeutet den wiederholten Einbau von drei bestimmten Nukleotiden hintereinander (Campuzano et al. 1996). Durch den wiederholten Einbau der Nukleotide GAA kommt es zu Störungen bei der Transkription und somit verminderter Expression des Gens. Meist ist eine homozygote GAA-Repeat-Expansion Auslöser der Erkrankung, es sind jedoch auch einige Fälle beschrieben, in denen eine Compound-Heterozygotie mit GAA-Repeat-Expansion in einem Allel und eine missense Mutation im zweiten Allel ursächlich ist.

Zu den Diagnosekriterien der Friedreich Ataxie gehören ein Symptombeginn vor dem 25. Lebensjahr, progrediente Stand- und Gangataxie sowie fehlende Muskeleigenreflexe in den Beinen (Harding 1982). Häufig kommt es bereits bis zum 30. Lebensjahr zum Verlust der Gehfähigkeit (Cook und Giunti 2017), zusätzlich entwickeln sich bei einem Großteil der Patienten Dysarthrie, Pyramidenbahnzeichen sowie ein Funktionsverlust der Hinterstrangbahnen (Harding 1981). Mehr als die Hälfte der Betroffenen zeigen orthopädische Auffälligkeiten wie eine Skoliose oder einen Hohlfuß („Friedreich-Fuß“). Friedreich-Ataxie-Patienten weisen zudem gehäuft weitere Erkrankungen wie Diabetes Mellitus, Optikusatrophie und Taubheit auf. (Palau und Espinós 2006)

Die Länge der GAA-Repeats scheint einen Einfluss auf den Beginn und die Schwere der Erkrankung zu haben. So waren die GAA-Repeats bei Patienten, die zusätzlich Diabetes mellitus oder eine Kardiomyopathie aufwiesen, signifikant länger (Filla et al. 1996) und ein früherer Symptombeginn korreliert mit längeren GAA-Repeats. Kommt es bei der Vererbung einer Krankheit zu einem früheren Einsetzen der Symptome in der Nachfolgeneration oder nimmt der Schweregrad der Symptome zu, bezeichnet man dies als Antizipation.

Der zweithäufigste Vertreter der rezessiv vererbten Ataxien ist mit einer Prävalenz von 1-2,5/100.000 die **Ataxia teleangiectatica** (Louis-Bar-Syndrom). Es handelt sich dabei um eine neurodegenerative Multisystemerkrankung, die auf Mutationen im *ATM*-Gen

zurückzuführen ist. Dieses Gen codiert für ein an der DNA-Reparatur beteiligtes Protein. Die meisten betroffenen Patienten weisen compound-heterozygote Mutationen auf, welche zur Bildung eines verkürzten und in seiner Funktionalität eingeschränkten Proteins führen. Bedingt durch die Beeinträchtigung des DNA-Reparatursystems akkumulieren Mutationen in der DNA und es kommt, vor allem im Cerebellum, zu einem Absterben von Zellen. Auch ist die Anfälligkeit für Krebserkrankungen bei diesem Syndrom signifikant erhöht. Die ersten Symptome zeigen sich in der Regel im Alter von 2-4 Jahren in Form einer ataktischen Symptomatik und führen bis zum 10. Lebensjahr bereits zu einer Rollstuhlabhängigkeit. Weitere typische Symptome sind die namensgebenden Teleangiectasien, welche vor allem an den Skleren zu beobachten sind, okulomotorische Apraxie sowie wiederkehrende Atemwegsinfekte aufgrund einer Immunschwäche. Die klinische Verdachtsdiagnose kann über eine Kleinhirnatrophie sowie erhöhte Alpha-Fetoprotein-Werte im Serum erhärtet und durch molekulargenetische Testung bestätigt werden. (Palau und Espinós 2006; Sandford und Burmeister 2014)

Mit einem mittleren Erkrankungsalter von 28 Jahren stellt das **mitochondriale rezessive Ataxiesyndrom** (MIRAS) die häufigste Ursache autosomal rezessiv vererbter late-onset Ataxien dar. Ihm liegen Mutationen im mitochondrialen Polymerase-Gamma-Gen (*POLG*) auf Chromosom 15 zugrunde. Der Name beruht auf der Beteiligung der nukleär codierten Polymerase an der mitochondrialen DNA-Replikation. (Palau und Espinós 2006)

Daneben gibt es weitere seltene Vertreter wie die **cerebrotendinöse Xanthomatose** und das **Refsum-Syndrom**, welchen aufgrund spezieller Behandlungsmöglichkeiten besondere Relevanz zukommt und die **Ataxie mit okulomotorischer Apraxie**.

### **1.2.3.2 X-chromosomal vererbte Ataxien**

Die X-chromosomal vererbten Ataxien sind mit Ausnahme des **Fragiles-X-assoziierten-Tremor-Ataxie-Syndroms** (FXTAS) sehr selten. Beim FXTAS führt eine Prämutation (55-200 CGG-Repeats) in der 5'-untranslatierten Region im *FMRI*-Gen bei etwa 33% der männlichen und 10% der weiblichen Träger zu Symptomen. Diese treten meist erst im höheren Lebensalter auf, sind langsam progredient und bestehen in erster Linie aus Ataxie sowie einem Intentionstremor, umfassen aber oftmals auch Störungen

des peripheren und des autonomen Nervensystems, Parkinson-Syndrom und kognitive Beeinträchtigungen. (Zanni und Bertini 2011; Sandford und Burmeister 2014)

Eine weitere X-chromosomal vererbte Ataxie ist die **X-chromosomale sideroblastische Anämie mit Ataxie**. Sie zeichnet sich durch eine moderate Anämie, frühen Symptombeginn und sehr langsamen Progress der Symptome aus. Leichte Lernschwäche und Depression sind mögliche Begleiterscheinungen. Mutationen im *ABC7*-Gen, das für einen Eisentransporter der inneren Mitochondrienmembran codiert, führen zur namensgebenden Akkumulation von Eisen in den Mitochondrien. (Bekri et al. 2014)

Insgesamt wurden über 15 Gene auf dem X-Chromosom mit Ataxien in Verbindung gebracht, von denen einige bisher lediglich in einzelnen betroffenen Familien beschrieben wurden. (Zanni und Bertini 2011)

### **1.2.3.3 Mitochondriale Ataxien**

Mitochondrien sind an vielen Stoffwechselwegen beteiligt und vor allem über die Atmungskette für die Energiebereitstellung in Form von ATP essentiell. Einschränkungen der Mitochondrienfunktion können zu einem sehr heterogenen klinischen Bild führen und häufig mehrere Organe betreffen. Oftmals sind Myopathien sowie neurologische Ausfallerscheinungen, darunter ataktische Symptome, zentraler Bestandteil des klinischen Bildes. Auch Kardiomyopathien, Diabetes mellitus, Demenz und Migräne sind häufige Manifestationen bei mitochondrialen Erkrankungen.

Mitochondriopathien können auf Schäden der DNA basieren. Ein Großteil der in ihnen vorkommenden Proteine wird im Zellkern codiert, jedoch besitzen Mitochondrien zusätzlich ein eigenes Genom, die sogenannte mitochondriale DNA (mtDNA), welche ebenfalls für einige mitochondriale Proteine codiert. In beiden Genomen konnten Gene identifiziert werden, die bei entsprechender Mutation zur Manifestation klinischer Beschwerden führen und Grundlage einer Vererbung der Symptomatik sein können. Die mitochondriale DNA wird maternal von der Mutter an die Kinder vererbt.

Zu den Ataxien die durch Veränderungen mitochondrialer DNA verursacht werden, gehören frühkindliche Erkrankungen, wie das NARP-Syndrom (Akronym für Neuropathie, Ataxie, Retinopathia Pigmentosa) und das maternal vererbte Leigh-Syndrom (MILS), denen Punktmutationen im *MT-ATP6*-Gen zugrunde liegen (Dautant

et al. 2018). Weiterhin das MERRF-Syndrom (myoclonic epilepsy with ragged red fiber) und das Kearns-Sayre-Syndrom (KSS). Es sind zudem weitere mtDNA-Veränderungen bekannt, die jedoch seltener auftreten und nicht immer mit einer Ataxie einhergehen (Chinnery 2014). Mutationen in *MT-ATP6* wurden auch bei adulten SCA-Patienten beschrieben, deren Krankheitsbild nicht von den typischen puren, kerncodierten SCAs unterschieden werden kann. (Pfeffer et al. 2012)

Mutationen in Genen der Zellkern-DNA, welche zu Mitochondriopathien führen, werden in aller Regel autosomal rezessiv vererbt. Das bereits in obigem Kapitel beschriebene MIRAS stellt ein Beispiel für eine solche Erkrankung dar. Weitere Vertreter sind unter anderem das SANDO-Syndrom und das LBSL-Syndrom (Leukoencephalopathy with brainstem and spinal cord involvement and elevated lactate). (Bird 2019; Finsterer 2009)

#### **1.2.3.4 Spastische Ataxien**

In vielen Fällen sind Ataxien von Spastiken begleitet. Bei Mutationen in einigen bestimmten Genen dominiert die spastische Symptomatik das klinische Bild. Ataxien, bei denen dies der Fall ist, werden, unabhängig von ihrem Erbgang, als spastische Ataxien (SPAX) bezeichnet. In der Datenbank OMIM sind derzeit (Stand April 2020) neun spastische Ataxien beschrieben, einige Autoren ordnen zusätzlich die spastische Paraplegie Typ 7 dieser Gruppe zu. Mit Ausnahme der autosomal dominant vererbten SPAX1 und SPAX7 folgen sie einem autosomal rezessiven Erbgang (Bird 2019).

#### **1.2.3.5 Autosomal dominante Ataxien**

Neben der großen Gruppe der spinocerebellären Ataxien (siehe Kapitel 1.2.3.5.2 Spinocerebelläre Ataxien) werden auch die episodischen Ataxien autosomal dominant vererbt. Aufgrund ihrer klinischen Besonderheit werden letztere zu einer eigenen Entität gruppiert. Bevor es möglich war einzelne Gene als Ursache autosomal-dominanter cerebellärer Ataxien (ADCA) molekulargenetisch zu identifizieren, wurden diese auch als Nonne-Marie-Syndrom, erbliche olivo-ponto-cerebelläre Atrophie oder spinocerebelläre Degeneration bezeichnet. (Bird 2019)

Die Prävalenz autosomal dominanter Ataxien liegt im Mittel bei 2,7/100.000 (Ruano et al. 2014), insbesondere die einzelnen Subtypen unterliegen jedoch starken regionalen Schwankungen.

#### **1.2.3.5.1 Episodische Ataxien**

Die episodischen Ataxien (EA) zeichnen sich durch das episodische Auftreten ataktischer Symptome aus, die Sekunden bis hin zu mehreren Tagen andauern. Im späteren Verlauf der Erkrankung sind jedoch auch anhaltende Symptomatik und nachweisbare Kleinhirnatrophie möglich. Häufig werden neben einer zerebellären Symptomatik aus Gangunsicherheit, Nystagmus und Dysarthrie auch Migräne oder Lähmungen beobachtet, die eine Abgrenzung zu anderen paroxysmalen Erkrankungen erschweren können. Bei einzelnen Subtypen können zusätzliche Symptome wie Myokymien oder Hörverlust auftreten. Klassischerweise setzen die Symptome erstmals in der frühen Kindheit ein und Episoden können durch Trigger wie Stress, Hormonschwankungen oder Koffeinkonsum ausgelöst werden. Insgesamt werden gegenwärtig neun verschiedene episodische Ataxien unterschieden.

Die beiden häufigsten episodischen Ataxien, EA1 und EA2 basieren auf Fehlfunktionen von Ionenkanälen. Bei EA1 handelt es sich um einen Kaliumkanal, bei EA2 um einen Kalziumkanal. Diagnostisch lassen sich Mutationen im *KCNA1*-Gen (EA1) bzw. *CACNA1A*-Gen (EA2) nachweisen.

Zur Therapie kommen Carbamazepin und Valproinsäure vor allem bei EA1, Fampiridin und Flunarizin bei EA2 sowie Acetazolamid bei beiden Formen zum Einsatz. (Jen et al. 2007; Bird 2019; Klockgether 2018a)

#### **1.2.3.5.2 Spinocerebelläre Ataxien**

Die Bedeutung des Begriffs „spinocerebelläre Ataxie“ (SCA) unterlief einer geschichtlichen Wandlung. Wurde er 1950 noch zur Beschreibung der Friedreich Ataxie verwendet, so bezeichnet er heute den Großteil der autosomal dominant vererbten Heredoataxien. Basierend auf dem Zeitpunkt ihrer Beschreibung wurden die identifizierten SCA-Loci fortlaufend nummeriert und unterscheiden sich in ihrer genetischen Ursache. Einige Abweichungen existieren, denn es stellte sich heraus, dass den SCAs 15 und 16 sowie SCA19 und SCA22 dieselben genetischen Veränderungen zugrunde liegen. SCA9 und SCA33 sind nicht vergeben. Ausgenommen von der SCA-Nummerierung sind die bereits beschriebenen episodischen Ataxien sowie einige komplexe Formen (z.B. die Dentatorubro-Pallidoluyische Atrophie, kurz DRPLA) (Storey 2014). Als erste SCA wurde 1993 die genetische Ursache der SCA1 von Orr et al. beschrieben. (Orr et al. 1993)

Den verschiedenen genetischen Veränderungen der SCAs ist gemein, dass sie in aller Regel zu Schädigungen des Kleinhirns sowie seiner afferenten und efferenten Verbindungen führen. Entsprechende Veränderungen, allem voran eine Atrophie des Kleinhirns, können mittels MRT nachweisbar sein.

Die spinocerebellären Ataxien stellen eine Gruppe von Erkrankungen mit klinisch heterogenem Bild dar. Die Kernsymptomatik, welche sich bei nahezu allen Formen beobachten lässt, besteht aus Stand- und Gangataxie mit Gleichgewichtsstörungen, Dysarthrie sowie Nystagmus. Häufig treten zusätzliche neurologische Symptome wie Dystonie, Spastiken, Chorea, Ophthalmoplegie, Neuropatien, kognitive Defizite und parkinson-ähnliche Symptome auf. Manche Symptome können zwar Hinweise auf den vorliegenden SCA-Subtyp geben, jedoch sind sie weder beweisend für einzelne Subtypen, noch schließt das Fehlen typischer Symptome einzelne Subtypen aus. Man beobachtet beispielsweise gehäuft einen Visusverlust bei SCA7, Intentionstremor bei SCA12 und epileptische Anfälle bei SCA10 und SCA13, zugleich sind jedoch auch SCA13-Fälle ohne Epilepsie beschrieben. Erste Symptome, in der Regel langsam progredient, zeigen sich meist zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr, können jedoch in Einzelfällen und bei manchen Subtypen auch in der Kindheit oder höherem Lebensalter erstmals auftreten. (Klockgether 2018a; Sullivan et al. 2019)

Vor der Identifikation erster SCA-Loci teilte man die ADCAs nach der Harding-Klassifikation (Harding 1982) anhand klinischer Gesichtspunkte in drei Kategorien ein, die bis heute im klinischen Alltag von Nutzen sein können:

- ADCA I: Ataxien mit zusätzlichen neurologischen Symptomen (z.B. SCA 1, 2, 3, 4, 8, 31, ...)
- ADCA II: Ataxien mit Visusstörungen aufgrund einer Retinopathie (nur SCA 7)
- ADCA III: reine Ataxie (z.B. SCA 5, 6, 11, 41, ...)

Derzeit können anhand der genetischen Ursache über 40 SCA-Typen unterschieden werden und die Zahl der Gene, in denen Mutationen als potentiell pathogen im Sinne einer SCA identifiziert werden, steigt weiter. (Coarelli et al. 2018)

Die häufigeren SCAs werden durch Trinukleotid-Repeat-Expansionen verursacht. Im Falle einiger SCAs handelt es sich hierbei um die Abfolge CAG, ein Triplet, welches für die Aminosäure Glutamin (Einbuchstabencode: Q) codiert. Man nennt diese

Erkrankungen deshalb auch PolyQ-Erkrankungen. Den SCAs 1, 2, 3, 6, 7, 12 und 17 liegt diese Pathologie zugrunde. SCA12 stellt hierbei einen Sonderfall dar, da hier die Triplet-Repeats im 5'-untranslatierten Bereich des *PPP2R2B*-Gens auftreten und somit nicht proteincodierend sind. Auch SCA 8, 10, 31, 36 und 37 werden durch Nukleotid-Repeat-Expansionen verursacht. Im Falle der SCA8 handelt es sich hierbei um die Nukleotide CTG/CAG, welche im Bereich zweier überlappender Gene (*ATXN8OS* und *ATXN8*) wiederholt auftreten. In *ATXN8* resultieren fast reine CAG-Repeats in einer Polyglutaminerkrankung (Moseley et al. 2006). Für *ATXN8OS*, welches auf dem Gegenstrang codiert und entsprechend in entgegengesetzter Richtung transkribiert wird, sind vermehrte CUG-Repeats in der 3'-untranslatierten Region beschrieben. Auch pathologische CAG-Repeats in *ATXN8* sind nachgewiesen worden (Ayhan et al. 2014). Bei SCA10 kann die wiederholte ATTCT-Abfolge im *ATXN10*-Gen (Matsuura und Ashizawa 2019) nachgewiesen werden. SCA31 wird durch Repeats der Nukleotidsequenz TGGAA stromaufwärts des *PLEKHG4*-Gens verursacht und tritt in Japan gehäuft auf (Sakai et al. 2010). Bei SCA36 und SCA37 liegen Repeats in intronischen Bereichen vor. Spezifisch handelt es sich hierbei um CGCCTG-Repeats im *NOP56*-Gen (SCA36) (García-Murias et al. 2012) und ATTTC-Repeats im *DABI*-Gen (SCA37) (Matilla-Dueñas und Volpini 2019).

Sowohl die Anzahl der Repeats, die physiologisch auftreten, als auch die Anzahl der Repeats, die zu einer Erkrankung führen, variieren von Gen zu Gen. Während bei SCA1 bereits 50 Repeats zu einer Erkrankung führen können, lassen sich bei SCA10-Patienten im Regelfall über 500 Repeats nachweisen. Repeat-Expansionen in codierenden Bereichen führen zur Bildung veränderter Proteine, die manchmal ihre Funktion nicht mehr oder nur eingeschränkt erfüllen können (loss-of-function des Proteins) oder in ihrer Funktion gesteigert sind (gain-of-function des Proteins), in nicht-codierenden Bereichen hingegen können Repeat-Expansionen zu Akkumulation von RNA im Zellkern und Fehlern beim Spleißvorgang führen. Man spricht von einem „toxic RNA gain-of-function“ (Budworth und McMurray 2013).

Tabelle 1 bietet einen Überblick über die durch Repeat-Expansion verursachten spinocerebellären Ataxien.

**Tabelle 1: Übersicht der Spinocerebellären Ataxien mit zugrunde liegender Repeat-Expansion, modifiziert nach (Ashizawa et al. 2018)**

SCA	Repeat-Sequenz	Physiologische Repeat-Anzahl	Pathologische Repeat-Anzahl	Protein-codierend*	Antizipation
SCA 1	CAG	6-39	41-83	+	+
SCA 2	CAG	<31	34-200	+	+
SCA 3	CAG	12-44	56-86	+	+
SCA 6	CAG	<18	20-33	+	-
SCA 7	CAG	4-19	>34	+	+
SCA 8	CAG/CTG	15-34	89-250	-	-
SCA 10	ATTCT	8-32	800-4500	-	+
SCA 12	GAG	7-28	67-78	-	-
SCA 17	CAG	25-40	41-66	+	-
SCA 31	ATTTT	<400	500-760	-	+
SCA 36	GGCCTG	3-14	650-2500	-	-
SCA 37	ATTTT	<400	31-75	-	-

\* Bei sämtlichen von proteincodierenden Repeat-Expansionen verursachten SCAs handelt es sich um Polyglutamin-Erkrankungen.

Das bereits bei den autosomal rezessiv vererbten Ataxien beschriebene Phänomen der Antizipation lässt sich auch bei den meisten SCAs mit zugrunde liegender Repeat-Expansion beobachten und ist bei SCA7 besonders ausgeprägt. Hier kommt es durch die Erkrankung teilweise zu Todesfällen, noch bevor bei Eltern oder Großeltern der Verstorbenen überhaupt erste Symptome auftreten. (Bird 2019)

Während mehr als die Hälfte der SCA-Fälle auf die häufigen Repeat-Expansions-Erkrankungen SCA 1, 2, 3, 6, 7 und 17 (Storey 2014; Klockgether 2018a) zurückzuführen sind, ist SCA3 die davon im globalen Mittel am häufigsten vertretene Form. Regional können jedoch andere SCA-Typen überwiegen, so ist etwa die SCA2 auf Cuba und SCA6 im Norden Englands häufiger vertreten als SCA3 (Sullivan et al. 2019).

Seltene bekannte SCA-Formen werden durch Punktmutationen bzw. kleine Deletionen/Insertionen (SCA 5, 11, 13, 14, 19/22, 23, 26-29, 35, 40-48) sowie Insertionen oder Deletionen größerer Sequenzen (SCA 15, 20) verursacht (Sullivan et al. 2019; Bird 2019; Kim und Cho 2015; Storey 2014). Diese Veränderungen der Nukleinsäuresequenz können einen loss-of-function oder gain-of-function des Proteins

bedingen. Zwar ist es heute möglich bei einem Großteil der Ataxie-Patienten mit dominantem Erbgang eine zugrunde liegende Mutation zu identifizieren, dennoch gibt es noch immer einige Fälle ohne nachweisbare, pathogene Mutation in den bisher kartierten SCA-assozierten Genloci (Edener et al. 2011).

Tabelle 2 bietet eine Übersicht über die bis heute beschriebenen spinocerebellären Ataxien.

Für die Diagnostik ist zunächst eine umfassende klinische Untersuchung mit ausgiebiger körperlich-neurologischer Untersuchung und besonderem Fokus auf eine umfassende Familienanamnese wichtig. Anschließend sollte bei Verdacht auf eine autosomal dominant vererbte Heredoataxie eine molekulargenetische Testung erfolgen. Anhand klinischer Besonderheiten und unter Berücksichtigung der ethnischen und geographischen Herkunft können Gene zur Testung ausgesucht und ggf. auch im Rahmen einer Panel-Untersuchung beurteilt werden. Bei fehlenden Indikatoren für das Vorliegen eines spezifischen Subtyps sollte zunächst eine Testung auf die häufigen SCAs 1, 2, 3 und 6 erwogen werden. (Shakkottai und Fogel 2013; Klockgether 2018a)

Mit wenigen Ausnahmen existieren für SCAs noch keine kausalen Therapieoptionen, jedoch konnten Studien einen positiven Einfluss von Physiotherapie auf die Erkrankung nachweisen. Derzeit sind keine Medikamente zur Behandlung der spinocerebellären Ataxien zugelassen, jedoch werden einige vielversprechende Therapieansätze erforscht und entsprechende Substanzen in präklinischen und klinischen Studien getestet. Zu den derzeit erforschten Strategien zählen die gentechnische Reparatur oder Transkriptionshemmung des mutierten Gens, der Abbau fehlerhafter mRNA bzw. fehlerhafter Proteine und die Off-Label-Anwendung bereits existierender Medikamente bei SCA, wenn aufgrund des Wirkmechanismus eine Wirksamkeit vermutet werden kann. (Ashizawa et al. 2018)

**Tabelle 2: Überblick über die SCA-Subtypen, die assoziierten Gene, Genloci, Proteine und Mutationen**

<b>SCA-Subtyp</b>	<b>Gen</b>	<b>Lokus</b>	<b>Protein</b>	<b>Mutation</b>
SCA1	<i>ATXN1</i>	6p22.3	Ataxin 1	CAG-Repeat-Expansion
SCA2	<i>ATXN2</i>	12q24.12	Ataxin 2	CAG-Repeat-

				Expansion
SCA3	<i>ATXN3</i>	14q32.12	Ataxin 3	CAG-Repeat-Expansion
SCA4	<i>Unbekannt</i>	16q22.1		unbekannt
SCA5	<i>SPTBN2</i>	11q13.2	Beta 3 Spectrin	Missense Mutation
SCA6	<i>CACNA1A</i>	19p13.13	P/Q Kalziumkanal $\alpha$ 1A-Untereinheit	CAG-Repeat-Expansion
SCA7	<i>ATXN7</i>	3p14.1	Ataxin 7	CAG-Repeat-Expansion
SCA8	<i>ATXN8/ATXN8OS</i>	13q21	Ataxin 8 (Gegenstrang)	CTG/CAG-Repeat-Expansion
SCA9	<i>Nicht belegt</i>			
SCA10	<i>ATXN10</i>	22q13.31	Ataxin 10	ATTCT-Repeat-Expansion
SCA11	<i>TTBK2</i>	15q15.2	Tau Tubulin Kinase 2	Missense Mutation
SCA12	<i>PPP2R2B</i>	5q32	Protein Phosphatase 2A	CAG-Repeat-Expansion
SCA13	<i>KCNC3</i>	19q13.33	Spannungsabhängiger Kaliumkanal Kv3.3	Missense Mutation
SCA14	<i>PRKCG</i>	19q13.42	Protein kinase C Gamma	Missense Mutation
SCA15/16	<i>ITPR1*</i>	3p26.1	Inositol 1,4,5-Triphosphat-Rezeptor Typ 1	Deletion
SCA17	<i>TBP</i>	6q27	TATA-Box-Bindeprotein	CAG-Repeat-Expansion
SCA18	<i>IFRD1</i>	7q22–q32	Interferon-related developmental regulator 1	Missense Mutation
SCA19/22	<i>KCND3</i>	1p13.2	Spannungsabhängiger Kaliumkanal K <sub>v</sub> 4.3	Deletion (3bp, in-frame)/Missense Mutation
SCA20		11q12		Duplikation (260kb)
SCA21	<i>TMEM240</i>	1p36.33	Transmembranprotein 240	Missense Mutation
SCA23	<i>PDYN</i>	20p13	Prodynorphin	Missense Mutation

SCA24	<i>Nicht belegt</i>			
SCA25	<i>SCA25</i>	2p21–p13		Missense Mutation
SCA26	<i>EEF2</i>	19p13.3	Eukaryotischer Elongationsfaktor 2	Missense Mutation
SCA27	<i>FGF14</i>	13q33.1	Fibroblasten Wachstumsfaktor 14	Missense Mutation
SCA28	<i>AFG3L2</i>	18p11.21	AFG3 like matrix AAA peptidase subunit 2	Missense Mutation
SCA29	<i>ITPR1*</i>	3p26.1	Inositol 1,4,5- Triphosphat-Rezeptor Typ 1	Missense Mutation
SCA30	<i>ODZ3</i> (wird vermutet)•	4q34.3– q35.1	Teneurin Transmembranprotein 3	unbekannt
SCA31	<i>BEAN1</i>	16q21		TGGAA-Repeat- Expansion
SCA32	<i>Unbekannt</i>	7q32-q33		unbekannt
SCA33	<i>Nicht belegt</i>			
SCA34	<i>ELOVL4</i>	6q14.1	Fettsäureelongase 4	Missense Mutation
SCA35	<i>TGM6</i>	20p13	Transglutaminase 6	Missense Mutation
SCA36	<i>NOP56</i>	20p13	Nucleolares Protein 56	GGCCTG-Repeat- Expansion
SCA37	<i>DABI</i>	1p32.2	DAB Adapterprotein1	ATTTC-Repeat- Expansion
SCA38	<i>ELOVL5</i>	6p12.1	Fettsäureelongase 5	Missense Mutation
SCA40	<i>CCDC88C</i>	14q32.11– q32.12	Coiled-coil domain containing 88C	Missense Mutation
SCA41	<i>TRPC3</i>	4q27	Short transient receptor potential channel 3	Missense Mutation
SCA42	<i>CACNA1G</i>	17q21.33	Spannungsabhängiger Kalziumkanal vom T- Typ (Ca <sub>v</sub> 3.1)	Missense Mutation
SCA43	<i>MME</i>	3q25.2	Neprilysin	Missense Mutation
SCA44	<i>GRM1</i>	6q24.3	Metabotroper Glutamatrezeptor 1	Missense Mutation
SCA45	<i>FAT2</i>	5q33.1	Protocadherin Fat 2	Missense Mutation
SCA46	<i>PLD3</i>	19q13.2	Phospholipase D3	Missense Mutation

SCA47	<i>PUM1</i>	1p35.2	Pumilio Homolog 1	Missense Mutation
SCA48	<i>STUB1</i>	16p13.3	CHIP	Missense, Deletion, Frameshift

Modifiziert nach (Ashizawa et al. 2018; Bird 2019; Hersheson et al. 2012) und omim.org sowie uniprot.org

\* Bei SCA15 beginnen Symptome im Erwachsenenalter und sind langsam progressiv, bei SCA29 hingegen beobachtet man angeborene, nicht-progressive Ataxie und geringe kognitive Beeinträchtigungen. (Zambonin et al. 2017)

• Eine bei einer australischen Familie durchgeführte Kopplungsanalyse und in silico Analyse potentiell ursächlicher Gene legen Veränderungen in ODZ3 als Krankheitsursache nahe. (Storey et al. 2009)

#### 1.2.3.5.2.1 Spinocerebelläre Ataxie Typ 44

Die spinocerebelläre Ataxie Typ 44 wird durch Mutationen im *GRM1*-Gen verursacht. *GRM1* (glutamate metabotropic receptor 1) ist auf Chromosom 6 in der Region 6q24.3 lokalisiert. Insgesamt sieben Transkriptvarianten sind bekannt, fünf davon proteincodierend. In dieser Arbeit wurde die längste Transkriptvariante (ENST00000282753.6, GRM1-201) untersucht, welche aus acht Exonen besteht. Diese umfassen zusammen 6846 Basenpaare, die sich über einen genomischen Bereich von 408.540 Bp verteilen. Die verschiedenen Transkriptvarianten, insbesondere die fünf proteincodierenden Transkripte sind in Abbildung 1 dargestellt.

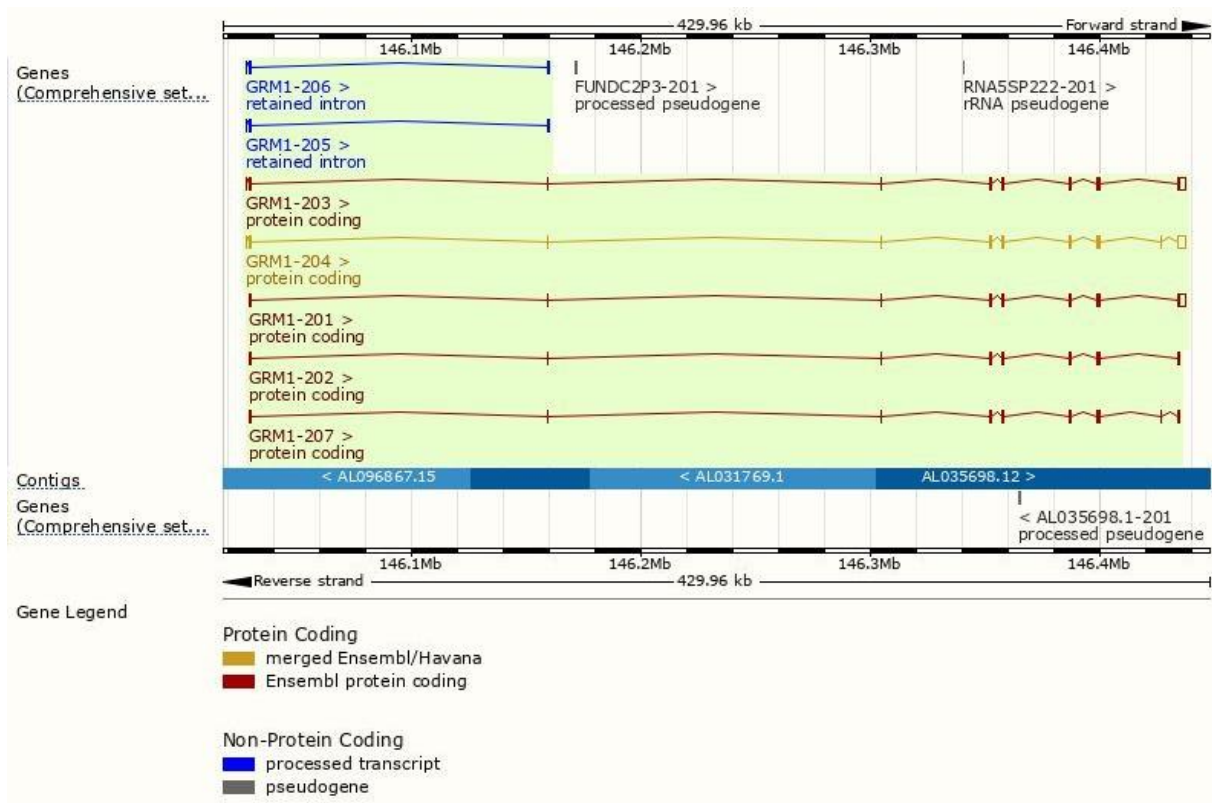
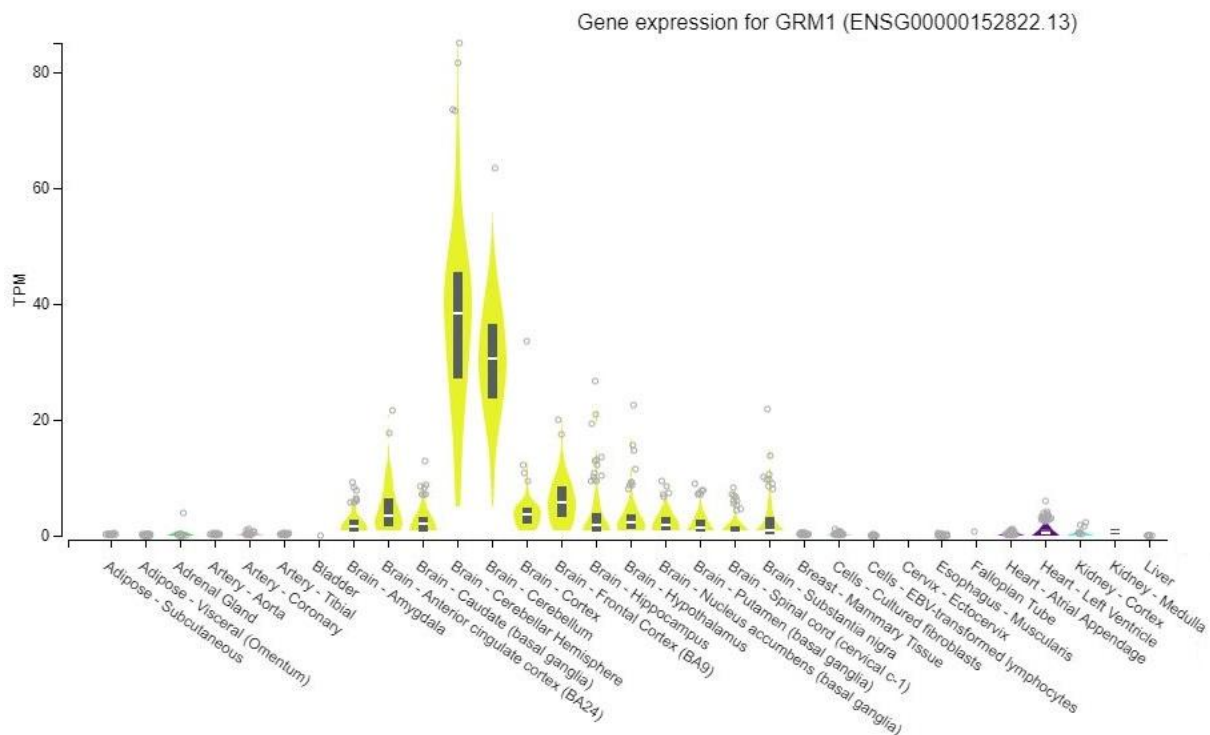


Abbildung 1: *GRM1*-Transkriptvarianten nach ensembl.org  
 ([https://jan2020.archive.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000152822;r=6:146027646-146437601](https://jan2020.archive.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000152822;r=6:146027646-146437601), zuletzt abgerufen am 15.09.2021)

*GRM1* (Glutamate metabotropic receptor 1) codiert für mGluR1, einen metabotropen Glutamatrezeptor, mit starker Expression im ZNS, insbesondere im Cerebellum (siehe Abbildung 2).



**Abbildung 2: GRM1-Genexpression in verschiedenen Geweben, modifiziert nach GTEx Portal (<https://www.gtexportal.org/home/gene/GRM1>, zuletzt abgerufen 15.09.2021)**

Glutamatrezeptoren, wie mGluR1, werden vom häufigsten im Gehirn vorkommenden exzitatorischen Neurotransmitter, Glutamat, aktiviert. Zu unterscheiden sind die ionotropen Glutamatrezeptoren (iGluR), ligandengesteuerte Ionenkanäle von den metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluR). Bei letzteren handelt es sich um G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die ihre Wirkung auf einem langsameren und komplexeren Weg entfalten. Basierend auf dem Second Messenger, der Sequenzhomologie und pharmakologischen Eigenschaften werden die metabotropen Glutamatrezeptoren in drei Gruppen eingeteilt:

- Gruppe 1: Gq-gekoppelt - mGluR1, mGluR5
- Gruppe 2: Gi-gekoppelt - mGluR2, mGluR3
- Gruppe 3: Gi-gekoppelt - mGluR4, mGluR6, mGluR7, mGluR8

Gruppe 2 und 3 führen über die Inhibierung der Adenylatcyclase zu geringeren cAMP-Spiegeln und infolgedessen zur Inaktivierung der Proteinkinase A. Die Rezeptoren der Gruppe 1, der auch mGluR1 angehört, führen bei Ligandenbindung über Aktivierung der Phospholipase C zur Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) zu Inositoltriphosphat (IP3) und Diacylglycerin (DAG). Durch diese beiden Second

Messenger vermittelt steigt der intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel und die Proteinkinase C wird aktiviert. (Suh et al. 2018; Scheefhals und MacGillavry 2018; Watson et al. 2017)

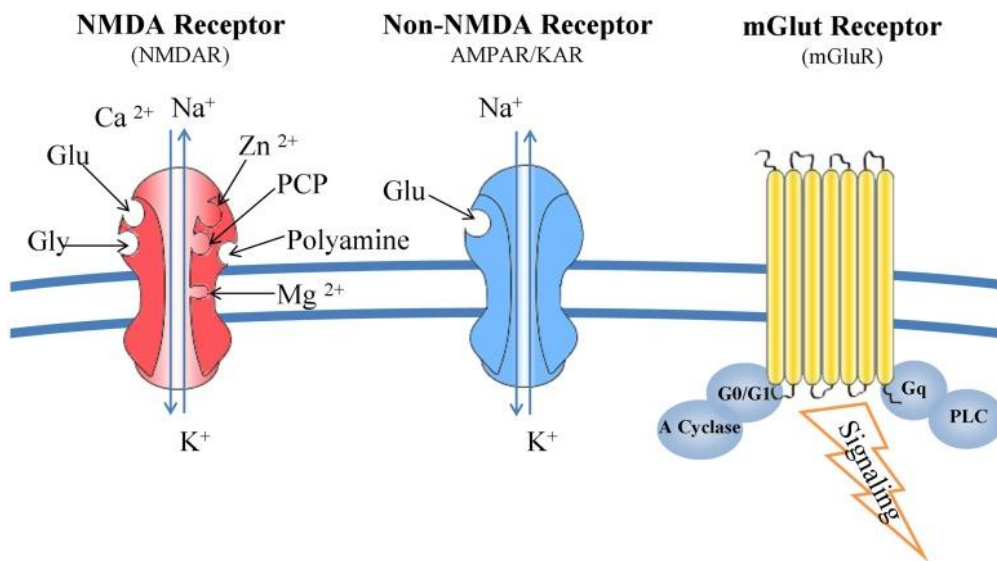


Abbildung 3: Struktur der Glutamaterezeptoren - links und in der Mitte sind ionotrope Glutamaterezeptoren abgebildet, die bei Öffnung entsprechende Ionenströme ermöglichen, rechts im Bild ein metabotroper Glutamaterezeptor mit intrazellulärer G-Protein-Kopplung. Quelle: (Kritis et al. 2015), abgerufen 15.12.2020

mGluR1 kommen vor allem in der postsynaptischen Region der Purkinje-Zellen vor. Die Funktionen mit Beteiligung und die Folgen bei Schädigung des Rezeptors oder der folgenden Signalkaskade können vielfältig sein. Es konnte gezeigt werden, dass paraneoplastisch gebildete Antikörper gegen mGluR1 zu cerebellärer Ataxie führen können (Sillevis Smitt et al. 2000). Weiterhin wird metabotropen Glutamaterezeptoren eine mögliche antiapoptotische Funktion in Neuronen (Copani et al. 1995) und eine Rolle in der neuronalen Plastizität (Kano et al. 2008; Meera et al. 2016) zugesprochen. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren weisen sieben Transmembrandomänen auf, die im Fall von mGluR1 alle von Exon 7 codiert werden (siehe Abbildung 4).

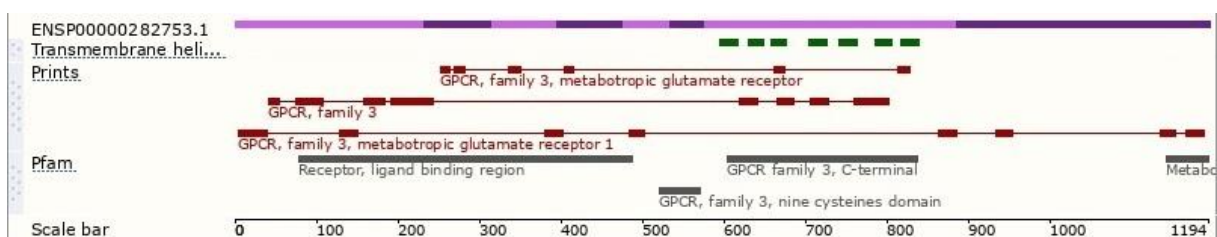


Abbildung 4: mGluR1 - Domänen, modifiziert nach ensembl.org ([https://jan2020.archive.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSG00000152822;r=6:146027646-146437601;t=ENST00000282753](https://jan2020.archive.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSG00000152822;r=6:146027646-146437601;t=ENST00000282753), zuletzt abgerufen am 15.09.2021)

Veränderungen in *GRM1* konnten 2012 erstmals mit dem Krankheitsbild einer Ataxie assoziiert werden. Guerguelcheva et al. beschrieben 2012 mehrere bulgarische

Familien mit autosomal rezessiv vererbter Ataxie. Als Ursache konnten homozygote Veränderungen im *GRM1*-Gen identifiziert werden, das Krankheitsbild wurde als autosomal rezessive spinocerebelläre Ataxie 13 (SCAR13) bezeichnet. (Guerguelcheva et al. 2012)

2017 haben Watson et al. drei Familien mit autosomal dominanten Mutationen im selben Gen beschrieben. Die daraus resultierende cerebelläre Ataxie, spinocerebelläre Ataxie Typ 44 (SCA44) ist zentraler Gegenstand dieser Arbeit.

Bei Familie 1 und 2 zeigten Familienmitglieder über drei Generationen Symptome im Erwachsenenalter, zwischen dem 20. und 50. Lebensjahr, in Form einer zerebellären Ataxie und eine, auf eine Rückenmarksbeteiligung zurückzuführende, Spastik. Im MRT konnte bei den betroffenen Familienmitgliedern eine Kleinhirnatrophie dargestellt werden, bei Familie 1 war zusätzlich eine leichte Abflachung des Pons zu beobachten. Molekulargenetisch wurde bei Familie 1 die missense Variante c.2375A>G (p.Tyr792Cys) und bei Familie 2 die missense Variante c.785A>G (p.Tyr262Cys) nachgewiesen. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Mutationen in einem gain-of-function mit übermäßiger mGluR1-Aktivität resultieren, was einen exzitotoxischen Effekt insbesondere auf die Purkinjezellen haben könnte. (Watson et al. 2017)

Wie Abbildung 5 zeigt betreffen die beiden missense Mutationen unter Säugetieren hochkonservierte Aminosäuren und der Austausch wird von PROVEAN als potentiell schädlich angegeben. Dies legt eine evolutionär erhaltene hohe Relevanz für Struktur und Funktion des Proteins nahe.

<table border="0"> <tr><td>UniProt identifiers</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Q13255</td><td>Homo sapiens</td><td>235 NYGESGMDAFKELAAQEGLCIAHSDKI</td></tr> <tr><td>A0A2J8PS75</td><td>Pan troglodytes</td><td>235 NYGESGMDAFKELAAQEGLCIAHSDKI</td></tr> <tr><td>I2CU04</td><td>Macaca mulatta</td><td>235 NYGESGMDAFKELAAQEGLCIAHSDKI</td></tr> <tr><td>F7C3M0</td><td>Equus caballus</td><td>235 NYGESGMDAFKELAAQEGLCIAHSDKI</td></tr> <tr><td>F1NBM2</td><td>Gallus gallus</td><td>227 NYGESGMEAFKELAAQEGLCIAHSDKI</td></tr> <tr><td>E23385</td><td>Rattus norvegicus</td><td>235 NYGESGMDAFKELAAQEGLCIAHSDKI</td></tr> <tr><td>P97772</td><td>Mus musculus</td><td>235 NYGESGMDAFKELAAQEGLCIAHSDKI</td></tr> <tr><td>H0ZKH5</td><td>Taeniopygia guttata</td><td>235 NYGESGMEAFKELAAQEGLCIAHSDKI</td></tr> <tr><td>A0A5G8KW64</td><td>Xenopus tropicalis</td><td>233 NYGESGMEAFKELAAQEGLCIAHSDKI</td></tr> <tr><td>P91685</td><td>Drosophila melanogaster</td><td>228 SYGEYGIKALHKEATERNVCIKVAEKV</td></tr> </table>	UniProt identifiers			Q13255	Homo sapiens	235 NYGESGMDAFKELAAQEGLCIAHSDKI	A0A2J8PS75	Pan troglodytes	235 NYGESGMDAFKELAAQEGLCIAHSDKI	I2CU04	Macaca mulatta	235 NYGESGMDAFKELAAQEGLCIAHSDKI	F7C3M0	Equus caballus	235 NYGESGMDAFKELAAQEGLCIAHSDKI	F1NBM2	Gallus gallus	227 NYGESGMEAFKELAAQEGLCIAHSDKI	E23385	Rattus norvegicus	235 NYGESGMDAFKELAAQEGLCIAHSDKI	P97772	Mus musculus	235 NYGESGMDAFKELAAQEGLCIAHSDKI	H0ZKH5	Taeniopygia guttata	235 NYGESGMEAFKELAAQEGLCIAHSDKI	A0A5G8KW64	Xenopus tropicalis	233 NYGESGMEAFKELAAQEGLCIAHSDKI	P91685	Drosophila melanogaster	228 SYGEYGIKALHKEATERNVCIKVAEKV	<table border="0"> <tr><td>UniProt identifiers</td><td></td><td></td></tr> <tr><td>Q13255</td><td>Homo sapiens</td><td>780 FNEAKYIAFTMTTCIIWLAFVPIY</td></tr> <tr><td>A0A2J8PS75</td><td>Pan troglodytes</td><td>780 FNEAKYIAFTMTTCIIWLAFVPIY</td></tr> <tr><td>I2CU04</td><td>Macaca mulatta</td><td>780 FNEAKYIAFTMTTCIIWLAFVPIY</td></tr> <tr><td>F7C3M0</td><td>Equus caballus</td><td>780 FNEAKYIAFTMTTCIIWLAFVPIY</td></tr> <tr><td>F1NBM2</td><td>Gallus gallus</td><td>772 FNEAKYIAFTMTTCIIWLAFVPIY</td></tr> <tr><td>E23385</td><td>Rattus norvegicus</td><td>780 FNEAKYIAFTMTTCIIWLAFVPIY</td></tr> <tr><td>P97772</td><td>Mus musculus</td><td>780 FNEAKYIAFTMTTCIIWLAFVPIY</td></tr> <tr><td>H0ZKH5</td><td>Taeniopygia guttata</td><td>780 FNEAKYIAFTMTTCIIWLAFVPIY</td></tr> <tr><td>A0A5G8KW64</td><td>Xenopus tropicalis</td><td>778 FNEAKYIAFTMTTCIIWLAFVPIY</td></tr> <tr><td>P91685</td><td>Drosophila melanogaster</td><td>812 FNEKFTGFTMTTCIIWLAFVPIY</td></tr> </table>	UniProt identifiers			Q13255	Homo sapiens	780 FNEAKYIAFTMTTCIIWLAFVPIY	A0A2J8PS75	Pan troglodytes	780 FNEAKYIAFTMTTCIIWLAFVPIY	I2CU04	Macaca mulatta	780 FNEAKYIAFTMTTCIIWLAFVPIY	F7C3M0	Equus caballus	780 FNEAKYIAFTMTTCIIWLAFVPIY	F1NBM2	Gallus gallus	772 FNEAKYIAFTMTTCIIWLAFVPIY	E23385	Rattus norvegicus	780 FNEAKYIAFTMTTCIIWLAFVPIY	P97772	Mus musculus	780 FNEAKYIAFTMTTCIIWLAFVPIY	H0ZKH5	Taeniopygia guttata	780 FNEAKYIAFTMTTCIIWLAFVPIY	A0A5G8KW64	Xenopus tropicalis	778 FNEAKYIAFTMTTCIIWLAFVPIY	P91685	Drosophila melanogaster	812 FNEKFTGFTMTTCIIWLAFVPIY
UniProt identifiers																																																																			
Q13255	Homo sapiens	235 NYGESGMDAFKELAAQEGLCIAHSDKI																																																																	
A0A2J8PS75	Pan troglodytes	235 NYGESGMDAFKELAAQEGLCIAHSDKI																																																																	
I2CU04	Macaca mulatta	235 NYGESGMDAFKELAAQEGLCIAHSDKI																																																																	
F7C3M0	Equus caballus	235 NYGESGMDAFKELAAQEGLCIAHSDKI																																																																	
F1NBM2	Gallus gallus	227 NYGESGMEAFKELAAQEGLCIAHSDKI																																																																	
E23385	Rattus norvegicus	235 NYGESGMDAFKELAAQEGLCIAHSDKI																																																																	
P97772	Mus musculus	235 NYGESGMDAFKELAAQEGLCIAHSDKI																																																																	
H0ZKH5	Taeniopygia guttata	235 NYGESGMEAFKELAAQEGLCIAHSDKI																																																																	
A0A5G8KW64	Xenopus tropicalis	233 NYGESGMEAFKELAAQEGLCIAHSDKI																																																																	
P91685	Drosophila melanogaster	228 SYGEYGIKALHKEATERNVCIKVAEKV																																																																	
UniProt identifiers																																																																			
Q13255	Homo sapiens	780 FNEAKYIAFTMTTCIIWLAFVPIY																																																																	
A0A2J8PS75	Pan troglodytes	780 FNEAKYIAFTMTTCIIWLAFVPIY																																																																	
I2CU04	Macaca mulatta	780 FNEAKYIAFTMTTCIIWLAFVPIY																																																																	
F7C3M0	Equus caballus	780 FNEAKYIAFTMTTCIIWLAFVPIY																																																																	
F1NBM2	Gallus gallus	772 FNEAKYIAFTMTTCIIWLAFVPIY																																																																	
E23385	Rattus norvegicus	780 FNEAKYIAFTMTTCIIWLAFVPIY																																																																	
P97772	Mus musculus	780 FNEAKYIAFTMTTCIIWLAFVPIY																																																																	
H0ZKH5	Taeniopygia guttata	780 FNEAKYIAFTMTTCIIWLAFVPIY																																																																	
A0A5G8KW64	Xenopus tropicalis	778 FNEAKYIAFTMTTCIIWLAFVPIY																																																																	
P91685	Drosophila melanogaster	812 FNEKFTGFTMTTCIIWLAFVPIY																																																																	

Abbildung 5 Ausschnitt des Aminosäure-Sequenzalignments der mGluR1-Sequenz um die hochkonservierte Position 262 (rot markiert) und Position 792 (blau markiert); Sequenzen aus UniProt.org

In einer dritten Familie wurde bei einem 5-Jährigen Mädchen mit frühem Krankheitsbeginn eine heterozygote Neumutation nachgewiesen. Das Mädchen begann erst im Alter von 21 Monaten mit ataktischem Gangbild zu laufen. Zusätzlich wies sie, anders als die Betroffenen der Familien 1 und 2, kognitive Einschränkungen auf, die sich in verzögerter Sprachentwicklung und Lernschwäche äußerten. Aufgrund der de

novo Mutation c.3165dupA entsteht, wie mittels in-vitro Versuchen gezeigt werden konnte, ein verkürztes Protein mit eingeschränkter Funktionalität.

Für die Behandlung von SCA44 gibt es derzeit keine zugelassenen kausalen Therapien, jedoch konnte ein negativ allosterisch modulierender Effekt des Antiparasitikums Nitazoxanid auf mGluR1 in Studien belegt und somit die Anwendbarkeit bei mGluR1-gain-of-function-Mutationen nahegelegt werden. (Watson et al. 2017)

### **1.3 Zielsetzung dieser Arbeit**

Aufgrund der geringen Datenlage sind Aussagen über die Häufigkeit und die diagnostische Relevanz der SCA44 aktuell schwer zu treffen. In dieser Arbeit wird untersucht, ob in einem Kollektiv aus 66 SCA-Patienten mit zuvor ausgeschlossenen Vorliegen häufiger SCA-Subtypen pathogene Mutationen im *GRM1*-Gen zu finden sind. Die erhobenen Daten sollen dabei helfen, die Häufigkeit der SCA44 besser einschätzen zu können, neue Mutationen zu identifizieren und auf dieser Grundlage eine Empfehlung zur Testung und gegebenenfalls Einbettung in eine Paneluntersuchung bei Ataxiepatienten mit bislang ungeklärter Genese zu treffen.

## 2 Material & Methoden

### 2.1 Material

Tabelle 3: Geräte & Gebrauchsgegenstände

Geräte & Gebrauchsgegenstände	Typ	Hersteller
Zentrifuge	Multifuge 3 L-R	Heraeus, Hanau
	Biofugepico	Heraeus, Hanau
	GalaxyMinistar, Mikrozentrifuge	VWR International, Radnor, USA
Eiszubereiter	RF0244A	Manitowoc, Wisconsin, USA
Thermocycler	TProfessional Basic	Analytik Jena AG, Jena
Vortex	RS1	IDL, Nidderau
Elektrophoresenetzteil	2297 Macrodrive 5	LKB Bromma
Elektrophoresekammer	PerfectBlue Mini S	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Profilformer	12 Well; 1,5mm	PEQLAB Biotechnologie GmbH
Gelschlitten		Keutz, Reiskirchen
Fotokammer		INTAS, Göttingen
Becherglas	250ml	Technische Glaswerke Ilmenau
Waage	PG5002-S Deltarange	Mettler Toledo, Ohio, USA
Mikrowellenherd	R-6000E	Sharp, Sakai-ku, Japan
Sequenzier	SeqStudio Genetic Analyzer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Spektralphotometer	NanoPhotometer NP80	Implen GmbH, München
Pipette	2,5µl	Eppendorf AG, Hamburg
	10µl	Eppendorf AG, Hamburg
	20µl	Eppendorf AG, Hamburg
	100µl	Eppendorf AG, Hamburg
	1000µl	Eppendorf AG, Hamburg

**Tabelle 4: Verbrauchsartikel**

<b>Verbrauchsartikel</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller</b>
Pipettenspitze	2,5µl Filter Tips	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
	10 µl Filter Tips	Nerbe plus GmbH & Co. KG, Winsen
	100 µl Filter Tips	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
	100 µl	Eppendorf AG, Hamburg
	1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Mikroreaktionsgefäß	Multiply-µStrip Pro 8er Kette, 0,2µl	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
	Micro tube 1,5ml DNA LowBind	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Mikrotiterplatte	96 Fast PCR-Platte Vollrand	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
	Microtest Plate 96-Well Round Bottom	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht
Filterplatten	MultiScreen-HV, 0,45µm, transparent, nicht steril	Merck, Darmstadt, Deutschland
Optische Mikrotiterplatte	Optical 96-Well Reaction Plate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Mikrotiterplatte Deckel	96-well Septa	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

**Tabelle 5: Chemikalien, Puffer und Lösungen**

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
PCR Puffer 10x	Qiagen, Hilden
Nukleotid Mix (1,25 µM each)	Promega, Madison, USA
Taq-Polymerase	Qiagen, Hilden
Q-Solution/Betain	Qiagen, Hilden
Nukleasefreies Wasser	Qiagen, Hilden
Big DyePuffer 5x	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sephadex G50	GE Healthcare Bio-Sciences Corp., New Jersey, USA

Agarose Basic	AppliChem GmbH, Darmstadt
Midori Green advance	NIPPON Genetics EUROPE GmbH, Düren, Deutschland
1x TBE-Puffer	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Hi-Di Formamide	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

**Tabelle 6: Größenstandard**

Größenstandard	Hersteller
100 bp DNA Ladder H3 RTU (100-3000 bp)	NIPPON Genetics EUROPE GmbH, Düren, Deutschland

**Tabelle 7: Kits und Enzyme**

Kit/Enzym	Hersteller
ExoSAP-IT	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden
SuperScript III First-Strand Synthesis System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

**Tabelle 8: GRM1-Primer**

Primer	Sequenz	Tm	Hersteller
<b>Exon 1</b>	Ex1F 5'-GGCACCCTCCGGGAGAG-3'	62,9°C	Microsynth AG, Balgach, Schweiz
	Ex1R 5'-GGTAAACTCCGTTCCCCACAG-3'	63,2°C	
<b>Exon 2</b>	Ex2F 5'-GCAAGTCCGTTCTCTCCATTC-3'	61,2°C	Microsynth AG, Balgach, Schweiz
	Ex2R 5'-GCACATCTCTCCCACTTTGG-3'	60,5°C	
<b>Exon 3</b>	Ex3F 5'-GCTGGCTTAAAATAGTCTGTAG-3'	51,0°C	Integrated DNA technologies, IDT, Coralville, USA
	Ex3R 5'-CAGATTGCCATGAATCCCTG-3'	53,7°C	
<b>Exon 4</b>	Ex4F 5'-CAAAGCTTGCACAGGTGG-3'	56,3°C	Microsynth AG, Balgach, Schweiz
	Ex4R 5'-AGTTGTATCTATCCTCATGGCAC-3'	60,9°C	
<b>Exon 5</b>	Ex5F 5'-CAGAGGAAACATAAGAAATAAGC-3'	57,6°C	Microsynth AG, Balgach, Schweiz
	Ex5R 5'-CAAACTGTAAGCCTGGCA-3'	55,0°C	
<b>Exon 6</b>	Ex6F 5'-CATAATCTGAAAACAAATCCTCA-3'	55,6°C	Microsynth AG, Balgach, Schweiz
	Ex6R 5'-TGAGGTTTATGTATACTCCTTG-3'	56,4°C	

<b>Exon 7</b>	Ex7F	5'-TGCTGTAAATCATGAAGGATGC-3'	58,4°C	Microsynth AG, Balgach, Schweiz
	Ex7F2	5'-CCTATGCCCATCTGTCC-3'	56,3°C	
	Ex7R	5'-GAAAAGAGAGACAAACAGGTCAGA-3'	62,0°C	
<b>Exon 8</b>	Ex8F	5'-TTTGTAAGAGGAGGTATGGG-3'	51,1°C	Integrated DNA technologies, IDT, Coralville, USA
	Ex8F1	5'-CAGCAGCAGCAACCCCT-3'	61,3°C	
	Ex8R	5'-CTGTTTGCACATCTCTGGAG-3'	53,5°C	
<b>cDNA</b>	cEx6F	5'-GAAAGGAGAAGTGAGCTGCTG-3'	61,2°C	Microsynth AG, Balgach, Schweiz
	cEx7R	5'-TGGCAATGAGAGTGAATGGG-3'	58,4°C	

**Tabelle 9: Software und Datenbanken**

### Software und Datenbanken

Seqscape 3.0	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
ClinVar	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/</a>
dbSNP	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/</a>
ensemble.org (Release 99, Januar 2020)	<a href="http://www.ensembl.org">http://www.ensembl.org</a>
Consensus Coding Sequence Project CCDS	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/CCDS">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/CCDS</a>
UniProtKB	<a href="https://www.uniprot.org/">https://www.uniprot.org/</a>
PROVEAN	<a href="http://provean.jcvi.org/">http://provean.jcvi.org/</a>
Human Splicing Finder	<a href="http://umd.be/hsf3">http://umd.be/hsf3</a>

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Patientenkollektiv

Untersucht wurden DNA-Proben von 66 Patienten, welche Symptome vereinbar mit einer Spinocerebellären Ataxie (Ataxie, Augenbewegungsstörung, Dysarthrie) und zu Teilen auch MRT-gestützt nachweisbare Kleinhirnatrophie präsentierten und zugleich eine positive Familienanamnese für Bewegungsstörungen aufwiesen. Neben Fällen mit vermutetem autosomal-dominantem Erbgang wurden auch Patienten eingeschlossen, bei denen ein Elternteil früh verstorben war und somit ein Ausschluss erblicher Ursache nicht möglich war. Sporadisch aufgetretene sowie vermutlich Toxin-induzierte Fälle (Alkohol, Medikamente) wurden aufgrund des mangelnden Verdachts genetischer Ursache in dieser Arbeit nicht untersucht.

Im Vorfeld wurden die Patienten auf die Trinkuleotid-Expansions-Erkrankungen SCA 1, 2, 3, 6, 7, 17 sowie auf Punktmutationen in mit SCA 11, 13, 14, 19, 23, 28, 34, 38, 46

assoziierten Genen und im *mtATP6-Gen*, welches mit keinem SCA-Locus verknüpft ist, negativ getestet.

### **2.2.2 DNA-Extraktion mit QIAamp DNA Blood Mini Kit**

Das Verfahren besteht gemäß den Angaben des Herstellers aus mehreren Schritten.

In einem 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß werden zu 20 µl Proteinase K zunächst 200 µl des Probenmaterials sowie 200 µl Lysepuffer gegeben und der Ansatz anschließend für 15 Sekunden auf dem Vortex gemischt. Nach zehn minütiger Inkubation bei 56°C wird das Mikroreaktionsgefäß kurz zentrifugiert, anschließend 200 µl Ethanol zugegeben, erneut für 15 Sekunden auf dem Vortex gemischt und nochmals kurz zentrifugiert.

Der Ansatz wird auf einen QIAamp-Säulenfilter übertragen und in einem 2ml Auffangröhrchen stehend für eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Der Säulenfilter wird sodann entnommen und in ein frisches Auffangröhrchen gestellt. Nach Zugabe von 500 µl Waschpuffer 1 (Buffer AW1, Bestandteil des Kits) wird erneut für eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert und der Säulenfilter abermals in ein frisches Auffangröhrchen gestellt. Hier werden nun 500 µl Waschpuffer 2 (Buffer AW2, Bestandteil des Kits) zugegeben und für drei Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Um die Chance eines Übertrags von Waschpuffer zu reduzieren, wird der Säulenfilter in einem weiteren Auffangröhrchen erneut für eine Minute bei 14000 rpm zentrifugiert. Anschließend wird auf den Säulenfilter, in einem 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß stehend, 200 µl Elutionspuffer (Buffer AE, Bestandteil des Kits) gegeben, eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert.

### **2.2.3 DNA-Konzentrationsbestimmung**

Zur Bestimmung der Konzentration extrahierter DNA stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten DNA-Proben erfolgte sie mittels photometrischer Extinktionsmessung am NanoPhotometer.

Licht bekannter Wellenlänge passiert eine Strecke  $d$  durch die zu messende Substanz und wird auf der gegenüberliegenden Seite detektiert. Dabei wird ein Teil des Lichts abhängig von Art und Konzentration der Substanz absorbiert. Den Zusammenhang von Extinktion  $E$ , Messstrecke  $d$ , substanzabhängigem Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  und Konzentration der absorbierenden Substanz stellt das Lambert-Beer'sche Gesetz dar:

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d$$

Über die im NanoPhotometer gemessene Extinktion kann, bei bekannter Messstrecke und Extinktionskoeffizient mittels Lambert-Beer'schem Gesetz, die Konzentration berechnet werden. Eine Extinktion oder optische Dichte (OD) von 1 entsprechen hierbei 50 µg dsDNA pro ml. (Mülhardt 2013; Jansohn und Rothhämel 2012)

Die verwendeten DNA-Proben wurden nach obigem Verfahren aus EDTA-Blut extrahiert und ihre Konzentration wie beschrieben bestimmt.

## **2.2.4 cDNA-Synthese**

### **2.2.4.1 Prinzip der cDNA-Synthese**

Complementary DNA (cDNA) ist eine einzelsträngige DNA, welche in ihrer Basenabfolge komplementär zu einem RNA-Molekül ist. Um sie zu synthetisieren, werden RNA, im vorliegenden Fall wurde Gesamt-RNA verwendet, und Primer zunächst auf 70°C erhitzt und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Während das Erhitzen der RNA für deren Denaturierung sorgt, ermöglicht das anschließende Abkühlen die Anlagerung der Primer an die RNA. Als Primer kommen hierbei random Primer zum Einsatz. Es handelt sich dabei um ein Gemisch aus verschiedenen Oligonukleotiden, meist Hexamere, die an einer Vielzahl von Stellen an der RNA binden können und so dafür sorgen, dass die von ihnen ausgehend synthetisierten Fragmente sämtliche Bereiche der mRNA komplementär in der cDNA abdecken.

Dem Ansatz werden nun eine Reverse Transkriptase, die RNA-abhängig DNA synthetisiert, ein Puffer sowie ein RNase-Inhibitor zum Schutz vor RNA-Degradierung zugegeben und für eine Stunde bei 37-42°C inkubiert. (Mülhardt 2013)

### **2.2.4.2 Umschreiben von Gesamt-RNA in cDNA**

In der vorliegenden Arbeit wurden die Bedingungen den Angaben des Herstellers der reversen Transkriptase entsprechend angepasst.

**Tabelle 10: Mastermix 1 der cDNA-Synthese für 6 Proben**

#### **Mastermix 1 der cDNA-Synthese für 6 Proben**

60 µl	Nuklease-freies Wasser
6 µl	dNTP (10 mM each)
6 µl	Random Primers (50 ng/µl)

Je 12 µl Mastermix 1 und 1 µl RNA wurden im Thermocycler fünf Minuten auf 65°C erhitzt und anschließend auf 4°C abgekühlt.

Es folgt die Zugabe von je 7 µl des Mastermix 2, bevor der Ansatz im Thermocycler 10 Minuten auf 25°C inkubiert wird, um anschließend für 50 Minuten bei 50°C, der optimalen Reaktionstemperatur der verwendeten reversen Transkriptase, zu reagieren. Die Reaktion wird durch 5-minütiges Erhitzen auf 85°C gestoppt und der Ansatz anschließend auf 4°C abgekühlt.

**Tabelle 11: Mastermix 2 der cDNA-Synthese für 6 Proben**

**Mastermix 2 der cDNA-Synthese für 6 Proben**

24 µl	5x First-Strand Buffer
6 µl	0,1 M DTT
6 µl	RNase out
6 µl	SuperScript III (200 U/µl)

## **2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

### **2.2.5.1 Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion**

Die PCR (Polymerase Chain Reaction) als Methode zur Vervielfältigung von DNA aus unterschiedlichen biologischen Materialien dient der Amplifikation gezielter Nukleinsäureabschnitte, um sie so weiteren Untersuchungen zugänglich zu machen. Die 1983 von Mullis, Saiki und Kollegen entwickelte Methode gliedert sich in die drei Teilschritte: Denaturierung, Annealing und Elongation, welche zwecks exponentieller Vermehrung zyklisch wiederholt werden. (Saiki et al. 1985)

Um die DNA von ihrer Doppelhelixstruktur in separate Einzelstränge zu überführen, wird sie auf 94-95°C erhitzt. Auf diese Weise brechen Wasserstoffbrückenbindungen und andere intermolekulare Kräfte, welche die DNA in ihrer Doppelhelixstruktur stabilisieren, werden überwunden. Dieser als *Denaturierung* bezeichnete Prozess erfolgt initial einmalig für 3 Minuten, während im Rahmen der zyklischen Wiederholungen bereits eine Dauer von 30 Sekunden ausreichend ist.

An die Einzelstränge lagern sich nun die Primer an, das sind synthetisierte Oligonukleotide, welche den zu amplifizierenden Bereich begrenzen. Dieser Prozess

wird *Annealing* genannt und erfolgt abhängig von der Primersequenz bei unterschiedlichen Temperaturen im Bereich von 50-60°C.

Im dritten Schritt, der *Elongation*, werden an die Oligonukleotidsequenz des Primers in 5'-3' Richtung weitere Desoxynukleotide komplementär zur Matrize angehängt. Beim Temperaturoptimum der thermostabilen Taq-Polymerase von 72°C verlängert diese den Strang um etwa 1000 bp pro Minute. Die Dauer der Elongation richtet sich nach der Länge der zu amplifizierenden Sequenz und der verwendeten Polymerase. (Saiki et al. 1988)

Es schließen sich nun weitere Zyklen aus Denaturierung, Annealing und Elongation an, in denen die jeweils neu synthetisierten DNA-Stränge ebenfalls als Matrize dienen, bis insgesamt 25-30 Zyklen durchlaufen sind.

Zuletzt erfolgt ein finaler Extensionsschritt bei 72°C für 5-15 Minuten, welcher dazu dienen soll, inkomplett synthetisierte DNA Stränge fertigzustellen. (Müller 2016; Lodish et al. 2016)

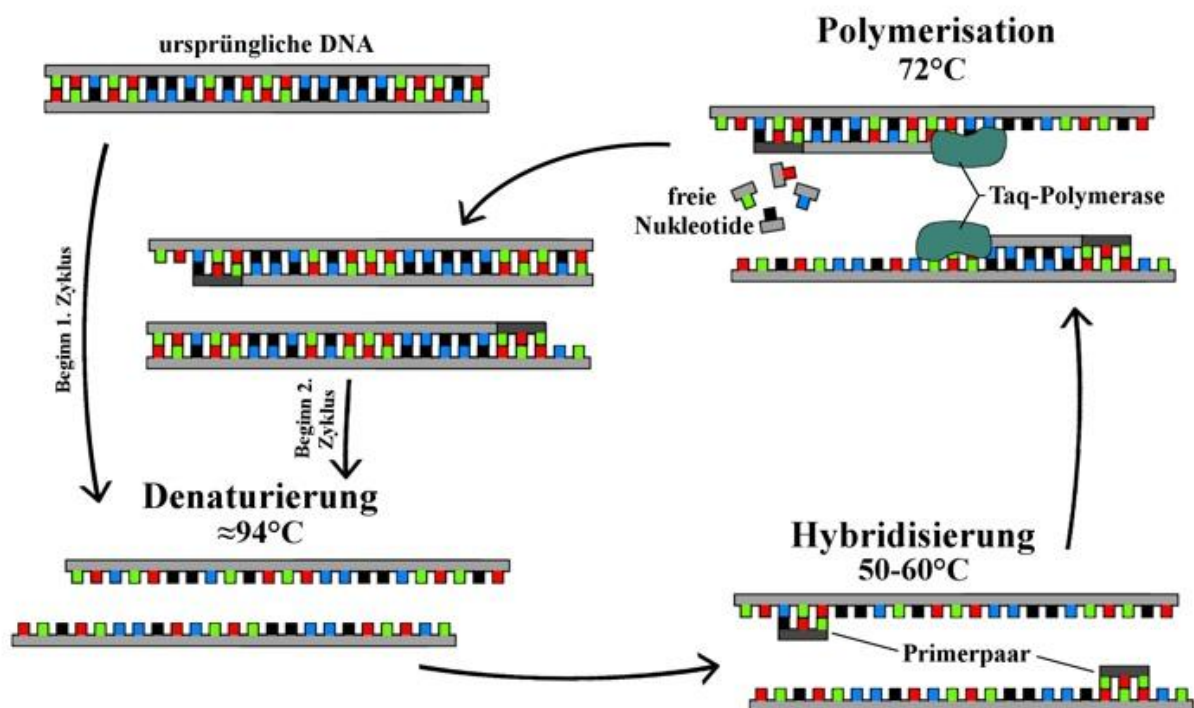


Abbildung 6: Schematische Darstellung der PCR (Ewers 25.08.2016)

### 2.2.5.2 Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion

*GRM1*, das in dieser Arbeit untersuchte Gen, besteht aus acht Exonen. Die für die jeweiligen Exone verwendeten Mastermixe sind in Tabelle 12 und Tabelle 13, die PCR-Grundbedingungen in Tabelle 14 und exonspezifische Annealingtemperaturen, Elongationszeiten sowie die PCR-Produktlängen in Tabelle 15 dargestellt.

**Tabelle 12: Mastermix *GRM1*-PCR Exon 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, cDNA**

#### **Mastermix PCR-Ansatz für 5 Proben für Exon 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, cDNA**

12,5 µl	PCR Puffer 10x
1,0 µl	Primer F (50 pM/µl)
1,0 µl	Primer R (50 pM/µl)
2,5 µl	Nukleotidmix je 1,25 µM
2,0 µl	Qiagen-Taq
12,5 µl	Betain
88,5 µl	H <sub>2</sub> O

**Tabelle 13: Mastermix *GRM1*-PCR Exon 3**

#### **Mastermix PCR-Ansatz für 5 Proben für Exon 3**

12,5 µl	PCR Puffer 10x
1,0 µl	Primer F (50 pM/µl)
1,0 µl	Primer R (50 pM/µl)
2,5 µl	Nukleotidmix je 1,25 µM
2,0 µl	Qiagen-Taq
101 µl	H <sub>2</sub> O

**Tabelle 14: PCR-Grundbedingungen**

Initiale Denaturierung	95°C	3 min	
Denaturierung	94°C	30 sec	} 35 Zyklen
Annealing	58°C	30 sec	
Elongation	72°C	30 sec	
Finale Extension	72°C	3 min	

**Tabelle 15: PCR-Spezifikationen**

<b>Exon</b>	1	2	3	4	5	6	7	8	cDNA
<b>Annealingtemperatur</b>	61°C	61°C	52°C	58°C	56°C	54°C	61°C	57°C	59°C
<b>Dauer Elongation</b>	50 sec	50 sec	30 sec	30 sec	30 sec	30 sec	50 sec	45 sec	30s
<b>Länge PCR Produkt</b> (bp)	931	490	537	511	453	366	1076	1147	341

Je 1 µl der DNA-Proben wurden mit 24 µl des entsprechenden Mastermixes vermischt und durchliefen die angegebenen Bedingungen im Thermocycler.

## **2.2.6 Agarose-Gelelektrophorese**

### **2.2.6.1 Prinzip der Agarose-Gelelektrophorese**

Bevor das PCR-Produkt zur Sequenzierung aufgereinigt wird, muss noch das Ergebnis der PCR überprüft werden. Hierzu findet die Agarose-Gelelektrophorese Anwendung, welche in ihrer heutigen Form wesentlich auf der Forschung von Arne Tiselius beruht. (Tiselius 1937)

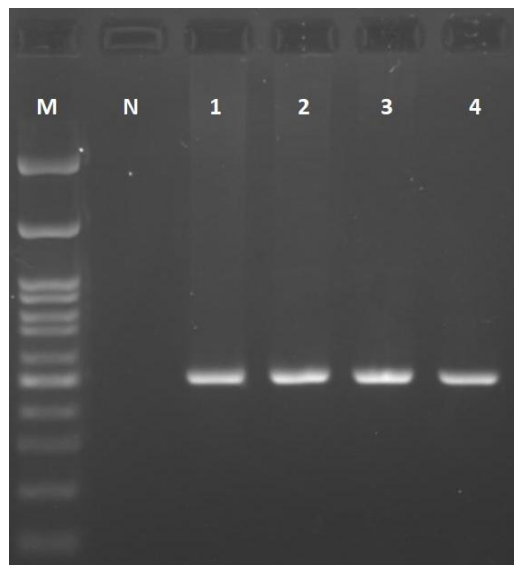
Trägt man DNA auf ein Agarosegel auf und legt eine Spannung an, so wandern die Nukleinsäuremoleküle aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen in Richtung der positiv geladenen Anode. Die Matrix des Agarosegels stellt hierbei ein Hindernis für die Moleküle dar, von dem größere Moleküle stärker betroffen sind und deshalb langsamer wandern als kleinere Moleküle. Für die Größenbestimmung der Fragmente lässt man einen Größenstandard mit bekannten Fragmentgrößen mitlaufen. Agarosegele eignen sich konzentrationsabhängig für den Nachweis und die Auftrennung von Fragmentgrößen zwischen 0,1 und 60 kb. Übliche Agarose-Konzentrationen liegen zwischen 0,8 und 3% (w/v). Um die ansonsten nicht sichtbaren DNA-Banden sehen zu können, muss den Proben oder dem Gel ein Farbstoff beigelegt werden, der sie in der Regel unter UV-Licht sichtbar werden lässt. Begründet ist dies darin, dass diese Substanzen in der DNA interkalieren, durch UV-Licht angeregt werden und in der Folge sichtbares Licht emittieren. (Alberts et al. 2014; Jansohn und Rothhämel 2012)

### **2.2.6.2 Anwendung der Agarose-Gelelektrophorese**

Für die vorliegende Arbeit wurde ein 1,5%-Agarosegel hergestellt. Hierzu wurden in einem Becherglas 0,6 g Agarosepulver in 40 ml 1x TBE gelöst und in der Mikrowelle erhitzt. Als Farbstoff wurde Midori Green Advance verwendet. Von diesem wurden der

Agaroselösung 1,6 µl zugegeben und diese anschließend in einen Gelschlitten gegossen. Mit Profilformern versehen härtete das Gel etwa 30 Minuten aus.

Für die Elektrophorese wurde das Gel in die mit 1x TBE Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. In die vorgeformten Taschen des Gels wurden nun jeweils 5 µl des PCR Produktes versetzt mit Ladepuffer pipettiert. Zudem lief immer ein Größenstandard (MWD100) in einer Tasche mit. Bei einer angelegten Spannung von 100 mA lief die Elektrophorese für ca. 30 Minuten. Anschließend konnte der Erfolg der PCR unter UV-Licht anhand des Vorhandenseins und der Konfiguration der Banden beurteilt und fotografisch festgehalten werden.



**Abbildung 7: Agarose-Gelelektrophorese. Bandendarstellung der PCR-Produkte 1-4 (511bp), PCR-Negativkontrolle N aufgetragen gegen Größenstandard M (100-3000bp)**

### **2.2.7 Aufreinigung der PCR-Produkte**

Vor der Sequenzierreaktion müssen die PCR-Produkte von unverbrauchten Primern und Nukleotiden befreit werden, um sie später lediglich mit dem gewünschten Primer sequenzieren zu können. In der vorliegenden Arbeit erfolgte dieser Schritt der Aufreinigung enzymatisch mittels ExoSAP-IT PCR Product Cleanup von Thermo Fisher Scientific.

ExoSAP-IT PCR Product Cleanup enthält zum einen Exonuklease I, welche einzelsträngige DNA und somit auch die verbliebenen Primer abbaut, zum anderen Shrimp alkalische Phosphatase zum Abbau nicht eingebauter dNTPs.

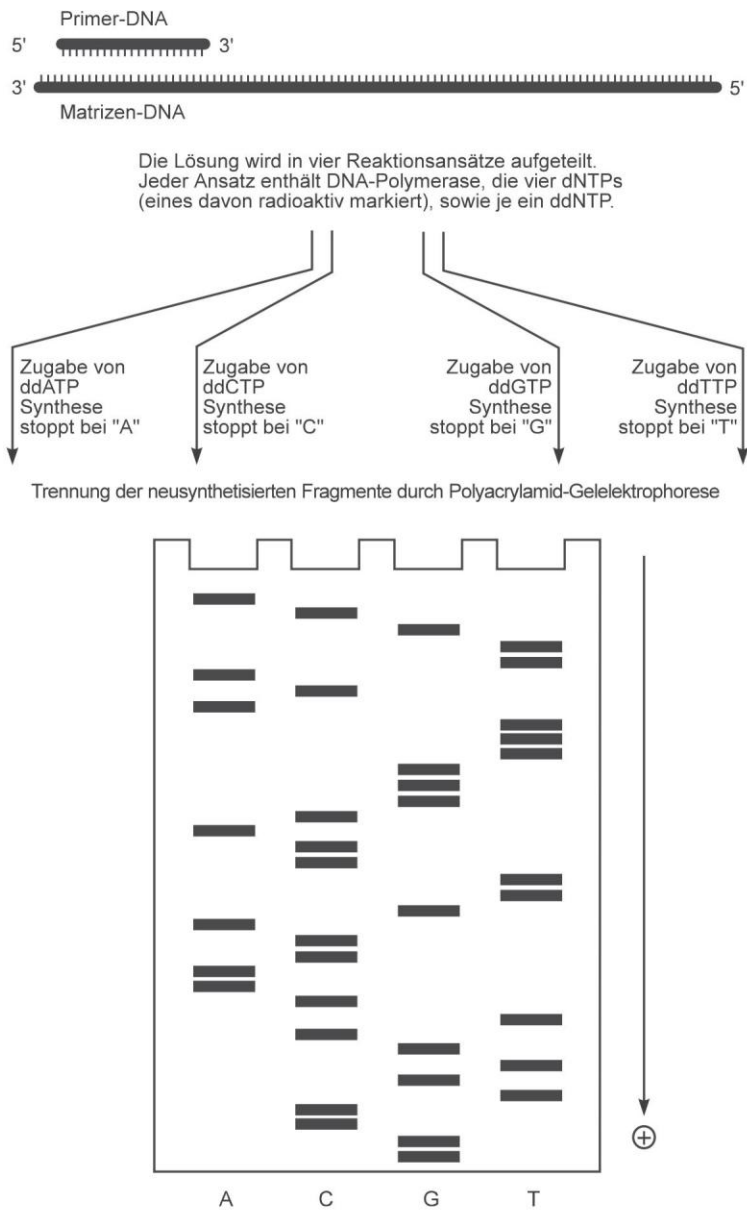
Abhängig von der Stärke der Bande in der Gelelektrophorese wurden 2-4 µl PCR Produkt mit 0,8 µl ExoSAP-IT gemischt und mit Wasser auf ein Volumen von 5µl aufgefüllt. Während 15 minütiger Inkubation bei 37°C im Thermocycler bauen die Enzyme Primer und überzählige Nukleotide ab, um anschließend für 15 Minuten bei 80°C denaturiert und somit inaktiviert zu werden.

## **2.2.8 Sequenzierung**

### **2.2.8.1 Prinzip der Sequenzierung**

Eine häufig verwendete Methode zur Bestimmung der Basenabfolge in DNA-Molekülen ist die 1977 von Sanger, Nicklen und Coulson entwickelte Sanger-Sequenzierung, auch Kettenabbruchmethode genannt. (Sanger et al. 1977)

Bei ihr werden DNA-Moleküle zunächst denaturiert und so in Einzelstränge überführt. Zugegebene Primer, entweder F oder R, lagern sich an diese an und eine DNA-Polymerase beginnt mit der Synthese des komplementären Stranges. Die Besonderheit liegt darin, dass neben dNTPs, den normalen Bausteinen der DNA, zusätzlich Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTPs) in geringer Konzentration im Ansatz enthalten sind. Sie weisen keine 3'-OH-Gruppe auf und führen bei Einbau in die DNA folglich zum Kettenabbruch. Der Einbau eines ddNTPs kann an jeder Stelle des synthetisierten Stranges geschehen, wodurch Kopien in jeder möglichen Länge bis zur vollständigen Replikation des komplementären Stranges entstehen. Legt man vier separate Ansätze, die neben DNA-Matrize, Sequenzierpuffer, Polymerase und dNTPs nur jeweils eines der ddNTPs (A, C, G oder T) enthalten an, so enden alle enthaltenen Fragmente eines Ansatzes auf der entsprechenden Base. Trennt man die Fragmente der vier Ansätze nun nebeneinander mittels Gelelektrophorese auf, so lässt sich die DNA-Sequenz vom Gel ablesen.



Die Sequenz des zur Matrizen-DNA komplementären Stranges läßt sich aus diesem Gel direkt ablesen:

5'...GGCCTGTGCTCAACCAGTTCCACGGTTTACATTGCA...3'

**Abbildung 8: Schematische Darstellung der DNA-Sequenzierung nach Sanger (Jansohn und Rothhämel 2012, S. 590)**

Das Verfahren wurde seit seiner Entwicklung modifiziert und verbessert. Während früher noch radioaktive Isotope zur Markierung verwendet wurden und nur aufgrund der separaten Ansätze zu unterscheiden war, welche die zuletzt eingebaute Base sein musste, verwendet man heute fluoreszenzmarkierte ddNTPs, die sich farblich unterscheiden. Dadurch ist es möglich, die gesamte Sequenzierreaktion in nur einem Ansatz ablaufen zu lassen. (Prober et al. 1987)

Während einer Kapillarelektrophorese regt ein Laser die Fluoreszenzfarbstoffe an, welche von einem Detektionssystem registriert werden und sich als Elektropherogramm darstellen lassen. (Alberts et al. 2014; Jansohn und Rothhämel 2012)

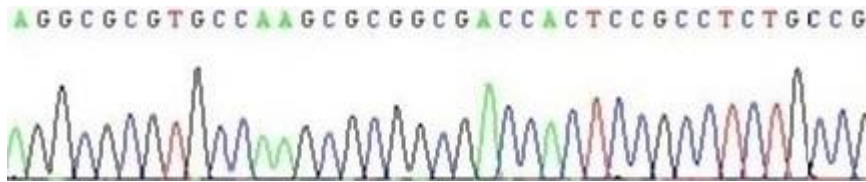


Abbildung 9: Beispielsequenz aus *GRM1* Exon 8, Patient 970

## 2.2.8.2 Anwendung der Sequenzierung

### 2.2.8.2.1 Sequenzierung im Institut für Humangenetik und der Blutbank Gießen

Um die mittels ExoSAP aufgereinigten PCR Produkte (siehe 2.2.7) zu sequenzieren, wurden Sequenzieransätze nach folgendem Schema hergestellt:

Tabelle 16: Sequenzieransatz

1,2 µl	Big Dye Terminator v3.1
1,0 µl	5x Puffer
2,0 µl	H <sub>2</sub> O
1,0 µl	Primer (10pmol/µl)
5,0 µl	ExoSAP-Produkt

Je Ansatz wurde nur ein Primer verwendet, welcher abhängig von der Abdeckung des interessierenden DNA-Bereichs ausgewählt wurde. Teils wurde zur besseren Abdeckung des Exons oder zur Klärung von Auffälligkeiten ein zweiter Ansatz mit einem anderen Primer hergestellt. Die für alle Proben des jeweiligen Exons verwendeten Primer sind Tabelle 17 zu entnehmen.

Tabelle 17: *GRM1*-Sequenzierprimer

Exon	Exon 1	Exon 2	Exon 3	Exon 4	Exon 5	Exon 6	Exon 7	Exon 8	cDNA
Sequenzierprimer	Ex1F	Ex2F	Ex3F	Ex4F	Ex5F	Ex6R	Ex7F + Ex7F2	Ex8F + Ex8F1	cEx6F + cEx7R

Die Sequenzierreaktion erfolgt im PCR Cycler bei folgenden Bedingungen:

**Tabelle 18: Sequenzierbedingungen**

Denaturierung	96°C	1 min	
Denaturierung	96°C	20 sec	} 25 Zyklen
Annealing	55°C	5 sec	
Elongation	60°C	4 min	
Pause	15°C	Pause	

### **2.2.8.2.2 Sequenzierung durch Microsynth SEQLAB, Göttingen**

Für Proben, welche zur Sequenzierung und Sequenzanalyse an Microsynth SEQLAB, Göttingen verschickt wurden, wurden die mittels ExoSap aufgereinigten PCR Produkte zusammen mit 1 µl des entsprechenden Primers, siehe Tabelle 17 und 9 µl H<sub>2</sub>O in markierten 1,5 ml Mikroreaktionsgefäßen verschickt.

### **2.2.8.3 Aufreinigung des Sequenzierproduktes**

Zur Aufreinigung des Sequenzierproduktes kam eine Gel Filtration mit Sephadex zum Einsatz. In die Kavitäten einer 96 Well-Mikrotiterplatte mit Filter wurden jeweils 350 µl gequollenes Sephadex G50 Superfine pipettiert und die Platte, auf einer Auffangschale stehend, für zwei Minuten bei 720 g zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und die Mikrotiterplatte mit den Sephadexsäulen auf eine Elutions-Platte gestellt. Anschließend wurden die Produkte der Sequenzierreaktion mittig auf je eine Sephadexsäule pipettiert und erneut für zwei Minuten bei 720 g zentrifugiert.

Das gequollene Sephadex bildet eine Matrix, in deren Poren kleinere Moleküle effektiver eindringen können und die Gelsäule in der Folge langsamer durchwandern als größere Moleküle. Auf diese Weise ist die Auftrennung und Aufreinigung der unterschiedlichen Moleküle des Sequenzierproduktes möglich.

Das Eluat, in welchem die DNA-Fragmente enthalten sind, wurde anschließend in eine für den Sequenzer geeignete optische 96 Well-Mikrotiterplatte um- und 11 µl Formamid hinzupipettiert. Das Formamid verhindert hierbei die Bildung von Sekundärstrukturen.

#### 2.2.8.4 Sequenzanalyse

Die Sequenzanalyse erfolgte letztlich mittels Kapillarelektrophorese an einer von drei Stellen:

- SeqStudio Genetic Analyzer im Institut der Humangenetik, Gießen
- ABI3130XL Sequencer, Blutbank der Justus-Liebig Universität Gießen
- Microsynth SEQLAB, Göttingen

#### 2.2.8.5 Auswertung und Bioinformatische Analyse von Polymorphismen

Zur Auswertung der Daten wurden diese in das Programm SeqScape eingelesen, welches sie graphisch als Elektropherogramm (siehe Abbildung 9) darstellt und ausgehend von diesem die Basenabfolge rekonstruiert. Die auf diese Weise rekonstruierten DNA-Sequenzen können in SeqScape untereinander sowie mit einer Referenzsequenz verglichen werden. Die Referenzsequenz wurde der Online Datenbank *Ensembl Genome Browser* entnommen. Gewählt wurde hierfür die längste proteinkodierende Transkriptvariante (ENST00000282753.6).

Bei Abweichungen von der Referenzsequenz oder nicht automatisiert auswertbaren Elektropherogrammen nimmt SeqScape eine farbliche Markierung vor. Diese Stellen erfordern ein besonderes Augenmerk, da es sich hierbei um genetische Varianten handeln kann. Findet sich eine genetische Variante, so kann ein Abgleich mit Datenbanken wie Ensembl und dbSNP rasch weitere Informationen liefern. Varianten, die bereits beschrieben wurden, erhalten als Kennzeichnung eine „reference SNP ID number“, kurz rs-Nummer, die dort eingesehen werden kann. Zusätzlich können u.a. populationsgenetische Informationen wie die Minor allele frequency (MAF), welche die Häufigkeit der zweithäufigsten Allelvariante einer Population angibt, sowie Verweise auf Publikationen zur jeweiligen Variante gefunden werden. In einigen bereits weiter untersuchten Fällen finden sich auch Einträge in der Datenbank ClinVar, welche eine Einschätzung der klinischen Relevanz der genetischen Variante vornimmt.

Für Varianten, welche nicht vorbeschrieben sind und denen entsprechend noch keine rs-Nummer zugewiesen wurde, kommen zur Einschätzung der klinischen Relevanz andere Tools zum Einsatz. Führt eine Variante zum Austausch einer Aminosäure, so kann die Position dieser Aminosäure innerhalb des Proteins in der Datenbank Uniprot überprüft und herausgefunden werden, in welcher Domäne des Proteins sich die Variante

befindet. Analysetools und Programme wie PROVEAN oder PolyPhen-2 ermöglichen anhand von Scores eine Einschätzung der Auswirkung auf Struktur und Funktion des Proteins. Anhand dieser Scores sowie der Richtlinien des ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics) kann eine Einschätzung der klinischen Relevanz vorgenommen werden.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Studiendesign und Patientenpopulation

In der vorliegenden Arbeit wurden die DNA-Proben von 66 Patienten mit dem klinischen Bild einer Ataxie sowie anamnestischen Anhaltspunkten genetischer Ursache hierfür auf das Vorliegen von Veränderungen der Nukleinsäuresequenz im *GRM1*-Gen hin untersucht. Im Vorfeld wurden genetische Veränderungen, die auf eine SCA 1, 2, 3, 6, 7, 11, 13, 14, 17, 19, 23, 28, 34, 38, 46 oder signifikante Veränderungen in *mtATP6* hinweisen würden, ausgeschlossen.

Zunächst wurde überprüft, ob *GRM1* in relevanten Mengen in den für eine Ataxie kritischen Geweben (Gehirn – Cerebellum) exprimiert wird. Anschließend wurde das längste Transkript (*GRM1*-201) für das Mutations-Screening ausgewählt und alle relevanten Exons über PCR erfasst.

#### 3.2 Nachweis von *GRM1*-Transkripten in verschiedenen Geweben

Zum semiquantitativen Nachweis der Expression von *GRM1* und gegebenenfalls nachweisbaren unterschiedlichen Transkriptvarianten in unterschiedlichen Geweben haben wir aus RNA sechs verschiedener Gewebe cDNA synthetisiert und einen Ausschnitt aus *GRM1* mittels PCR unter Verwendung entsprechender Primer, die in den Exons 6 und 7 lokalisiert sind, amplifiziert. Untersucht wurde RNA, gewonnen aus den folgenden sechs Geweben:

- Gehirn (gesamt)
- Kleinhirn
- Großhirnrinde
- Vollblut
- Leber
- Niere

Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden anschließend in der Gelelektrophorese zum semiquantitativen Nachweis und Vergleich dargestellt. Mittels Sequenzierung wurde anschließend sichergestellt, dass es sich bei dem PCR-Produkt um ein Transkript des *GRM1*-Gens handelt.

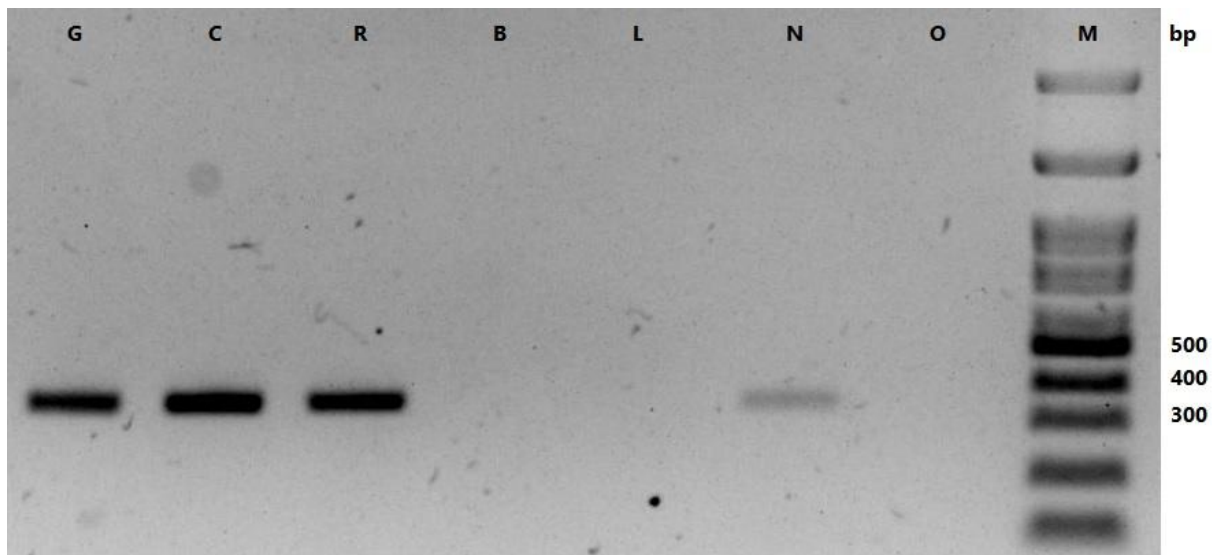


Abbildung 10: Nachweis von *GRM1*-Transkripten in verschiedenen humanen Geweben.

Darstellung der amplifizierten cDNA-Fragmente (341 bp)

G: Gehirn (gesamt); C: Cerebellum (Kleinhirn); R: Großhirnrinde; B: Vollblut; L: Leber; N: Niere;

O: Negativkontrolle

M: 100 bp-Größenstandard

Die hier dargestellten Ergebnisse werden in Kapitel 4.5, hinsichtlich der gewebsspezifischen Expression und der damit verbunden der Plausibilität als potentielle Ursache von Ataxien einordnend diskutiert.

### 3.3 Sequenzanalyse von *GRM1*

Zum Nachweis von Varianten wurden die proteinkodierenden Bereiche der *GRM1*-Exone 1-8 sowie die flankierenden Bereiche der Introns bzw. untranslatierten Regionen untersucht. Dafür wurden die Bereiche zunächst über PCR amplifiziert und anschließend mit der Kettenabbruchmethode nach Sanger sequenziert.

Innerhalb des Kollektivs konnten insgesamt 16 genetische Varianten nachgewiesen werden, von denen eine im 3'UTR Bereich und sechs in intronischen Bereichen liegen. Von den neun in Exon-Bereichen aufgetretenen Varianten haben fünf als synonyme Varianten keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz des Proteins. Bei vier missense Varianten kommt es in der Folge zum Austausch einer Aminosäure. Einige Varianten konnten sowohl homozygot als auch heterozygot nachgewiesen werden. Die Verteilung wird bei den entsprechenden Varianten näher beschrieben.

Sämtliche nachgewiesene Varianten wurden mit den Datenbanken Ensembl genome browser, dbSNP und ClinVar sowie mit ggf. existierenden variantenbezogenen Publikationen abgeglichen. Im Falle eines Aminosäureaustausches wurde zusätzlich mit

den Analysetools PROVEAN und PolyPhen-2 ein Score zur Einschätzung der Auswirkung auf die Funktionalität des Proteins berechnet.

PROVEAN sucht zunächst Sequenzen homolog zur vom Benutzer eingegebenen Sequenz. In einem Abgleich mit diesen Referenzsequenzen wird eine Einschätzung der Ähnlichkeit unter Betrachtung der Aminosäurereste und zusätzlicher Beachtung der Konservierung der betreffenden Aminosäure vorgenommen und das errechnete Ergebnis als Delta-Score angegeben. Niedrige Werte bedeuten, dass ein Austausch mit hoher Wahrscheinlichkeit schädliche Auswirkungen auf die Struktur und Funktion des Proteins hat. Als Cutoff wird der Wert -2,5 verwendet, bei errechneten Werten unterhalb dieser Grenze werden diese von PROVEAN als wahrscheinlich pathogen bewertet (Choi et al. 2012). PolyPhen-2 liefert, ebenfalls über einen Abgleich mit homologen Sequenzen, einen Score zur Abschätzung der funktionellen Signifikanz eines Aminosäureaustausches. Bei Werten zwischen 0,00 und 1,00 entspricht in dieser *in silico* Vorhersage ein Wert von 1,00 der höchsten Signifikanz für Pathogenität eines Austauschs. (Adzhubei et al. 2010).

Die im Kollektiv nachgewiesenen Varianten werden zunächst Exon für Exon beschrieben und anschließend in tabellarischer Übersicht (Tabelle 21) zusammenfassend dargestellt.

Die Nomenklatur der Varianten bzw. der Positionen, an denen sie auftreten, entspricht den Richtlinien der Human Genome Variation Society (HGVS: <http://www.hgvs.org/>, zuletzt abgerufen am 15.09.2021).

### 3.3.1 Exon 1

Zur Untersuchung von Exon 1 wurden PCR-Produkte mit einer Länge von 931 Basenpaaren amplifiziert, welche neben Exon 1 (700 Basenpaare) auch flankierende Bereiche der 5'-untranslatierten Region und des Intron 1 umfassen. Im untersuchten Kollektiv konnte die nachfolgende Variante identifiziert werden:

**c.147C>T, p.Ala49Ala:** Dieser SNP (Single nucleotide polymorphism), mit der rs-Nummer rs370752444, fand sich in unserer Untersuchung lediglich bei einem Patienten in heterozygoter Ausprägung. Durch den Austausch der Base C durch T an der Stelle 147 des Exons entsteht ein anderes Triplet, welches ebenfalls für die Aminosäure Alanin codiert und somit keinen Effekt auf die Aminosäuresequenz hat. Es handelt sich hierbei mit einer MAF von  $T=0,00003$  (8/251336, GnomAD\_exome) um eine sehr seltene Variante.

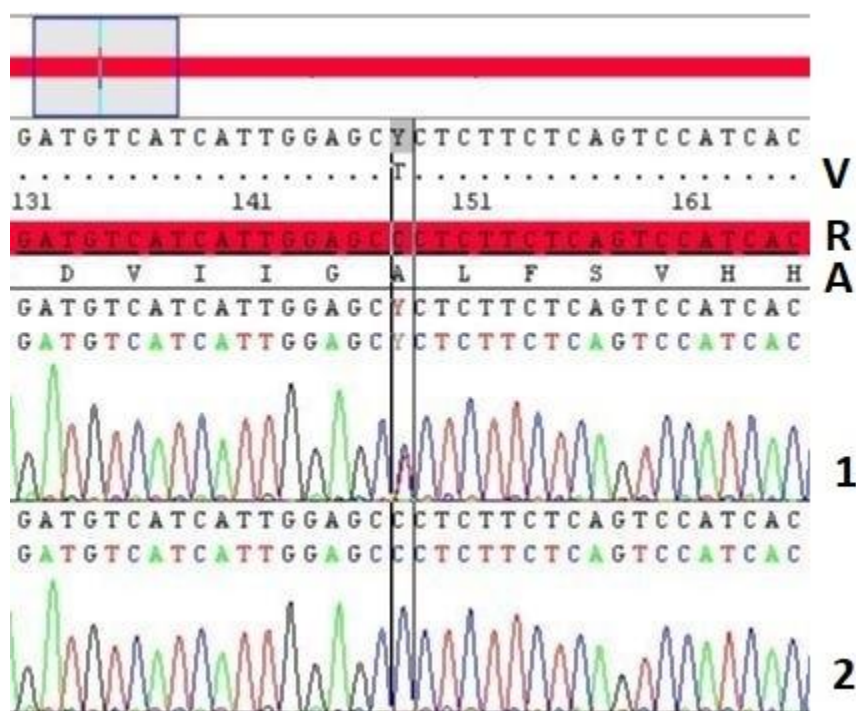


Abbildung 11: Sequenzausschnitt aus *GRM1*, Exon1, um c.147

V: In der Variante auftretende Base

R: Referenzsequenz (ENST00000282753.6)

A: Aminosäuresequenz, Einbuchstaben-Code

1: Variante c.147C>T, heterozygot (Probe 1068)

2: Wildtyp, homozygot C (Probe 1084)

### 3.3.2 Exon 2

Die untersuchten PCR-Produkte zu Exon 2 haben eine Länge von 490 Basenpaaren und decken neben dem Exon 2 (250 bp) die angrenzenden intronischen Bereiche ab. Im untersuchten Kollektiv fanden sich hier keinerlei Sequenzvarianten.

### 3.3.3 Exon 3

In Exon 3 (236 bp Länge) und den angrenzenden intronischen Bereichen fanden sich bei unserer Untersuchung ebenfalls keine Sequenzvarianten.

### 3.3.4 Exon 4

Die zur Beurteilung von Exon 4 verwendeten PCR-Produkte haben eine Länge von 511 Basenpaaren, davon entfallen 247 Basenpaare auf das Exon und 264 auf angrenzende intronische Bereiche.

**c.1433+10T>C:** Die unter rs373538200 vorbeschriebene seltene intronische Variante mit einer beschriebenen MAF von C=0,001 (270/248872, GnomAD\_exome) fand sich bei einem Patienten des Kollektivs. Trotz ihrer Nähe zum Spleiß-Donor wird sie in einem Eintrag auf ClinVar als „likely benign“ eingestuft.

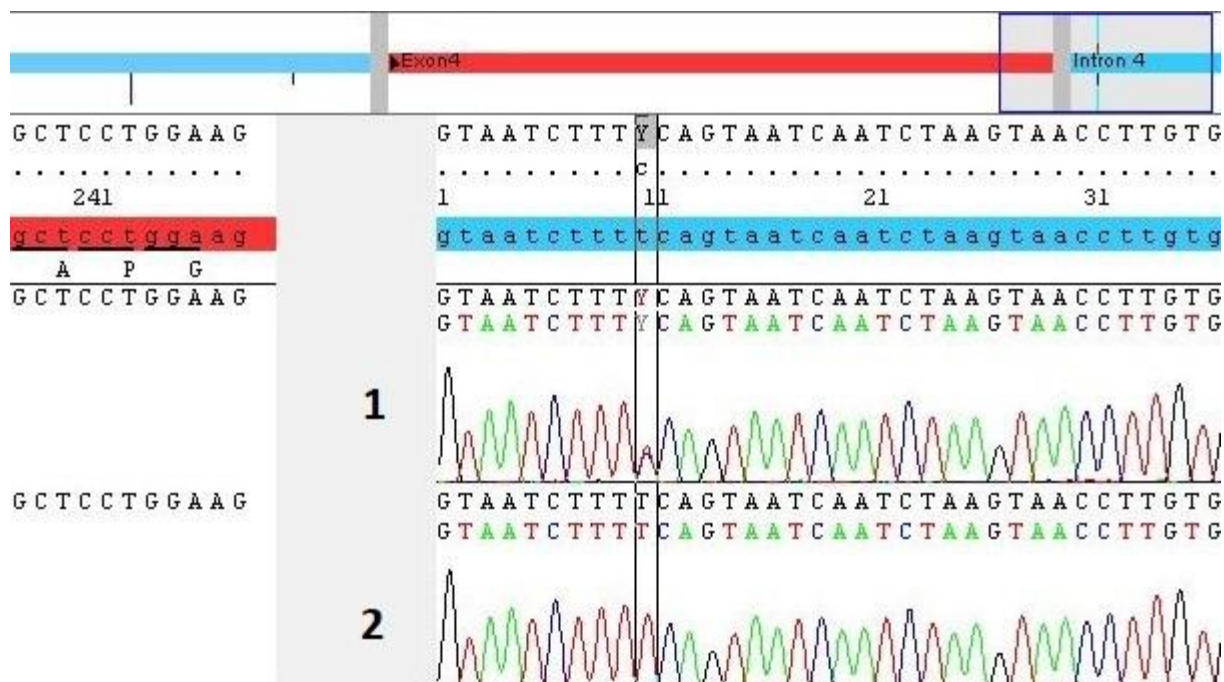
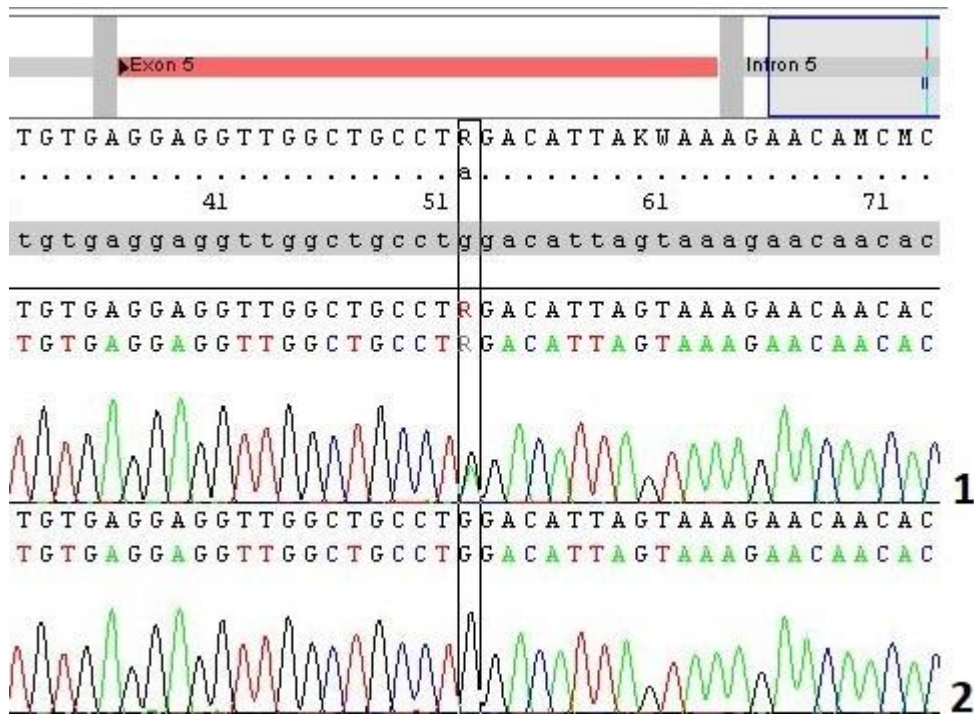


Abbildung 12: Sequenzausschnitt aus *GRM1*, Exon 4 und Intron 4, um c.1433+10  
1: Variante c.1433+10T>C, heterozygot (Probe 1186)  
2: Wildtyp, homozygot T (Probe 1190)





**Abbildung 14: Sequenzausschnitt aus *GRM1*, Intron 5, um c.1602+52**  
**1: Variante c.1602+52G>A, heterozygot (Probe 968)**  
**2: Wildtyp, homozygot G (Probe 972)**

### 3.3.6 Exon 6

Das mit einer Länge von 127 Basenpaaren kürzeste der untersuchten Exone ist Exon 6. Bei der Untersuchung der hierzu amplifizierten DNA-Fragmente (366 bp) konnte die nachfolgend beschriebene Variante nachgewiesen werden.

**c.1603-33A>G:** Für die intronische Variante mit der Kennung rs362913 ist die MAF (Europa) mit  $G=0,027$  (3576/134092, GnomAD\_exome, European) angegeben. Die im Kollektiv beobachtete Allelfrequenz (G) von 0,03 mit 4 heterozygot getesteten Patienten spiegelt dies näherungsweise wieder.



Abbildung 15: Sequenzausschnitt aus *GRM1*, Intron 5, um c.1603-33  
1: Variante c.1603-33A>G, heterozygot (Probe 892)  
2: Wildtyp, homozygot A (Probe 894)

### 3.3.7 Exon 7

Die Sequenzanalyse des Exons 7 (931 bp) mit angrenzenden intronischen Bereichen führte zur Identifikation zweier SNPs, einer intronischen und einer missense Variante.

**c.1730-22C>A:** Für diese in Datenbanken mit rs362856 bezeichnete Variante im Intron 6 wird für Europa eine MAF von  $A=0,043$  (5746/134538, GnomAD\_exome, European) angegeben. In unserem Kollektiv fand sie sich bei vier Patienten und entspricht somit einer Allelfrequenz (A) von 0,03.

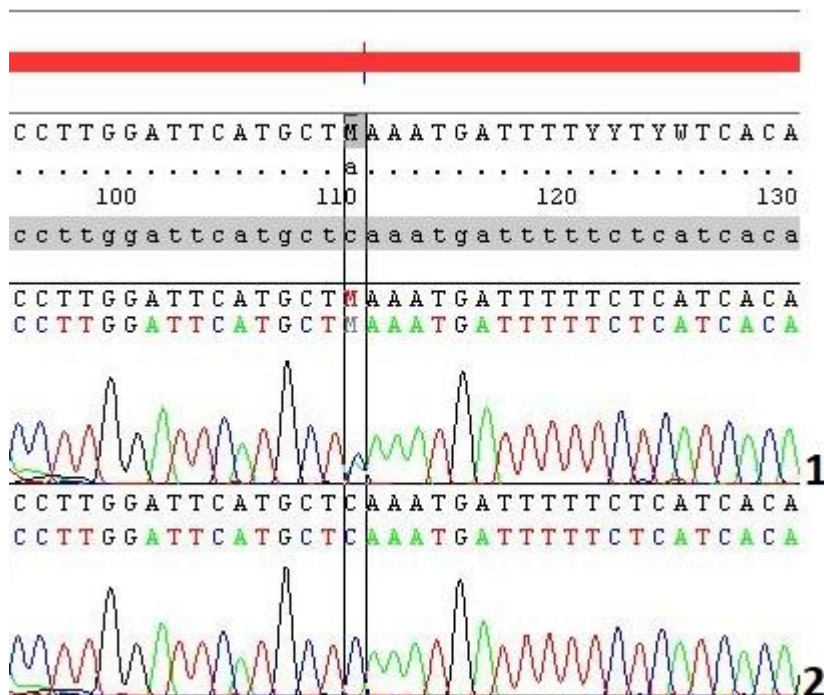


Abbildung 16: Sequenzausschnitt aus *GRM1*, Intron 6, um c.1730-22

1: Variante c.1730-22C>A, heterozygot (Probe 684)

2: Wildtyp, homozygot C (Probe 749)

**c.2185C>A, p.Pro729Thr:** An Position 2185 der für mGluR codierenden DNA konnte eine Transversion C>A nachgewiesen werden. Dieser Austausch führt zum Einbau der Aminosäure Threonin anstelle von Prolin an Position 729 des Proteins (p.Pro729Thr). Es handelt sich somit um den Austausch einer unpolaren gegen eine polare Aminosäure. Die mit einer MAF von A=0,017 (2089/121408, ExAC) unter rs41305288 vorbeschriebene Variante konnte im untersuchten Kollektiv bei 3 Patienten heterozygot nachgewiesen werden und entspricht damit einer Allelfrequenz (A) im Kollektiv von 0,023.

Die vom Austausch betroffene Aminosäure liegt im Bereich einer extrazellulären Domäne (Position 728-750) des Proteins. PROVEAN bewertet den Austausch mit einem Score von -5,767 (cutoff= -2,5) als schädigend für die Funktion des Proteins und auch PolyPhen-2 schätzt ihn (Score 1,0) als potentiell schädigend ein. Unterstützt wird diese Einschätzung durch die im phylogenetischen Sequenzvergleich nachweisbar hohe Konservierung der betroffenen Aminosäure (Abbildung 17).

UniProt identifiers	Species	Position	Sequence	Position
Q13255	Homo sapiens	695	TRKPRFMSAWAQVIIASILISVQLTLVVTLIIME	748
A0A2J8PS75	Pan troglodytes	695	TRKPRFMSAWAQVIIASILISVQLTLVVTLIIME	748
I2CU04	Macaca mulatta	695	TRKPRFMSAWAQVIIASILISVQLTLVVTLIIME	748
F7C3M0	Equus caballus	695	TRKPRFMSAWAQVIIASILISVQLTLVVTLIIME	748
F1NEM2	Gallus gallus	687	TRKPRFMSAWAQVVIASILISVQLTLVVTLIILE	740
P23385	Rattus norvegicus	695	TRKPRFMSAWAQVIIASILISVQLTLVVTLIIME	748
P97772	Mus musculus	695	TRKPRFMSAWAQVIIASILISVQLTLVVTLIIME	748
H0ZKH5	Taeniopygia guttata	695	TRKPRFMSAWAQVVIASILISVQLTLVITLIILE	748
A0A5G3KW64	Xenopus tropicalis	693	TRKPRFMSACAQVVIASILISLQLSLVSLIIME	746
P91685	Drosophila melanogaster	729	AQRLKYIS PQSQVVIITSLIAIQVLITMIWVVVE	770

Abbildung 17: Ausschnitt des Aminosäure-Sequenzalignments der mGluR1-Sequenz um Position 729 (rot markiert); Sequenzen aus UniProt.org

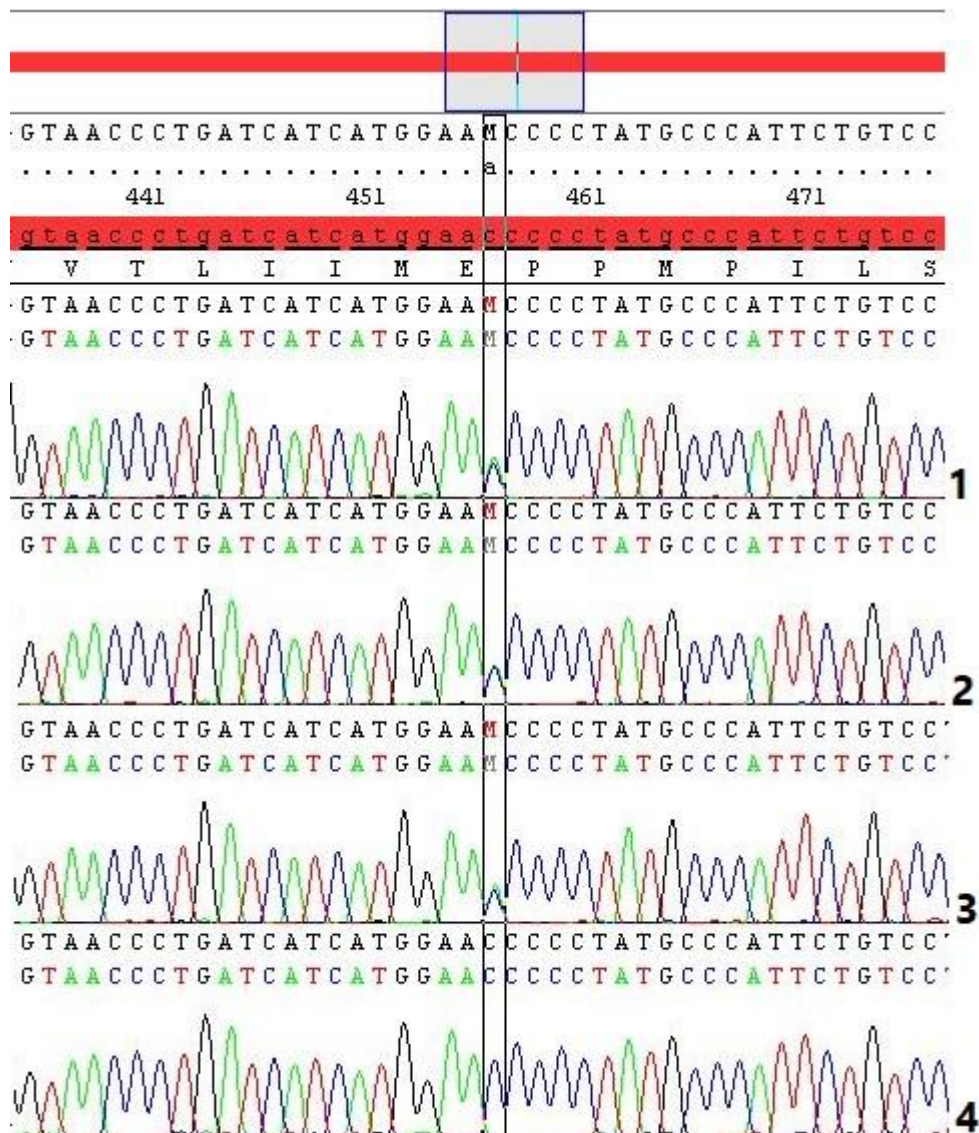


Abbildung 18: Sequenzausschnitt aus *GRM1*, Exon 7, um c.2185  
 1: Variante c.2185C>A, heterozygot (Probe 394)  
 2: Variante c.2185C>A, heterozygot (Probe 980)  
 3: Variante c.2185C>A, heterozygot (Probe 1143)  
 4: Wildtyp, homozygot C (Probe 1145)

### 3.3.8 Exon 8

Zur Untersuchung von Exon 8 wurden PCR-Produkte mit einer Länge von 1147 Basenpaaren amplifiziert. Diese beinhalten die 926 Basenpaare des proteincodierenden Bereichs von Exon 8 sowie flankierende Bereiche des Introns 7 und der 3'-untranslatierten Region. Hierbei konnten 9 SNPs nachgewiesen werden, jeweils einer in Intron 7 und im 3'UTR und weitere sieben im proteincodierenden Bereich des Exons.

**c.2661-44G>A:** Die intronische Variante rs77825355 mit einer MAF  $A=0,033$  (8072/244458, GnomAD\_exome) konnte im Kollektiv bei 2 Patienten heterozygot nachgewiesen werden und entspricht somit einer Allelfrequenz von  $A=0,015$ .

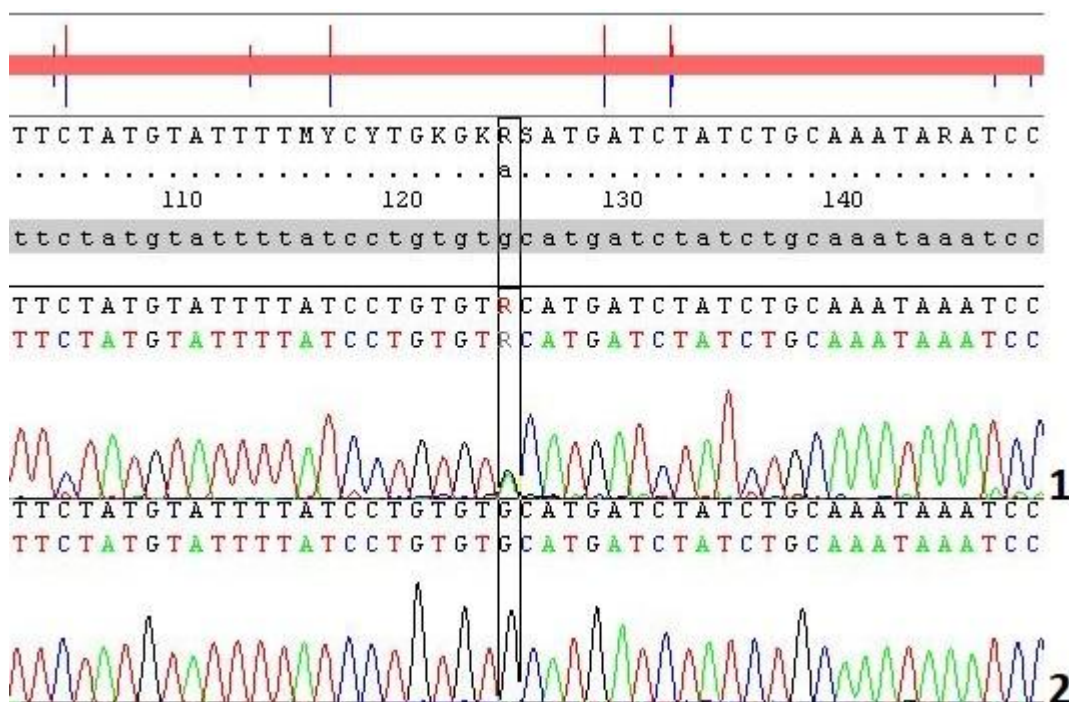


Abbildung 19: Sequenzausschnitt aus *GRM1*, Intron 7, um c.2661-44

1: Variante c.2661-44G>A, heterozygot (Probe 1119)

2: Wildtyp, homozygot G (Probe 1129)

**c.2785G>A, p.Val929Ile:** Unter rs2941 ist eine missense Variante beschrieben, deren MAF mit  $A=0,018$  (2558/142954, ALFA Project) beschrieben ist. Der Basenaustausch führt zum Einbau der unpolaren Aminosäure Isoleucin anstelle der ebenfalls unpolaren Aminosäure Valin an Position 929 des Proteins. Beobachtet wurde diese Variante bei einem Patienten des Kollektivs für welchen DNA-Proben weiterer Familienmitglieder im Institut vorlagen. Die Verwandtschaftsverhältnisse, klinische Betroffenheit sowie die Ergebnisse der DNA-Testung der Familienmitglieder werden im Kapitel 3.3.10 näher beschrieben.

Mit einem PROVEAN Delta-Score von -0,230 und einem PolyPhen-2-Score von 0,111 kommen beide Tools zur Einschätzung der Variante als nicht schädlich. Abbildung 20 zeigt die phylogenetische Konservierung anhand eines Ausschnitts des Aminosäure-Sequenzalignments der mGluR1-Sequenz.

UniProt identifiers							
Q13255	Homo sapiens	907	QHMWHRLSVHVKTNETACNQTA	V	LKPLTKSYQSSGKSLTFS	DTSTKTLYNVEEEEDAQPI	966
A0A2J8PS75	Pan troglodytes	907	QHMWHRLSVHVKTNETACNQTA	V	LKPLTKSYQSSGKSLTFS	DTSTKTLYNVEEEEDAQPI	966
I2CU04	Macaca mulatta	907	QHMWQRLSVHVKTNETACNQTA	V	LKPLTKSYQSSGKSLTFS	DTSTKTLYNVEEEEDAQPV	966
F7C3M0	Equus caballus	907	QHMWHRLSVHVKTSETACNQTA	V	LKPLTKSYQSSGKSLTFS	DTSTKTLYNVEE-EDARPI	965
F1NBM2	Gallus gallus	899	EHMWHRLSVHVKNQETGCNQTA	V	LKPLTKSYHGQSKSLTFT	DISSKTLYNVEEEDREP	958
P23385	Rattus norvegicus	907	QHVWQRLSVHVKTNETACNQTA	V	LKPLTKSYQSSGKSLTFS	DASTKTLYNVEEEDNTPSA	966
P97772	Mus musculus	907	QHVWQRLSVHVKTNETACNQTA	V	LKPLTKSYQSSGKSLTFS	DASTKTLYNVEEEDNTPST	966
H0ZKH5	Taeniopygia guttata	907	EHTWHLRLSVHVKNQETGCNQTA	V	LKPLTKDYHGQS--LTFT	DISSKTLYNVEE-EDREP	963
A0A5G3KW64	Xenopus tropicalis	905	QHMWHRLSVHVKSSETGSNQTA	V	LKPLTKGYQAQNSLTF	SDTSTNTLYNVEEEDENETG	964
P91685	Drosophila melanogaster	936	----TQNSPHLDE---ASAQT	N	VAKHTNGEF-----	LPEV--GERVEPI	970
				:	* * ! . . . * * :		

Abbildung 20: Ausschnitt des Aminosäure-Sequenzalignments der mGluR1-Sequenz um Position 929 (rot markiert); Sequenzen aus UniProt.org

**c.2793G>A, p.Lys931Lys:** Unter der Kennung rs2942 sind für Position 2793 der kodierenden Referenzsequenz, lediglich acht Basen stromabwärts des zuvor beschriebenen SNP, zwei bekannte Varianten beschrieben. Bei diesen handelt es sich um den Austausch der Base Guanin durch die Base Adenin (G>A) oder Cytosin (G>C). In unserem Kollektiv wurde lediglich der Austausch G>A, nicht jedoch G>C, beobachtet und wird nachfolgend beschrieben.

Während 20 Patienten des Kollektivs die homozygote Wildtypsequenz (GG) aufwiesen, konnte bei 34 Patienten die heterozygote Form (GA) und bei 12 Patienten die homozygote Form der Variante (AA) nachgewiesen werden. Die daraus errechnete Allelfrequenz (A) beträgt im untersuchten Kollektiv 0,44 und liegt somit etwas unterhalb der auf dbSNP beschriebenen Allelfrequenz A=0,504 (126597/251376, GnomAD\_exome).

Bei dem Austausch G>A handelt es sich um eine synonyme Variante, da sowohl in der Wildtypsequenz als auch der Variantensequenz ein Triplet vorliegt, welches für die basische Aminosäure Lysin kodiert. Für diese Variante findet sich bereits ein Eintrag in der Datenbank ClinVar, in dem sie als benigne Variante beschrieben wird.

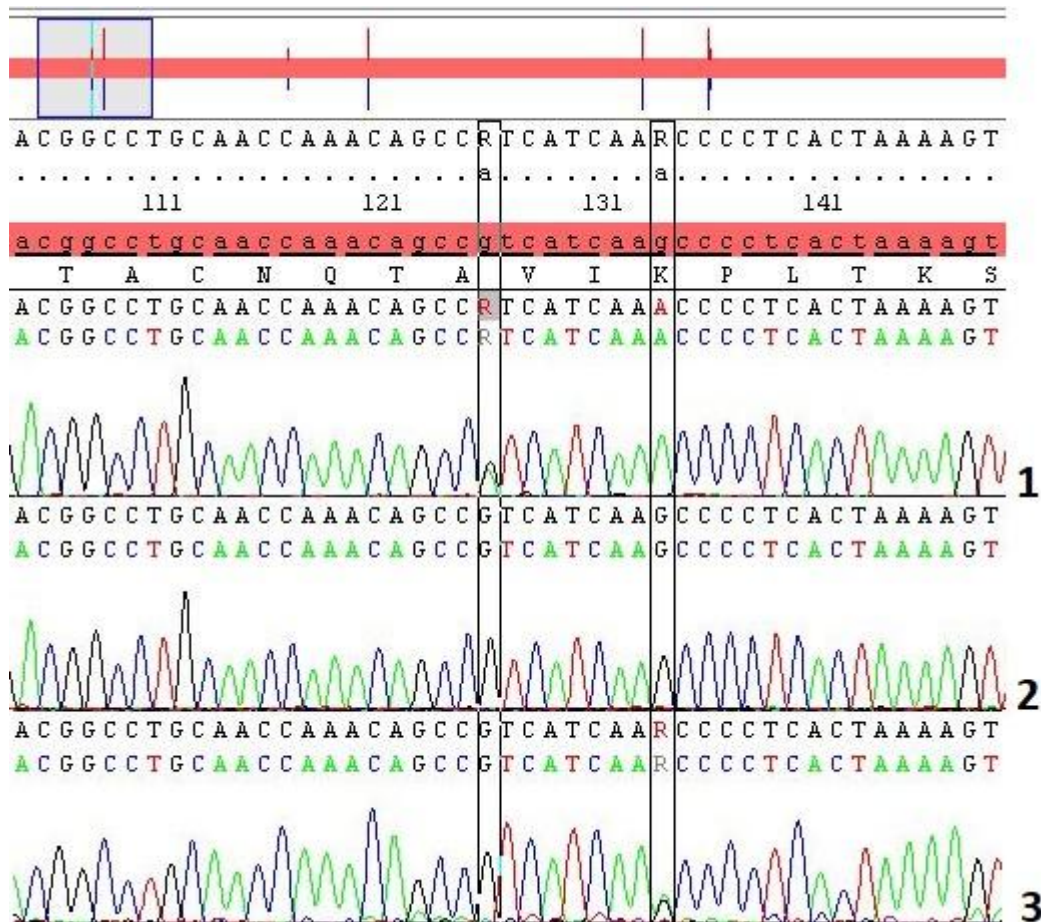


Abbildung 21: Sequenzausschnitt aus *GRM1*, Exon 8, um c.2785 und c.2793

1: Variante c.2785G>A (im Bild: Position 126), heterozygot, zusätzlich Variante c.2793G>A (im Bild: Position 134), homozygot A (Probe 453.1)

2: Wildtypsequenz (für c.2785 und c.2793), homozygot G (Probe 472)

3: Wildtypsequenz (für c.2785), zusätzlich Variante c.2793G>A (im Bild: Position 134), heterozygot (Probe 453.2)

**c.2922T>C, p.Pro974Pro:** In unserem Kollektiv fand sich bei einem Patient die synonyme Variante rs142409803. Sie ist mit einer beschriebenen Allelfrequenz  $C=0,0007$  (180/250618, GnomAD\_exome) sehr selten und wird in Einträgen der Datenbank ClinVar als Benign/Likely benign eingeschätzt.

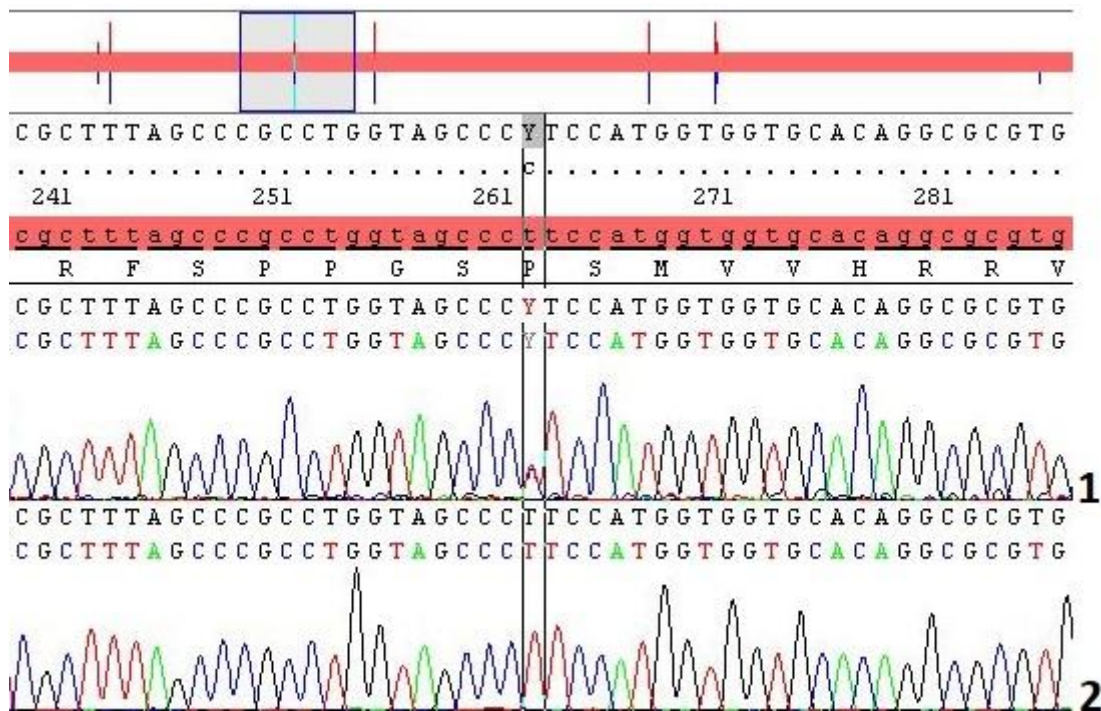


Abbildung 22: Sequenzausschnitt aus *GRM1*, Exon 8, um c.2922  
 1: Variante c.2922T>C, heterozygot (Probe 1159)  
 2: Wildtypsequenz (für c.2922), homozygot T (Probe 1172)

**c.2977T>C, p.Ser993Pro:** An Position c.2977 konnte in 46 Proben eine Abweichung von der Referenzsequenz beobachtet werden. Während 34 Proben in einem Allel den Basenaustausch T>C aufwiesen (TC), fand sich in 12 Proben sogar eine Homozygotie für diesen Basenaustausch (CC) und lediglich 20 Proben wiesen in beiden Allelen an dieser Stelle eine Thyminbase (TT), entsprechend der Referenzsequenz, auf. Die Allelfrequenz im untersuchten Kollektiv entspricht somit  $T=0,56$  und liegt damit oberhalb der in der Literatur (rs6923492) angegebenen MAF von  $T=0,479$  (119370/249042, GnomAD\_exome). In einem Eintrag auf ClinVar wird die Variante als benigne eingestuft. In der Datenbank dbSNP ist unter dieser rs-Kennung zusätzlich der Basenaustausch T>A beschrieben, dieser wurde jedoch in unserer Untersuchung nicht nachgewiesen.

Es handelt sich um eine missense Variante, da der Basenaustausch zum Einbau der unpolaren Aminosäure Prolin anstelle der polaren Aminosäure Serin an Position 993 des Proteins führt. Die betroffene Aminosäure liegt im Bereich einer cytoplasmatischen Domäne des Proteins.

Mit einem PROVEAN-Score von -0,100 und einem PolyPhen-2-Score von 0,000 wird der Austausch von beiden Tools als nicht schädlich bewertet.

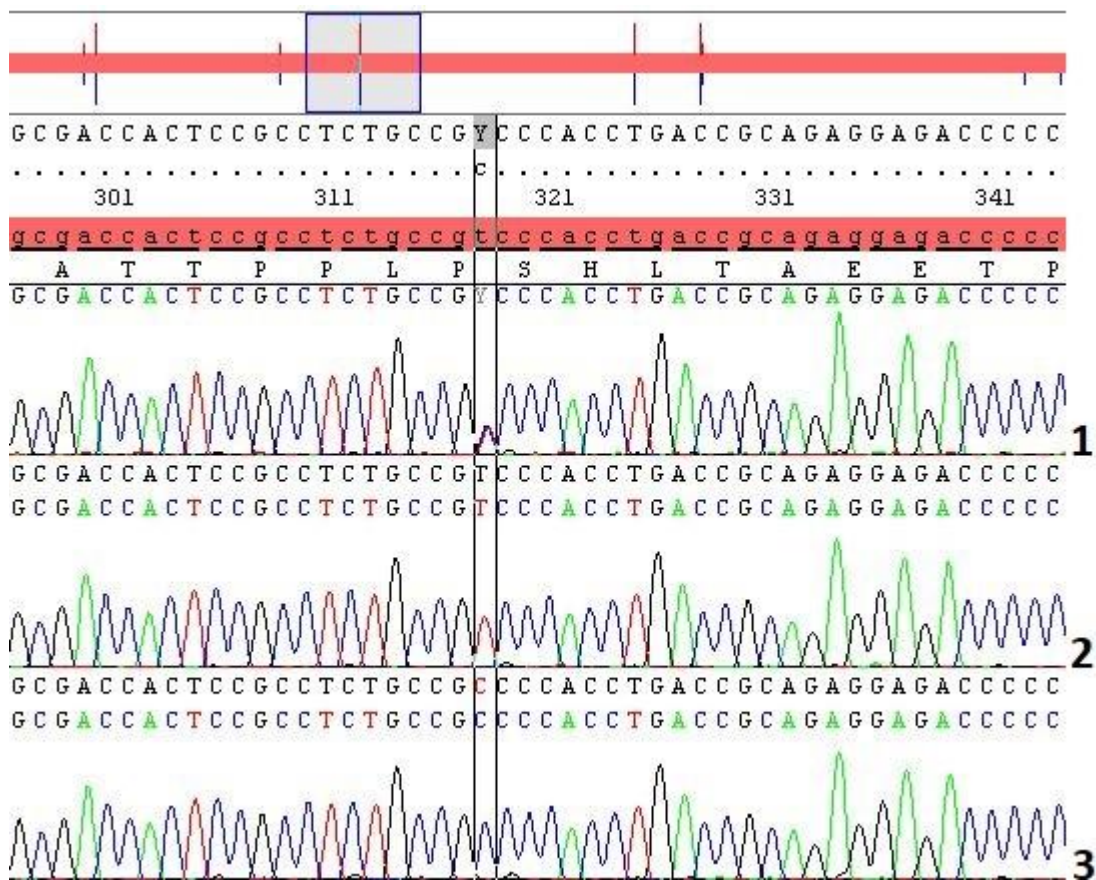


Abbildung 23: Sequenzausschnitt aus *GRM1*, Exon 8, um c.2977

1: Variante c.2977T>C, heterozygot (Probe 1031)

2: Variante c.2977T>C, homozygot C (Probe 1068)

3: Wildtypsequenz (für c.2977), homozygot T (Probe 1084)

**c.3168T>G, p.Gly1056Gly und c.3213T>G, p.Pro1071Pro:** An Position c.3168 ist ein Basenaustausch von T>G unter rs6923864 beschrieben. Lediglich 45 Basen in Richtung 3'-Ende der untersuchten DNA-Fragmente konnte eine weitere Variante (c.3213T>C/G, rs1047006) nachgewiesen werden. Beide Varianten (c.3168T>G und c.3213T>G) haben als synonyme Varianten keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz des Proteins und traten gehäuft zusammen auf. Die Verteilung der verschiedenen beobachteten Genotypen sind Tabelle 19 und Tabelle 20 zu entnehmen. Abbildung 24 zeigt in einem Sequenzausschnitt die Nähe beider Varianten zueinander.

Tabelle 19: Verteilung der beobachteten Genotypen (TT, TG, GG) bei *GRM1* c.3168 im untersuchten Kollektiv

Genotyp	Anzahl nachgewiesener Proben	Proben
TT	17	394, 472, 749, 788, 821, 904, 930, 975, 977, 980, 1008, 1017, 1068, 1115, 1118, 1120, 1159
TG	37	4, 200, 331, 339, 431, 551, 553, 654, 669, 673, 684, 723, 797, 892, 894, 912, 948, 968, 970, 983, 996, 1006, 1031, 1086, 1087, 1119, 1130, 1131, 1134, 1139, 1142, 1143, 1145, 1149, 1186, 1190, 1172
GG	12	453, 636, 642, 972, 1002, 1010, 1023, 1084, 1088, 1110, 1129, 1179

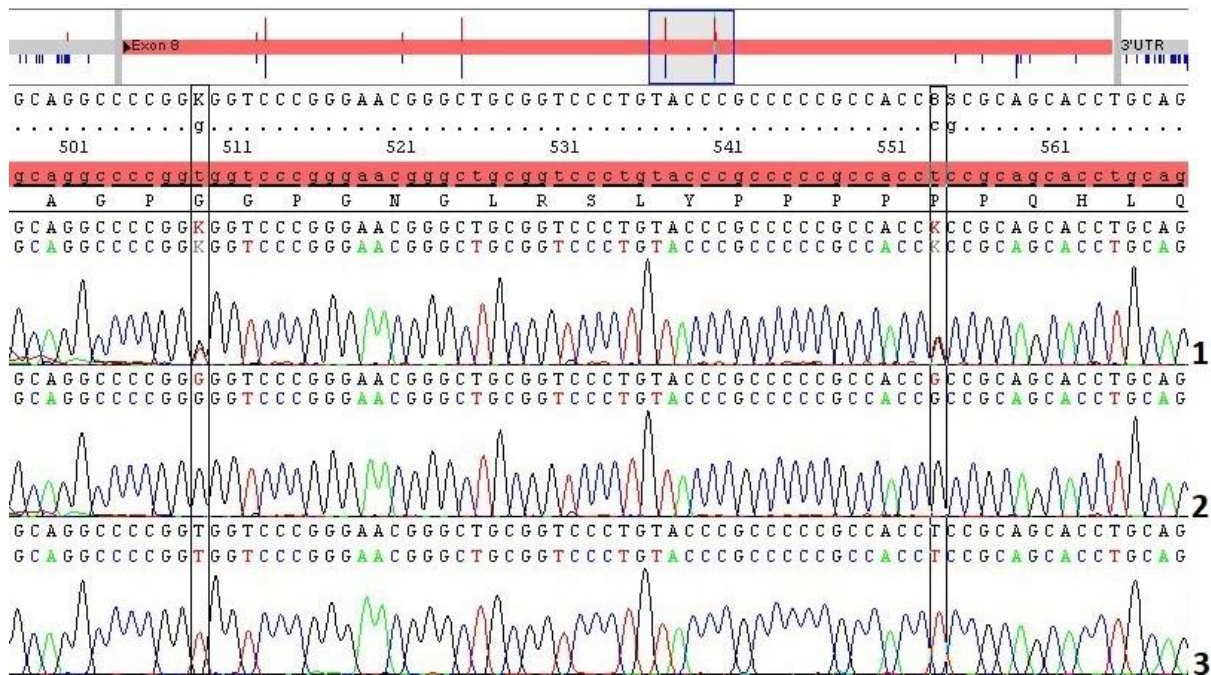
Im untersuchten Kollektiv entspricht dies für die Varianten bei c.3168 somit einer Allelfrequenz für G von 0,46 und T=0,54. In der Datenbank dbSNP ist die MAF mit T=0,435 (106191/243838, GnomAD\_exome) beschrieben.

Tabelle 20: Verteilung der beobachteten Genotypen (TT, TG, GG) bei c.3213

Genotyp	Anzahl nachgewiesener Proben	Proben
TT	25	4, 339, 394, 472, 551, 553, 684, 749, 788, 821, 904, 930, 948, 975, 977, 980, 1008, 1017, 1031, 1068, 1115, 1118, 1119, 1120, 1159
TG	33	200, 331, 431, 636, 654, 669, 673, 723, 797, 892, 894, 912, 968, 970, 972, 983, 996, 1006, 1086, 1087, 1088, 1130, 1131, 1134, 1139, 1142, 1143, 1145, 1149, 1172, 1179, 1186, 1190
GG	7	453, 642, 1002, 1010, 1023, 1110, 1129
GC	1	1084

Für die an Position c.3213 beobachtete Variante (rs1047006) ergeben sich in unserem Kollektiv die Allelfrequenzen G=0,36 (48/132), T=0,63 (83/132) und C=0,008 (1/132). Auf dbSNP sind für diese Allele die Häufigkeiten G=0,383 (4285/11176, ALFA Project), T=0,615 und C=0,001 beschrieben.

Bei 53 der 66 untersuchten Proben lagen an beiden beschriebenen Positionen (c.3168 und c.3213) die gleichen Genotypen vor.



**Abbildung 24: Sequenzausschnitt aus *GRM1*, Exon 8, um c.3168 und c.3213**

**1: Variante c.3168T>G, heterozygot und Variante c.3213T>G, heterozygot (Probe 996)**

**2: Variante c.3168T>G, homozygot G und Variante c.3213T>G, homozygot G (Probe 1002)**

**3: Wildtypsequenz (für c.3168 und c.3213), homozygot T (Probe 1008)**

**c.3214C>G, p.Pro1072Ala:** Eine Base stromabwärts der zuvor beschriebenen Variante fand sich bei einem Patienten des Kollektivs (Pat.-ID: 1119.1) die missense Variante c.3214C>G auf einem Allel. Sie wird in der Literatur unter rs146753539 beschrieben. Der Austausch C>G führt zur Entstehung eines Basentriplets codierend für die unpolare Aminosäure Alanin. Das in der Wildtypsequenz an dieser Stelle vorliegende Triplet codiert für die ebenfalls unpolare Aminosäure Prolin. Der gegebene Aminosäureaustausch p.Pro1072Ala wird von den Vorhersagetools PROVEAN (Delta-Score: -0,659) und PolyPhen-2 (Score: 0,008) als nicht schädlich für Funktion und Struktur des Proteins eingestuft. In den Datenbanken dbSNP und ClinVar sind die Allelfrequenz G=0,006 (808/125568, TOPMED) und eine auf drei Einsendungen gestützte Einschätzung als Benign/likely benign zu finden. Abbildung 25 zeigt einen Ausschnitt des phylogenetischen Sequenzvergleichs der mGluR1-Sequenz um die von der Mutation betroffene Aminosäure.

UniProt identifiers	Species	Accession	Sequence	Position
Q13255	Homo sapiens	1021	--QQPPPPQKSLMDQLQGVVSNFSTAIPDFHAVLAGP...PQHLMQL	1078
A0A2J8PS75	Pan troglodytes	1021	--QQPPPPQKSLMDQLQGVVSNFSTAIPDFHAVLAGP...PQHLMQL	1078
I2CU04	Macaca mulatta	1022	--QQPPPPQKSLMDQLQGVVSNFSTAIPDFHAVLAGP...PQHLMQL	1079
F7C3M0	Equus caballus	1025	QPQQPPFPKSLMDQLQGVVSNFSTAIPDFNAVLSV...PQHLMQL	1084
F1NBM2	Gallus gallus	995	SPKDLPLQPRSLMEQLQGVVSNKLTATGIPDFSAVLP...PQPSPLL	1046
B23385	Rattus norvegicus	1026	FPQQPPQKSLMDQLQGVVSNFSTAIPDFHAVLAGP...PQHLMQL	1085
P97772	Mus musculus	1025	FPQQPPQKSLMDQLQGVVSNFSTAIPDFHAVLAGP...PQHLMQL	1084
H0ZKH5	Taeniopygia guttata	1000	SPKTLFLQPSLMDQLQGVVSNKFAAGIPDFNSVLP...PQHLMQL	1057
A0A5G3KW64	Xenopus tropicalis	1004	--KSL-PLQKSIIDQLHGVIDRFSTGIPDLNSVVM...PQHLMQL	1057
P91685	Drosophila melanogaster	977	-----	976

Abbildung 25: Ausschnitt des Aminosäure-Sequenzalignments der mGluR1-Sequenz um Position 1072 (rot markiert); Sequenzen aus UniProt.org

Zu diesem Patienten lagen im Institut DNA-Proben weiterer Familienmitglieder vor. Diese wurden ebenfalls auf Vorliegen dieses SNP getestet. Die Ergebnisse der Testung, klinische Betroffenheit und die genauen Verwandtschaftsverhältnisse werden in Kapitel 3.3.11 beschrieben.

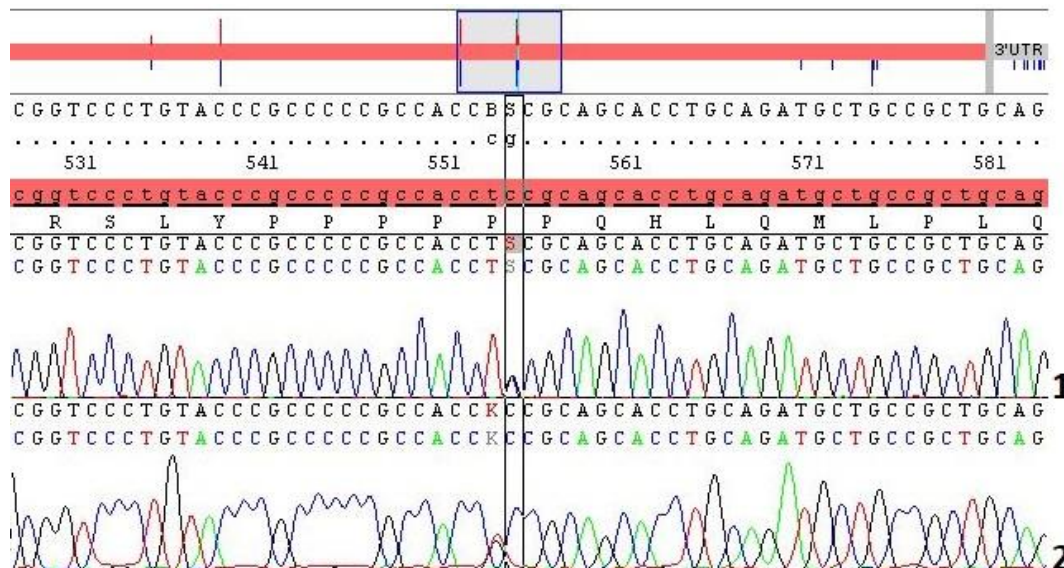


Abbildung 26: Sequenzausschnitt aus *GRM1*, Exon 8, um c.3214  
 1: Variante c.3214C>G, heterozygot (Probe 1119.1)  
 2: Wildtypsequenz (für c.3214), homozygot C, zusätzlich Variante c.3213T>G (Probe 1131)

**c.\*14C>G:** 14 Basen hinter dem Stoppcodon wurde, ebenfalls bei Patient 1119.1, der Basenaustausch C>G in einem Allel identifiziert. Für diese im 3'UTR-Bereich liegende Variante mit der Kennung rs989154500 ist in der Literatur aktuell noch keine Allelfrequenz beschrieben.

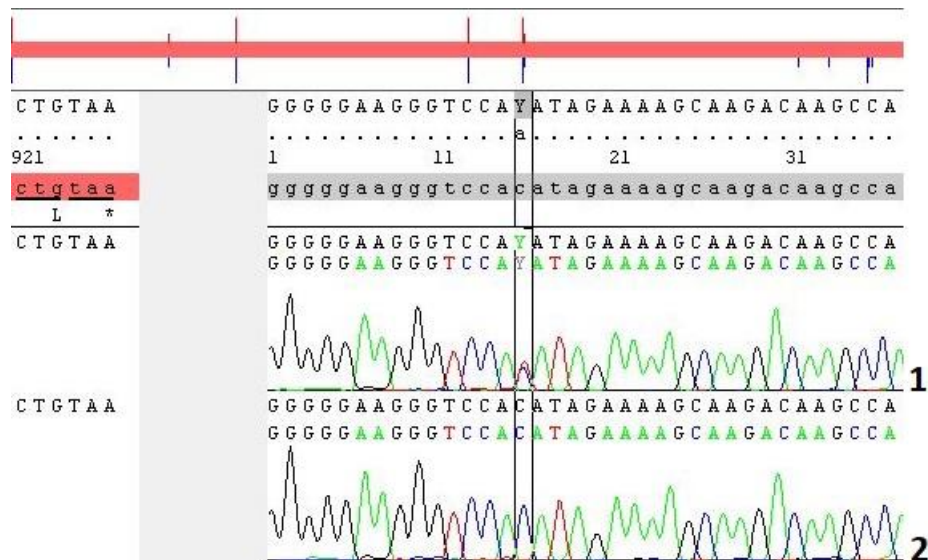


Abbildung 27: Sequenzausschnitt aus *GRM1*, Exon 8, um c.\*14

1: Variante c.\*14C>G, heterozygot (Probe 1119.1)

2: Wildtypsequenz (für c.\*14), homozygot C (Probe 1131)

### 3.3.9 Übersicht der nachgewiesenen Varianten

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit die 16 in Tabelle 21 aufgeführten Varianten identifiziert werden. Alle vier missense Varianten waren vorbeschrieben und mit Ausnahme der im 3'-untranslatierten Bereich gelegenen Variante ließ sich für alle beobachteten SNPs ein europäischer MAF-Referenzwert in der Literatur ermitteln.

Tabelle 21: Zusammenstellung aller gefundenen Varianten im *GRM1*-Gen

Bereich	Position	Basen- austausch	Varianten- art	Effekt auf AS- Sequenz	Rs-Nummer	MAF (kollektiv)*	MAF (Referenz)*
Exon 1	c.147	C>T	synonymous	p.Ala49=	rs370752444	T=0,01	T=<0,001
Intron 4	c.1433+10	T>C	intron	-	rs373538200	C=0,01	C=0,001
Intron 4	c.1434-30	T>C	intron	-	rs362891	C=0,01	C=0,025
Intron 5	c.1602+52	G>A	intron	-	rs362892	A=0,05	A=0,018
Intron 5	c.1603-33	A>G	intron	-	rs362913	G=0,03	G=0,027
Intron 6	c.1730-22	C>A	intron	-	rs362856	A=0,03	A=0,043
Exon 7	c.2185	C>A	missense	p.Pro729Thr	rs41305288	A=0,02	A=0,017
Intron 7	c.2661-44	G>A	intron	-	rs77825355	A=0,02	A=0,033
Exon 8	c.2785	G>A	missense	p.Val929Ile	rs2941	A=0,01	A=0,018
Exon 8	c.2793	G>A	synonymous	p.Lys931=	rs2942	A=0,44	A=0,504
Exon 8	c.2922	T>C	synonymous	p.Pro974=	rs142409803	C=0,01	C=<0,001
Exon 8	c.2977	T>C	missense	p.Ser993Pro	rs6923492	C=0,44	T=0,479
Exon 8	c.3168	T>G	synonymous	p.Gly1056=	rs6923864	G=0,46	T=0,435
Exon 8	c.3213	T>G/C	synonymous	p.Pro1071=	rs1047006	G=0,36 (C=0,01)	G=0,383 (C=0,001)
Exon 8	c.3214	C>G	missense	p.Pro1072Ala	rs146753539	G=0,01	G=0,006
3'UTR	c.*14	A>T	3'UTR variant	-	rs989154500	G=0,01	-

\*Werte auf drei Nachkommastellen gerundet

### **3.3.10 Fallbericht und Familienuntersuchung Patient 453.1, Variante c.2785G>A**

**(p.Val929Ile)**

Der Patient 453.1, 1968 geboren, gab bei seiner Untersuchung an, seit seiner Jugend unter Gleichgewichtsstörungen, besonders bei hektischen Bewegungen, zu leiden. Schwindel sowie sonstige Vorerkrankungen wurden verneint.

Bei der klinisch-neurologischen und ophthalmologischen Untersuchung präsentierten sich eine Gang- und Standataxie, sowie ein Downbeat- und ein Lagenystagmus in allen Richtungen. Auffallend waren zudem eine sakkadierte Blickfolge sowie Störungen der Folgebewegung und des optokinetischen Nystagmus. An den unteren Extremitäten waren beidseits gesteigerte Muskeleigenreflexe, ein positiver Babinski-Reflex, atrophierte Waden sowie Hohlfüße nachweisbar. Sensibilitätsstörungen und Anhaltspunkte für das Vorliegen einer Makulaerkrankung fanden sich keine. Die Retina war unauffällig. Im MRT zeigte sich neben deutlicher Kleinhirnatrophie eine vermutlich durch Demyelinisierung bedingte multifokale Leukenzephalopathie. Hirnstamm und Stammganglien waren unauffällig. Im EKG und den Laboruntersuchungen waren keine auffälligen Befunde nachzuweisen.

Familienanamnestisch bestehen Symptome bei weiteren Familienmitgliedern. Der Vater sowie der jüngste der drei Brüder des Patienten zeigen keine vergleichbaren Symptome. Bei der Mutter bestehen ähnliche Symptome, die jedoch erst später, im jungen Erwachsenenalter, erstmals auftraten. Sie habe zudem zwei gesunde Brüder, mit gesunden Nachkommen. Weiterhin sind zwei Brüder des Patienten aufgrund der Ataxie gehbehindert. Der Patient selbst hat drei Nachkommen, die zum Zeitpunkt der Datenerhebung keine Symptome zeigen. Die Familienanamnese wird in Abbildung 28 graphisch dargestellt.

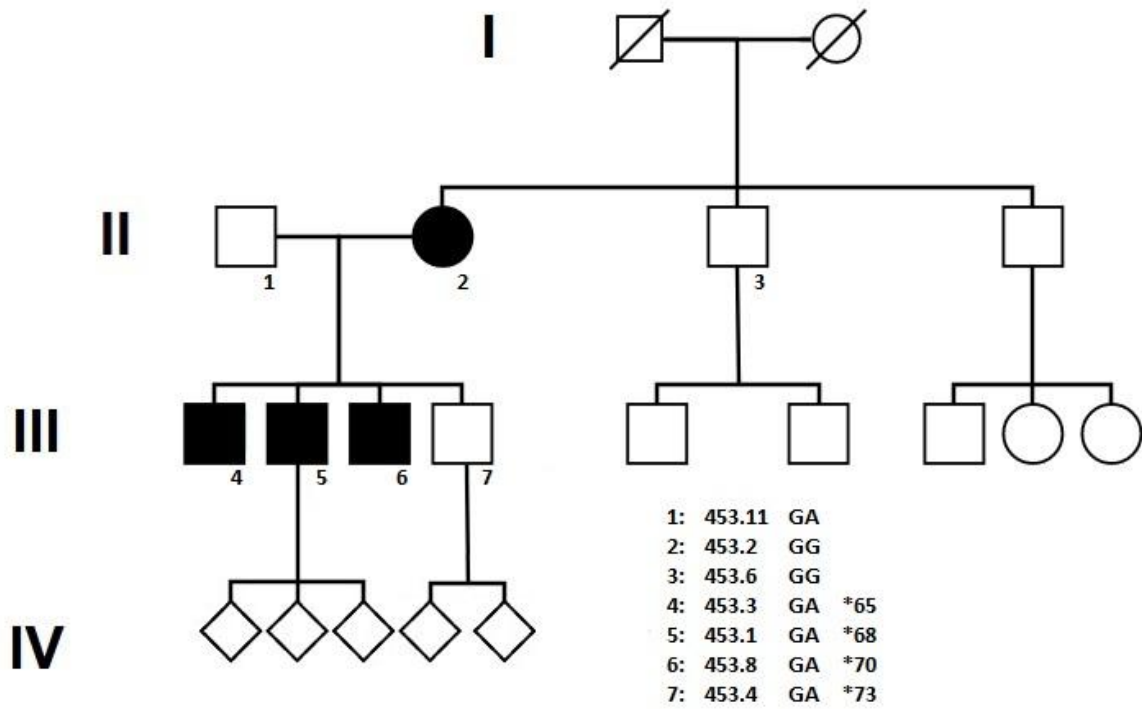


Abbildung 28: Stammbaum Patient 453.1: Symptome bei Mutter sowie zwei Brüdern des Indexpatienten (III/5); Vater (II/1) und ein jüngerer Bruder (III/7) zeigten bis zum Zeitpunkt der Datenerhebung keine Symptome

- ♂ männlich, verstorben      ♀ weiblich, verstorben      ◇ Geschlecht unbekannt,  
 asymptomatisch  
 □ männlich, asymptomatisch      ■ männlich, symptomatisch  
 ○ weiblich, symptomatisch      ● weiblich, symptomatisch

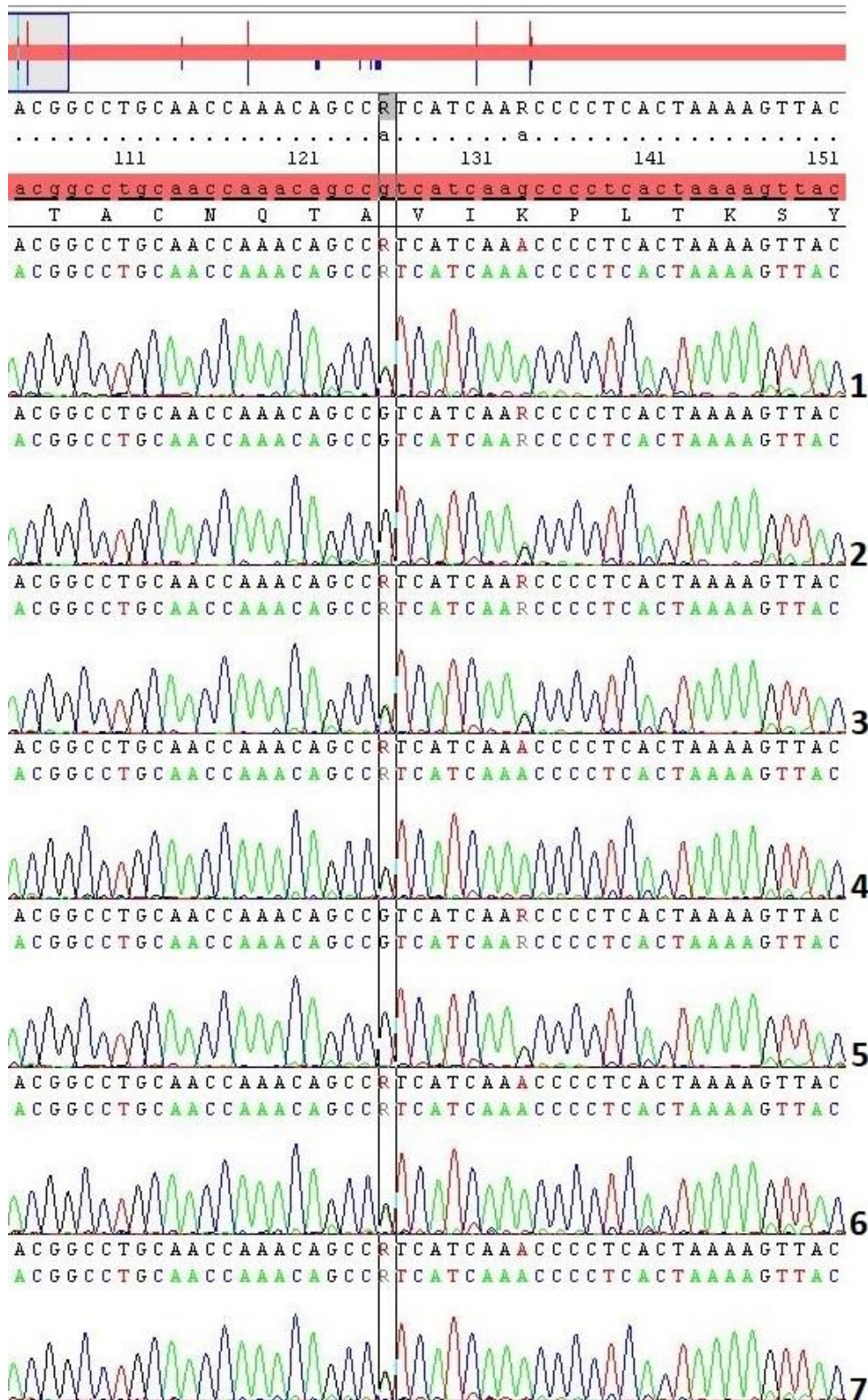


Abbildung 29: Sequenzausschnitt aus *GRM1*, Exon 8, um c.2785, Familie 453  
 1: Variante c.2785G>A, heterozygot (Probe 453.1)  
 2: Wildtypsequenz (für c.2785), homozygot G (Probe 453.2)  
 3: Variante c.2785G>A, heterozygot (Probe 453.3)  
 4: Variante c.2785G>A, heterozygot (Probe 453.4)  
 5: Wildtypsequenz (für c.2785), homozygot G (Probe 453.6)  
 6: Variante c.2785G>A, heterozygot (Probe 453.8)  
 7: Wildtypsequenz (für c.2785), homozygot G (Probe 453.11)

Fünf der sieben untersuchten Familienmitglieder wiesen die missense Variante c.2785G>A (rs2941) in einem Allel auf. Wie Abbildung 29 zu entnehmen ist, wurden die Proben 453.1, 453.3, 453.4, 453.8 und 453.11 heterozygot für die Variante getestet. Es handelt sich hierbei um den Indexpatient, seine drei Brüder und den Vater des Patienten. Bei der Mutter des Patienten sowie einem Bruder der Mutter wurde die Wildtypsequenz homozygot nachgewiesen. Die Variante wird somit nicht mit der Erkrankung zusammen segregiert.

Die Frage, ob die Variante ursächlich für die Symptome des Patienten ist, wird in Kapitel 4.4.2 näher diskutiert.

### **3.3.11 Fallbericht und Familienuntersuchung Patient 1119.1, Variante c.3214C>G (p.Pro1072Ala)**

Der 1968 geborene Patient 1119.1 gab bei einer Untersuchung im Jahr 2015 seit sieben Jahren progrediente Symptome im Sinne eines ataktischen Syndroms an, vereinbar mit einer spinocerebellären Ataxie. Zusätzlich bestünden ausgeprägte Sehstörungen. Im Vorfeld wurden Tests auf das Vorliegen der Trinkuleotid-Expansions-Erkrankungen SCA 1, 2, 3, 6, 7 und 17 sowie auf Punktmutationen in den für SCA 13, 14, 19, 23, 28 ursächlichen Genen und im *mtATP6*-Gen durchgeführt und diese ausgeschlossen.

Bei der Mutter des Patienten (1119.3) und einem jüngeren Bruder (1119.2) lagen zum Zeitpunkt der Untersuchung keine entsprechenden Symptome vor. Weitere Informationen zur Familienanamnese, inklusive Informationen über den Vater sowie radiologische oder neurologische Befunde wurden dem Institut leider nicht übermittelt.

Der SNP rs146753539 mit dem Austausch c.3214C>G konnte bei der Mutter des Patienten (1119.3) ebenfalls nachgewiesen werden. Die Sequenzierung der DNA des jüngeren Bruders (1119.2) lieferte den Nachweis der Wildtypsequenz. Abbildung 30 stellt die beschriebenen Verhältnisse und Abbildung 31 die Ergebnisse der Sequenzierung graphisch dar.

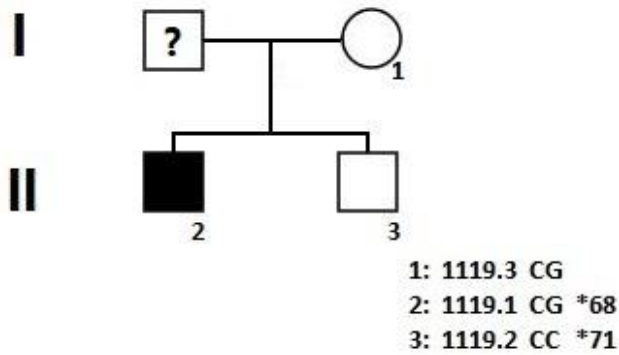


Abbildung 30: Stammbaum Patient 1119.1: Symptome beim Indexpatient (II/2); Mutter (I/1) und ein jüngerer Bruder (II/3) des Patienten zeigten bis zum Zeitpunkt der Datenerhebung keine Symptome. Zum Vater des Patienten lagen keine Informationen vor.

□ männlich, asymptomatisch      ■ männlich, symptomatisch  
 ○ weiblich, symptomatisch

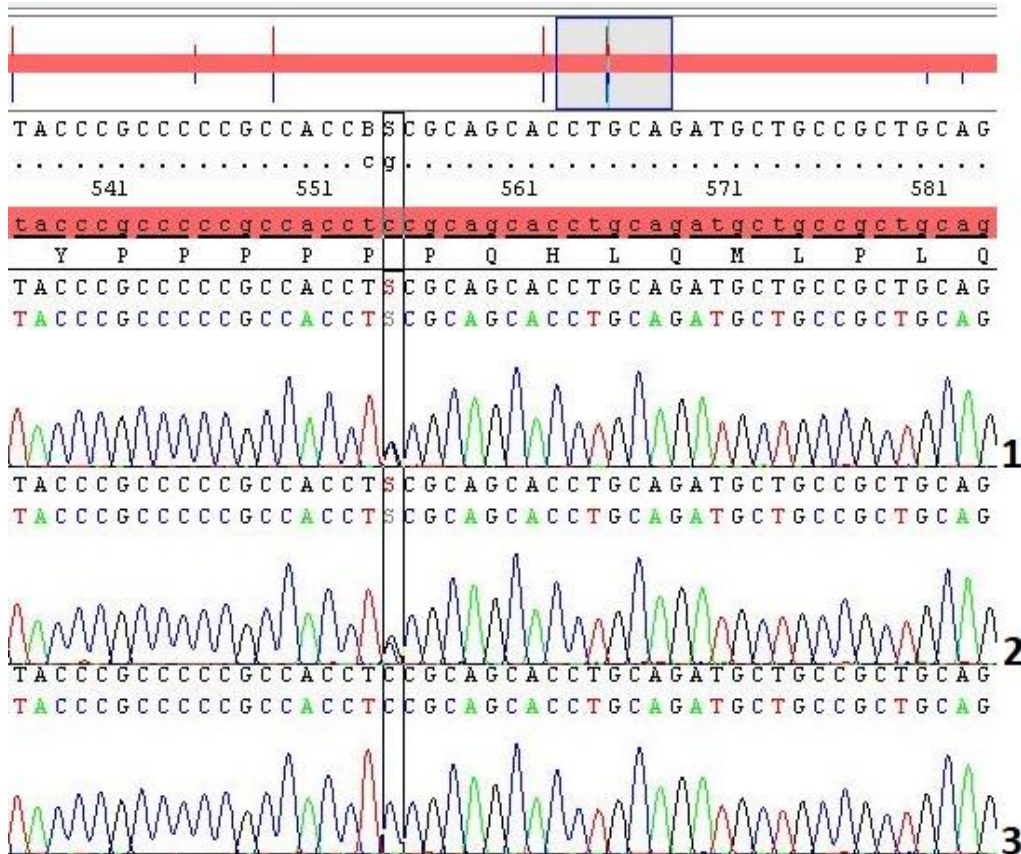


Abbildung 31: Sequenzausschnitt aus *GRM1*, Exon 8, um c.3214, Familie 1119

- 1: Variante c.3214C>G, heterozygot (Probe 1119.1)
- 2: Variante c.3214C>G, heterozygot (Probe 1119.2)
- 3: Wildtypsequenz (für c.3214), homozygot C (Probe 1119.3)

Bei gleichem Genotyp und zugleich vorliegender Symptomlosigkeit der Mutter erscheint ein kausaler Zusammenhang zwischen Variante und der Erkrankung zunächst unwahrscheinlich. Die Frage, ob der beschriebene SNP für die Symptome des Patienten dennoch ursächlich sein kann, wird in Kapitel 4.4.3 diskutiert.

## 4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Untersuchung der DNA-Proben von 66 Patienten mit klinisch apparenter Ataxie. Diese wurden mittels PCR-Amplifikation, Sequenzierung und anschließender bioinformatischer Analyse auf das Vorliegen von Mutationen im *GRM1*-Gen getestet. Bei den Patienten des untersuchten Kollektivs lagen neben der ataktischen Symptomatik zusätzlich anamnesticke Hinweise auf eine autosomal dominante Vererbung vor und im Vorfeld konnten kausale Mutationen an den mit SCA 1, 2, 3, 6, 7, 11, 13, 14, 17, 19, 23, 28, 34, 38 und 46 assoziierten Loci sowie in *MT-ATP6* ausgeschlossen werden.

Eine definitive Beurteilung des Kausalzusammenhangs zwischen einer gefundenen Variante und einer Erkrankung ist schwierig, jedoch können diverse Kriterien wie familiäre Testung, Beurteilung der Konservierung – unter anderem über bioinformatische Programme – und Häufigkeiten herangezogen werden, um Hinweise zu erhalten. Zur weiteren Abklärungen können funktionelle Experimente hilfreich sein, um die Auswirkung einer Variante auf die Proteinstruktur, Lokalisation oder Aktivität nachweisen zu können.

### 4.1 Häufigkeit der spinocerebellären Ataxien

Ataxien sind mit einer Prävalenz von 10-20/100.000 (Berlit 2014; Klockgether 2018a) ein seltenes Krankheitsbild. Ein beachtlicher Anteil davon lässt sich auf Heredoataxien zurückführen. Ruano et al. schätzen in ihrer 2014 publizierte Metaanalyse die Prävalenz autosomal dominant vererbter Ataxien auf 2,7/100.000 und die Prävalenz autosomal rezessiv vererbter Ataxien auf 3,3/100.000. Weiterhin beschrieben sie, dass in verschiedenen Populationen zwischen 33 und 92% der untersuchten Familien auch nach ausgiebiger Testung ohne genetische Diagnose verbleiben (Ruano et al. 2014). Zwar hat sich seither in der Diagnostik genetischer Erkrankungen, nicht zuletzt aufgrund der breiteren Verfügbarkeit genetischer Tests und der vermehrten Anwendung von „next generation sequencing“ (NGS) – darunter versteht man Verfahren zur Sequenzierung des kompletten Exoms (whole-exome sequencing, WES) bzw. Genoms (whole-genome sequencing, WGS) – einiges getan, so wurden in den letzten Jahren vergleichsweise viele SCA-verursachende Genmutationen identifiziert. Dennoch gelingt bei einigen Ataxie-Patienten der Nachweis kausaler Mutation bislang nicht. Ein Grund hierfür liegt vermutlich darin, dass einige Gene mit potentiell SCA-verursachenden

Mutationen bislang nicht identifiziert oder mit dem Krankheitsbild sicher in Verbindung gebracht wurden. Dies beruht unter anderem darauf, dass sich beispielsweise bei fehlender Familienanamnese die Beurteilung der Pathogenität einer mittels NGS nachgewiesenen Variante schwierig darstellt.

Die Repeat-Expansionen, insbesondere bei SCA1, SCA2, SCA3 und SCA6, sind für die Mehrheit der spinocerebellären Ataxien verantwortlich. Punktmutationen, wie sie für die SCA44 beschrieben sind, können jedoch in unterschiedlichen Genen vorkommen und ebenfalls Ursache einer spinocerebellären Ataxie sein. Für viele der SCAs sind lediglich einzelne Fälle oder betroffene Familien beschrieben (Rath und Nguengang Wakap 2020).

Umfassende epidemiologische Daten liegen zur SCA44 aktuell noch nicht vor, es sind jedoch unterschiedliche pathogene Mutationen in drei Familien (Watson et al. 2017) näher beschrieben. In der Datenbank Clinvar existiert ein Eintrag über eine weitere Variante (p.Leu277Ile, rs1022097029) mit unklarer klinischer Signifikanz. 2010 veröffentlichten Rossi et al. eine Untersuchung bei der sie in einem Kollektiv aus 41 Ataxie-Patienten mit Symptombeginn vor dem 25. Lebensjahr teils mit auffälliger Familienanamnese sowie einer Kontrollgruppe aus 50 gesunden Personen keine pathogenen Varianten in *GRM1* nachweisen konnten (Rossi et al. 2010). In der Zusammenschau lassen diese Daten vermuten, dass pathogene Mutationen in *GRM1* überaus selten sind. Es ist jedoch davon auszugehen, dass ein großer Teil der Patienten mit Ataxie ohne bislang nachgewiesene Mutation nicht routinemäßig auf Mutationen in *GRM1* getestet und diese somit nicht nachgewiesen wurden. Weiterhin konnten Ruano et al. zeigen, dass die Prävalenz der unterschiedlichen SCAs regionalen Schwankungen unterliegt (Ruano et al. 2014), was auf den Gründereffekt zurückzuführen sein dürfte. Die Zahl der pathogenen *GRM1*-Mutationen könnte somit regional höher liegen als obige Einzelfallbeschreibungen vermuten lassen.

#### **4.2 Mutationen in *GRM1* als Krankheitsursache**

Genetische Veränderungen in *GRM1* als mögliche Kausalität verschiedener Pathologien wurden bereits von unterschiedlichen Forschergruppen untersucht. So werden etwa verschiedene in *GRM1* nachgewiesene Varianten von zwei Forschungsgruppen in Bezug auf Schizophrenieerkrankungen diskutiert. Frank et al. untersuchten einen möglichen Zusammenhang zwischen mehreren Varianten, darunter die auch in der hier

vorliegenden Arbeit nachgewiesene Variante c.2785G>A (p.Val929Ile) und Schizophrenie sowie Bipolarer Störung. Während es nicht möglich war, einzelne Varianten gesichert mit diesen Erkrankungen in Zusammenhang zu bringen, erwies sich ein Zusammenhang mit Variantenclustern in diversen untersuchten Genen, darunter *GRM1*, jedoch als sehr wahrscheinlich (Frank et al. 2011). Die Forschergruppe um Ayoub, welche ebenfalls mögliche Zusammenhänge zwischen Varianten in *GRM1* und Schizophrenieerkrankungen untersuchte, konnte für c.2185C>A (p.Pro729Thr) mittels *in vitro* Zellsystemen keine signifikanten Effekte auf die Funktionalität in Form eines relevanten Einflusses auf die Signaltransduktion über den Inositoltriphosphatweg oder die Oberflächenexpression des Rezeptors nachweisen. Auch die in unserer Untersuchung beschriebenen Varianten p.Val929Ile (c.2785G>A, rs2941, s. Kapitel 4.4.2) und p.Ser993Pro (c.2977T>C, rs6923492) werden in dieser Publikation aufgeführt, jedoch bei unauffälliger *in silico* Analyse als mögliche Krankheitsursache nicht näher diskutiert. (Ayoub et al. 2012).

In einer kleinen Studienpopulation konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen verschiedenen *GRM1*-Varianten, darunter neben c.2185C>A (p.Pro729Thr) auch c.2785G>A (rs2941), und dem Auftreten von Clusterkopfschmerzen festgestellt werden (Bacchelli et al. 2016).

Bei der Untersuchung mehrerer iranischer Familien bei denen geistige Behinderungen festgestellt wurden, konnten Forscher in einer Familie eine in *GRM1* aufgetretene rezessive Variante als wahrscheinliche Ursache ausmachen. (Davarniya et al. 2015)

Eine Studie von Kelleher et al. untersuchte den Zusammenhang zwischen seltenen genetischen Varianten in Genen der mGluR-Signalkaskade, darunter *GRM1*, und der Anfälligkeit für Autismus-Spektrum-Störungen. Während ein begründeter Verdacht dieses Zusammenhangs, unter anderem aufgrund des signifikant häufigeren Auftretens als schädigend eingeschätzter Varianten in der Gruppe untersuchter Autismus-Patienten gegenüber der Kontrollgruppe, aufgezeigt werden konnte, wurde dieser nicht explizit mit einzelnen Varianten in Verbindung gebracht, welche auch in unserem Kollektiv identifiziert wurden. Darüber hinaus fanden sich mehr potentiell schädliche *GRM1*-Varianten in der Kontrollgruppe als im untersuchten Patientenkollektiv. In der Studie beschriebene Varianten ohne Signifikanz für Autismus-Spektrum-Störungen wurden auch in unserem Kollektiv nachgewiesen. Zu diesen Varianten gehören c.2185C>A

(p.Pro729Thr, rs41305288), c.2785G>A (p.Val929Ile, rs2941), c.2793G>A (rs2942), c.2922T>C (rs142409803), c.2977T>C (p.Ser993Pro, rs6923492), c.3168T>G (rs6923864) und c.3213T>G (rs1047006). (Kelleher et al. 2012)

Eine Verknüpfung zwischen dem Auftreten von Ataxie bei Schädigungen in der mGluR1-Signalkaskade konnte auch unabhängig von Mutationen in *GRM1* selbst nahegelegt werden. Sillevs Smitt und Kollegen konnten bei zwei an Morbus Hodgkin erkrankten Patienten gegen mGluR1 gerichtete Autoantikörper nachweisen. Klinisch zeigte sich bei diesen Patienten eine ausgeprägte cerebelläre Ataxie und ein kausaler Zusammenhang zwischen Antikörpern und klinisch apparenter Ataxie wurde vermutet (Sillevs Smitt et al. 2000).

Die vorbeschriebenen Untersuchungen zeigen, dass ein Zusammenhang zwischen Erkrankungen mit zugrunde liegenden Pathologien im ZNS und dem Vorliegen von Mutationen in *GRM1* von verschiedenen Wissenschaftlern bereits vermutet und untersucht wurde. Einige der Untersuchungen konnten einen solchen Zusammenhang bestätigen. Erkrankungen, die unabhängig vom zentralen Nervensystem aufzutreten scheinen, bilden eher die Ausnahme. Ein solcher Zusammenhang scheint insbesondere vor dem Hintergrund der gewebspezifischen Expression von *GRM1* nachvollziehbar und wird an späterer Stelle noch einmal aufgegriffen (siehe 4.5).

#### **4.3 Pathogene Mutationen in *GRM1* (vorbeschrieben)**

Neben den vorangehend beschriebenen Pathologien, die mit *GRM1* in Verbindung gebracht werden, spielt die Assoziation zwischen entsprechenden Mutationen und klinisch manifesten Ataxien bei der Erforschung von *GRM1* die wohl bislang größte Rolle. Erste fundierte Forschungsergebnisse zu dominant wirkenden Mutationen in *GRM1* gehen zurück auf Watson et al. Sie beschrieben drei pathogene Mutationen in *GRM1*, zwei Transitionen sowie eine Duplikation. Mutation c.785A>G, p.Tyr262Cys betrifft die extrazelluläre ligandenbindende Domäne, c.2375A>G führt zum Aminosäureaustausch p.Tyr792Cys in einer Transmembrandomäne und c.3165dupA über einen frameshift zu einer Verkürzung der C-terminalen Domäne (Watson et al. 2017). Wie eingangs beschrieben, führen die beiden Transitionen zum Austausch phylogenetisch hochkonservierter Aminosäuren (siehe Abbildung 5), was eine hohe Relevanz für die Struktur und Funktion des Proteins nahelegt. Die resultierende Veränderung der Aminosäuresequenz wird zudem von bioinformatischen

Vorhersagetoools als potentiell schädlich eingestuft. Die von Watson et al. beschriebene Duplikation tritt im letzten Exon von *GRM1* auf, worin sie die Ursache für die Produktion eines verkürzten Proteins anstelle eines nonsense-mediated-decays vermuten. In Zellexperimenten konnten sie die Produktion des verkürzten Proteins nachweisen sowie eine Störung der nachgeschalteten Signalkaskade aufzeigen, indem sie, verglichen mit Zellen mit mGluR1-Wildtypsequenz, reduzierte Mengen phosphorylierter ERK 1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2) nachwiesen (Watson et al. 2017).

#### **4.4 Nachgewiesene Varianten in *GRM1***

Bei den 66 Patienten des hier untersuchten Kollektivs konnten 16 unterschiedliche SNPs nachgewiesen werden. Sämtliche Varianten sind vorbeschrieben, und es existieren somit bereits zugeordnete rs-Kennungen, jedoch fanden sich für keine der Varianten Publikationen, welche den möglichen Bezug zu autosomal dominanten Heredoataxien diskutieren. Bei den beobachteten Varianten handelt es sich um sechs intronische Varianten, eine in der 3'-untranslatierten Region gelegene Variante und neun exonische Varianten. Vier der exonischen SNPs führen zu einer veränderten Aminosäuresequenz. Drei dieser vier Varianten werden vor dem Hintergrund möglicher Pathogenität in Kapitel 4.4.4 und unter Einbezug der Familienanamnese sowie familiärer Testungen in den Kapiteln 4.4.2 und 4.4.3 bewertet.

Das American College for Medical Genetics and genomics (ACMG) hat in Übereinstimmung mit den Empfehlungen der International Agency for Cancer Research (IARC) ein Klassifizierungssystem für Sequenzvarianten erstellt und teilt diese in fünf Klassen ein. Für die Zuordnung einer Variante zur jeweiligen Klasse gelten entsprechende standardisierte Kriterien (Plon et al. 2008; Richards et al. 2015).

Die missense Variante c.2977T>C, p.Ser993Pro (rs6923492) wird den Standards der ACMG Klassifizierung folgend der Klasse 1 – Normvariante ohne klinische Relevanz – zugeordnet. Diese Zuteilung basiert im Wesentlichen auf der Häufigkeit der Variante ( $MAF_{\text{Europa}}=0,454$ ). Ferner erscheint eine Pathogenität der Variante nicht zuletzt aufgrund des auf ClinVar in mehreren Einträgen bestätigten benignen Charakters überaus unwahrscheinlich und die Variante wird im Folgenden nicht näher diskutiert.

#### 4.4.1 Varianten in nicht-codierenden Bereichen

Nicht-codierende Sequenzen können regulatorische Effekte auf die Transkription von Genen haben und sie beispielsweise als Enhancer steigern. Zudem können sie die Stabilität der Transkripte und die Translationseffizienz beeinflussen (Shaul 2017). Folglich können Mutationen in entsprechenden Sequenzbereichen diese Regulation beeinflussen und somit Auslöser von Erkrankungen sein (Chatterjee und Ahituv 2017). Sequenzvarianten in Introns können zum Entstehen neuer Spleißstellen und darüber zum Einbau zusätzlicher, ursprünglich nicht-codierender Sequenzen führen. Beispiele hierfür sind einige  $\beta$ -Thalassämie und Mukoviszidose verursachende Mutationen (Dhir und Buratti 2010; Friedman et al. 1999). Auch können bestehende Spleißstellen durch Mutationen so verändert werden, dass einzelne Exone nicht mehr als solche erkannt werden und aus der prä-mRNA herausgespleißt werden. Dies konnte beispielsweise in einigen Fällen als Ursache des Brugada-Syndroms in *SCN5A* nachgewiesen werden (Rossenbacker et al. 2005). Diese teils verheerenden Veränderungen der mRNA resultieren in einem vorzeitigem Abbau der fehlerhaften RNA, als nonsense-mediated-decay bezeichnet oder der Bildung fehlerhafter Proteine mit oftmals pathogenem Charakter (Lykke-Andersen und Jensen 2015).

Die Repeat-Expansionserkrankungen SCA 8, 12, 31, 36 und 37 sind Beispiele für Ataxien, ausgelöst durch DNA-Veränderungen in nicht codierenden Sequenzen (Sullivan et al. 2019). In unserer Untersuchung wurden sechs intronische Varianten und eine in der 3'-untranslatierten Region nachgewiesen. Sämtlichen dieser Varianten wird in der *in silico* Analyse mittels des Human Splicing Finders kein Einfluss auf das Spleißen zugeschrieben. Weiterhin spricht bei vier der SNPs die Häufigkeit von 3-5% in Europa tendenziell gegen einen relevanten pathogenen Effekt. Generell ist die Bewertung intronischer Sequenzveränderungen jedoch schwierig und *in silico* Analysen können lediglich als Hinweis verwendet werden. Zur weiteren Beurteilung kann es sinnvoll sein, RNA aus frischen Blutproben der Betroffenen zu extrahieren und in cDNA umzuschreiben, anschließend zu amplifizieren und die vorliegenden Transkripte zu analysieren. Auf diese Weise können beispielsweise verkürzte oder verlängerte Transkripte nachgewiesen werden, die möglicherweise auf intronische Varianten zurückzuführen sind.

#### 4.4.2 Familie 453

In der DNA des Patienten 453.1 konnte die Transition c.2785G>A, p.Val929Ile (rs2941) heterozygot nachgewiesen werden. Zwar schätzen PROVEAN und PolyPhen-2 die Variante als unschädlich ein, jedoch verdeutlicht das Aminosäure-Sequenzalignment (Abbildung 20) die hohe Konservierung der betroffenen Aminosäure, was eine wichtige Rolle für Struktur und Funktion des Proteins vermuten lässt und einen kausalen Zusammenhang zwischen Variante und Krankheit vorstellbar macht.

Im Institut lagen Proben von sieben Familienmitgliedern vor, die auf das Vorliegen der Variante getestet wurden. Anamnestisch ergaben sich Hinweise auf eine ataktische Symptomatik bei vier getesteten Personen. Bei fünf von insgesamt sieben Proben ließ sich dieselbe Variante nachweisen, darunter alle getesteten Nachkommen in Generation III, jedoch unabhängig vom Gesundheitsstatus. Da die Variante ebenfalls beim gesunden Vater (II-1), jedoch nicht bei der erkrankten Mutter (II-2) nachgewiesen wurde, kann eine Segregation der Variante mit der Erkrankung ausgeschlossen werden. Diese Aussage wird auch dadurch unterstützt, dass der gesunde Bruder (III-7) ebenfalls Träger der Variante ist. Somit konnte keine Phänotyp-Genotyp-Assoziation nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 28). Auch kann die beobachtete Konstellation in Generation III angesichts der Phänotyp-Genotyp-Verteilung der Elterngeneration (II) nicht über eine verminderte Penetranz erklärt werden. Basierend auf den vorliegenden Daten erscheint es somit unwahrscheinlich, dass die identifizierte Variante für die Symptome verantwortlich ist. Die Familienanamnese legt jedoch nahe, dass es sich in der Familie um eine erbliche Form der Ataxie handelt und zukünftige Tests auf weitere Genmutationen dabei helfen könnten, eine genetische Diagnose zu stellen.

Die Stammbaumanalyse (Abbildung 28) deutet darauf hin, dass die Symptomatik einer autosomal dominanten Vererbung folgt. Jedoch ist auch eine mitochondriale Vererbung vorstellbar, wenn man davon ausgeht, dass bei dem jüngsten Sohn Symptome in fortschreitendem Alter noch eintreten können oder ein geringerer Heteroplasmiegrad vorliegt. Über die Großeltern des Patienten konnten anamnestisch keine Informationen gewonnen werden, welche eine weitere Differenzierung ermöglichen würden. Bei dieser Familie liegt mit großer Wahrscheinlichkeit eine andere genetische Ursache für die Bewegungsstörung vor als die beim Index-Patienten nachgewiesene Variante c.2785G>A, p.Val929Ile (rs2941).

#### 4.4.3 Familie 1119

Bei Patient 1119.1 wurde die missense Variante c.3214C>G, p.Pro1072Ala (rs146753539) heterozygot nachgewiesen. Die Untersuchung der DNA des asymptomatischen Bruders (1119.2) und der asymptomatischen Mutter (1119.3) führten zu folgender Konstellation:

- Indexpatient 1119.1: Genotyp CG, symptomatisch
- Mutter 1119.3: Genotyp CG, asymptomatisch
- Bruder 1119.2: Genotyp CC (Wildtyp), asymptomatisch

Leider lagen dem Institut weder anamnestische Informationen, noch DNA-Proben weiterer Familienmitglieder vor. Aufgrund der unvollständigen Familienanamnese, insbesondere den fehlenden Informationen über den Vater, ist es nicht möglich, eine genaue Aussage über den Erbgang der Erkrankung zu treffen.

Zwar ist die betroffene Aminosäure – zumindest unter Säugetieren – hochkonserviert (siehe Abbildung 25), der hier beobachtete Austausch wird jedoch von *in silico* Analysen als unschädlich eingeschätzt. Zudem wurde die gleiche Variante bei der Mutter ebenfalls nachgewiesen, diese zeigt jedoch keine Symptome. Es ist allerdings vorstellbar, dass die fehlende Symptomatik der Mutter auf unvollständiger Penetranz beruht oder dass es sich bei der Mutter um ein Keimbahnmosaik und beim Sohn um eine Neumutation handelt.

Die hier nachgewiesene Variante erscheint als Auslöser der Symptome somit eher unwahrscheinlich, eine definitive Aussage lässt sich aufgrund der geringen Datenlage jedoch nicht treffen. Unsere Interpretation deckt sich mit dem Eintrag auf ClinVar, der diese Variante als „benign/likely benign“ bewertet. Auch für diese Variante könnten weitere funktionelle Experimente dabei helfen, etwaige Pathogenität dieser Variante auszuschließen oder zu bestätigen.

#### 4.4.4 Putativ pathogene Mutation

In Exon 7 konnte eine Variante der Klasse 3 nach ACMG Klassifikation nachgewiesen werden. Bei dieser Klasse handelt es sich um Varianten mit unklarer klinischer Relevanz. Dort führte die Transversion c.2185C>A zur Veränderung der Aminosäuresequenz (p.Pro729Thr). Während die bereits von Watson et al. als pathologisch beschriebenen Punktmutationen die extrazelluläre ligandenbindende

Domäne bzw. eine Transmembrandomäne betreffen, ist in diesem Fall eine Aminosäure innerhalb einer extrazellulären Domäne betroffen. Sie befindet sich in räumlicher Nähe zur vierten Transmembrandomäne, welche von den Aminosäuren 704-727 gebildet wird (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q13255>, zuletzt abgerufen am 15.09.2021).

Sowohl PROVEAN als auch PolyPhen-2 schätzen die Variante als schädlich ein. Zudem handelt es sich bei der betroffenen Aminosäure um eine hochkonservierte (Abbildung 17), sodass eine hohe Relevanz für die Struktur und Funktion des Proteins gemutmaßt werden kann.

Da die im Exon 7 codierte DNA-Sequenz in allen proteincodierenden Transkriptvarianten vertreten ist, kann vermutet werden, dass die Veränderung auch in der im ZNS exprimierten Variante vertreten ist. Eine Bestätigung der tatsächlichen Expression könnte über speziell erzeugte Zelllinien mit Nachweis des veränderten Proteins in den Zellen erfolgen. Mittels Zellkulturen kann der Einfluss der Variante auf die Zellen weiter untersucht werden. Zudem können Zellversuche dazu eingesetzt werden, die Auswirkung der Variante p.Pro729Thr auf die mGluR1-Signalkaskade nachzuweisen, indem beispielsweise Spiegelveränderung der second messenger sowie nachgeschalteter Effektorproteine im Sinne eines gain of function oder loss of function nachgewiesen werden. Ferner kann über eine Darstellung der räumlichen Struktur des Proteins beispielsweise mittels NMR-Spektroskopie oder Röntgenstrukturanalyse versucht werden eine etwaige fehlerhafte Faltung nachzuweisen und sogar eine Strukturänderung bei Ligandenbindung dargestellt werden. Beides könnte eine eingeschränkte oder übermäßige Funktionalität des veränderten Proteins untermauern. Zur Beurteilung möglicher Pathogenität der Variante ohne die Anwendung zusätzlicher funktioneller Experimente wäre eine ausgeprägte Stammbaumanalyse sowie familiäre Testungen mit den hier eingesetzten Methoden sinnvoll. Da sich Ataxien in der Regel im Erwachsenenalter manifestieren, ist das Anfordern von weiteren DNA-Proben, insbesondere aus der Eltern- bzw. Großeltern-Generation, häufig nicht möglich. Die Kausalität der Mutation für die Erkrankung kann zwar nicht mit Sicherheit bestätigt werden, ist aufgrund der vorliegenden Daten aber durchaus vorstellbar.

#### **4.5 GRM1-Gewebespezifische Expression und mGluR1-Pathophysiologie**

Der metabotrope Glutamatrezeptor 1, von *GRM1* codiert, spielt für die Funktion des ZNS eine wichtige Rolle. Da er besonders stark in den Purkinjezellen des Cerebellums

exprimiert wird und insbesondere im Bereich der Synapsen zwischen Parallelfasern der Körnerzellen und Purkinjezellen zu finden ist, verwundert es nicht, dass seine Funktionen weitgehend mit denen des Cerebellums zusammenhängen. Glutamat, der häufigste exzitatorische Neurotransmitter, führt bei Bindung an den Rezeptor zu dessen Aktivierung und in der Folge über IP<sub>3</sub>-Signaltransduktion zu erhöhtem intrazellulärem Kalziumspiegel. Die erwähnten Synapsen bilden zusammen mit den Synapsen zwischen Kletterfasern der unteren Olive und den Purkinjezellen die exzitatorischen Afferenzen der Purkinjezellen. Sie stellen somit einen essentiellen Bestandteil der Regulation der Kleinhirnfunktion dar. Dazu zählen unter anderem Kontrolle und Korrektur ablaufender Bewegungen und das Erlernen bestimmter Bewegungsabläufe (Hartmann et al. 2011). Purkinjezellen weisen bereits ohne exzitatorische Einflüsse Aktionspotentiale in einer bestimmten sehr konstanten Frequenz auf. Exzitatorische und inhibitorische Afferenzen beeinflussen diese Frequenz der Purkinjezellen und regulieren darüber ihre Afferenz und somit ihre Funktion. In Versuchen mit Knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass ein Absinken dieser Frequenz, beispielsweise durch mangelnden exzitatorischen Einfluss, zu Ataxie führt (Meera et al. 2016). Auch die von Watson et al. beschriebene de novo Mutation (p.Gly1056Argfs\*49) mit daraus resultierendem Protein loss-of-function, dürfte auf diesem Pathomechanismus basieren (Watson et al. 2017). Gain-of-function Mutationen in *GRM1* bzw. Mutationen die zu einer Verstärkung der mGluR1-Signalkaskade führen, können ebenfalls zu Ataxie führen, wie Anhand der „Moonwalker Mouse Line“ gezeigt werden konnte (Becker 2014). Die Mäuse weisen eine Mutation im *TRPC3*-Gen auf, welches für einen nicht-selektiven Kationenkanal kodiert und zur mGluR1-Signalübertragung in Purkinjezellen benötigt wird (Hartmann et al. 2008). Anhand der Mausversuche wurde die Vermutung aufgestellt, dass entsprechende Mutationen zu eingeschränktem Wachstum der Purkinje-Zell-Dendriten führen. Hier lassen sich Parallelen zu SCA13 und SCA19 ziehen, bei welchen die ursächlichen Mutationen ebenfalls in Genen auftreten, welche für einen Kationenkanal (*KCND3* bzw. *KCNC3*) codieren. Darüber hinaus konnte im Falle von SCA19 bereits ebenfalls eine Affektion der Purkinje-Zellen nachgewiesen werden, welche hier vermehrt degenerieren (Duarri et al. 2012). Watson und Mitarbeiter haben zwei gain-of-function Mutationen (p.Tyr792Cys und p.Tyr262Cys) in *GRM1* beschrieben und vermuten dabei einen exzitotoxischen Effekt, dem eine positiv-Feedback-Kaskade zu Grunde liegt (Watson et al. 2017).

Es existieren sieben *GRM1*-Transkriptvarianten, wovon fünf proteincodierend sind. In dieser Untersuchung wurden die nachgewiesenen Nukleotidsequenzen mit der Referenzsequenz der längsten Transkriptvariante (ENST00000282753.6) verglichen. Da als Ausgangsmaterial aus Blut gewonnene DNA verwendet wurde, lässt sich anhand dieser Untersuchung jedoch keine Aussage über die einzelnen und insbesondere im ZNS exprimierten Transkripte treffen.

Um die gewebespezifische Expression von *GRM1* nachzuweisen, wurde RNA aus sieben ausgewählten Geweben zunächst in cDNA umgeschrieben, diese mit *GRM1*-spezifischen Primern vervielfältigt und anschließend sequenziert. Dabei wurden Primer gewählt, deren Sequenz innerhalb von Exon 6 und 7 liegt, welche in sämtlichen proteincodierenden Varianten vorkommen. Es konnte gezeigt werden, dass *GRM1* vor allem im ZNS und in geringem Maße in der Niere exprimiert wird. Die hohe Expression im ZNS ist auf die Funktion des Rezeptors zurückzuführen. Wie oben beschrieben, handelt es sich bei Glutamat um den häufigsten im ZNS vorkommenden exzitatorischen Neurotransmitter (Zhou und Danbolt 2014). Um seine Wirkung zu entfalten sind entsprechende Rezeptoren zu denen auch mGluR1 zählt, unerlässlich. Folglich ist auch die Expression von Glutamatrezeptoren überwiegend im ZNS nachvollziehbar. Als wichtiges Molekül der Langzeit-Depression (long-term depression, LTD) spielen sie für die neuronale Plastizität eine wichtige Rolle (Kano et al. 2008) und wie anhand nachgewiesener Ataxie bei Vorliegen entsprechender Mutationen gezeigt werden konnte, spielen sie zudem eine Rolle bei der korrekten Bewegungsabmessung, bei der die Purkinjenzellen des Cerebellum entscheidend beteiligt sind (Salman 2018; Guerguelcheva et al. 2012; Watson et al. 2017). Zu beachten ist, dass *GRM1* in Geweben außerhalb des ZNS in deutlich geringerem Umfang exprimiert wird, als innerhalb des ZNS, wie Abbildung 2 zu entnehmen ist, was am Ehesten auf die Funktion von Glutamat als Neurotransmitter zurückzuführen ist. Der Nachweis der Expression des Rezeptors in der Niere (vgl. Abbildung 10) deckt sich mit den Beobachtungen von Dryer. Er beschreibt die Expression von metabotropen Glutamatrezeptoren in Podozyten der Niere. Bei Versuchen mit Knockout-Mäusen konnte zudem eine Albuminurie sowie Glomerulosklerose nachgewiesen werden (Dryer 2015).

#### 4.6 Empfehlung zur molekulargenetischen Diagnostik

Sowohl in der Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der Ataxien des Erwachsenenalters (Klockgether 2018a), als auch in der Publikation von Wallace und Bird (Wallace und Bird 2018) wird bei Verdacht auf das Vorliegen einer spinocerebellären Ataxie zunächst die molekulargenetische Testung auf Repeat-Expansionen empfohlen. Da mehr als die Hälfte aller SCAs durch Repeat-Expansionen verursacht werden, empfiehlt sich diese Vorgehensweise, um vermeidbare Kosten für Tests auf seltenere Ursachen zu vermeiden. Bei negativem Testergebnis empfiehlt die Leitlinie unter Einbezug klinischer Hinweise wie etwa Visusverlust bei SCA7 weitere Gene zur molekulargenetischen Testung auszuwählen. Hierbei können Genpanels zum Einsatz kommen, die heutzutage von vielen Laboren angeboten werden und eine große Auswahl an Genen bieten, die einzeln oder in einer vorausgewählten Zusammenstellung zur Testung ausgewählt werden können. Heutzutage wird *GRM1* von vielen Laboren bereits in Panels zur Ataxiediagnostik eingebunden. Die in unserer Untersuchung gewonnenen Informationen legen nahe, dass Mutationen in *GRM1* eher selten Ursache für Ataxien sind. Da sie aber generell vorkommen können, wie anhand einer nachgewiesenen Klasse 3 Variante im hier untersuchten Kollektiv und den von Watson et al. vorgeschriebenen Mutationen gezeigt werden konnte, erscheint die Einbettung des Gens in entsprechende Panels als kostengünstige Alternative zur Einzelgentestung sinnvoll. Die Durchführung einer entsprechenden Diagnostik sollte jedoch im Einzelfall vom Arzt sowie dem Patienten mit Blick auf die Konsequenzen abgewogen werden, da nur bei wenigen SCAs eine therapeutische Konsequenz besteht. SCA44 kann hierbei eine besondere Rolle einnehmen, da für Nitazoxanid in Studien bereits eine allosterisch inhibierende Wirkung auf mGluR1 gezeigt werden konnte, welche in Zukunft bei gain of function Mutationen therapeutische Anwendung finden könnte (Watson et al. 2017). Neben der Möglichkeit therapeutischer Konsequenzen sollte bei der Abwägung der psychologische Effekt bedacht werden, der mit einer gesicherten Diagnose einhergeht und für den Patienten ein Gewinn sein kann.

Neben ausgewählten Genpanels ist es mittlerweile möglich, das gesamte Exom in einer einzigen Untersuchung zu sequenzieren. Das sogenannte Whole Exome Sequencing (WES) ist für die klinische Ataxiediagnostik als Methode der ersten Wahl nicht zu empfehlen, da neben Veränderungen in Ataxie-assoziierten Genen auch Mutationen in sämtlichen anderen Genen nachgewiesen werden können. Stiziel und Kollegen geben

die Anzahl nicht-synonymer, nicht vorbeschriebener Varianten bei einer einzigen WES-Untersuchung mit 200-500 an (Stitzel et al. 2011). Das Ausschließen dieser Varianten als Krankheitsursache ist teuer und zeitaufwendig, und es muss nicht mit dem Stellen einer sicheren Diagnose einhergehen oder therapeutische Konsequenzen nach sich ziehen.

#### **4.7 Ausblick**

Der potentiell positive psychologische Effekt der mit der Stellung einer gesicherten Diagnose einhergehen kann, ist einer der Gründe, warum es sinnvoll ist nach möglichen krankheitsverursachenden Mutationen zu suchen. Trotz der ethischen Bedenken, die mit der Anwendung von Whole Exome Sequencing zur Ataxiediagnostik einhergehen, ist sein Einsatz insbesondere bei gesicherten familiären Ataxie-Erkrankungen sinnvoll und kann zur Identifikation seltener Mutationen sowohl in bereits bekannten, als auch neu identifizierten SCA-assoziierten Loci führen. Darüber hinaus würden weitere Untersuchungen zur Identifikation nachweislich pathogener Mutationen in *GRM1* dabei helfen, die Prävalenz der SCA 44 genauer einzuschätzen. Weiterhin kann bei Mutationsnachweis eines Indexpatienten nachfolgend eine vereinfachte familiäre Testung durchgeführt werden und somit die Diagnosestellung in einigen Fällen vor dem Auftreten erster Symptome erfolgen. Dies ist besonders relevant, da Tiermodelle nahelegen, dass ein Verhindern oder Verzögern der Krankheitsmanifestation einfacher zu erreichen sein könnte als ein Verlangsamen oder Umkehren der Krankheitsprogression (Ashizawa et al. 2018).

Die Therapie neurodegenerativer Erkrankungen ist bis dato häufig schwierig und nur selten kausal möglich. Während für einige neuere Behandlungsmethoden bereits erste Erfolge in präklinischen und klinischen Studien aufgezeigt werden konnten, ist der Pathomechanismus vieler dieser Erkrankungen noch nicht genau verstanden. Weitere Forschung in diesem Bereich ist jedoch sinnvoll, da sie zu einem besseren Krankheitsverständnis und zur Identifikation potentieller therapeutischer Targets beitragen. Der Nachweis von Einflussfaktoren, wie etwa eines modulierenden Effekt von Reparaturenzymen auf das Manifestationsalter bestimmter SCAs (Sullivan et al. 2019) oder das Aufzeigen eines gain-of-function der mGluR-Signalkaskade als Folge mancher Mutationen in *GRM1*, sind Beispiele hierfür.

Als neuere Behandlungsmethoden neurodegenerativer Erkrankungen werden unter anderem der Einsatz von Antisense-Oligonukleotiden, RNA-Interferenz und Stammzelltherapien erforscht (Tsai et al. 2017; Sullivan et al. 2019). Eine Schwierigkeit hierbei ist das Überwinden der Blut-Hirn-Schranke mit anschließender Wirkung an einem gewünschten Zielgewebe (Mathupala 2009). Während zum Überwinden der Blut-Hirn-Schranke neben der intrathekalen Applikation bereits systemische Applikationsmöglichkeiten identifiziert werden konnten (Lin et al. 2020), stellt sich die Kombination mit einer gewebsspezifischen Wirkung am Cerebellum bislang schwierig dar.

Sollte in zukünftigen Untersuchungen die Sicherheit und Wirksamkeit dieser Methoden nachgewiesen werden, so ist ihre Anwendung auch zur Therapie von SCA 44 vorstellbar. Eine weitere Schwierigkeit besteht bislang in der Beurteilung der Wirksamkeit neuer Therapien bei Ataxie. Hierzu sind objektivierbare Biomarker wünschenswert, welche die Schwere der Ataxie widerspiegeln. Für SCA 2 konnte in einer kleinen longitudinalen Studie die Neurodegeneration und somit Krankheitsprogression mittels MR-Bildgebung abgebildet werden (Mascalchi und Vella 2020). Die Anwendbarkeit auch bei SCA 44 könnte Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

## 5 Zusammenfassung

Bei der Spinocerebellären Ataxie Typ 44 handelt es sich um eine neurodegenerative Erkrankung, die auf Mutationen im *GRM1*-Gen beruht und autosomal-dominant vererbt wird. *GRM1* codiert für einen überwiegend im Gehirn, insbesondere im Cerebellum exprimierten metabotropen Glutamatrezeptor (mGluR1). Aufgrund seiner Beteiligung an der korrekten Funktionsweise des Kleinhirns und der wichtigen Rolle des Kleinhirns bei der Abmessung von Bewegungen können Mutationen in *GRM1* mit resultierender Veränderung der mGluR1-Signalkaskade Ursache für Ataxien sein. Pathogenetisch vorbeschrieben sind zwei missense Varianten, die in einem gain-of-function resultieren und eine Duplikation, die zur Bildung eines verkürzten Proteins führt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die DNA von 66 Ataxie-Patienten mit positiver Familienanamnese und zuvor ausgeschlossener Mutation in multiplen Ataxie-Loci auf Varianten in *GRM1* hin untersucht. Dies erfolgte mittels PCR-Amplifikation und anschließender Sequenzierung der acht Exone sowie der jeweils angrenzenden intronischen Bereiche.

Im untersuchten Kollektiv konnten 16 unterschiedliche SNPs nachgewiesen werden, darunter vier missense Varianten. Zwei dieser missense Varianten (c.2785G>A, p.Val929Ile; c.3214C>G, p.Pro1072Ala) konnten mittels familiärer Testung als Krankheitsursache weitgehend ausgeschlossen werden, während eine weitere Variante, c.2977T>C, p.Ser993Pro aufgrund ihrer Häufigkeit ausgeschlossen wurde.

Die Variante c.2185C>A, p.Pro729Thr wird der Klasse 3 (unklare klinische Signifikanz) nach ACMG Klassifikation zugeordnet. Diese Variante konnte bei drei Patienten des Kollektivs in Exon 7 nachgewiesen werden und verändert die Sequenz einer extrazellulären Domäne. Während die hohe Konservierung der betroffenen Aminosäure und die bioinformatische Einschätzung der Variante als schädlich für eine potentielle Pathogenität sprechen, sollte dies in funktionellen Experimenten sowie familiärer Testung noch näher untersucht werden. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass potentiell pathogene Mutationen über die bereits nachgewiesenen pathogenen Mutationen hinaus in *GRM1* bei Ataxie-Patienten gefunden werden können. Die Testung auf entsprechende Mutationen sollte im Rahmen einer Stufendiagnostik, nach Ausschluss häufigerer Ataxie-Typen angeboten werden.

## 5.1 Summary

Spinocerebellar ataxia 44 (SCA44) is an autosomal dominant inherited neurodegenerative disorder, caused by mutations in the *GRM1* gene. *GRM1* codes for a metabotropic glutamate receptor (mGluR1) that is mainly expressed in brain cells, especially the cerebellum. Due to its involvement in proper functioning of the cerebellum, i.e. in adjusting and balancing movement commands, mutations in *GRM1* with resulting changes in the mGluR1-signalling cascade may be the cause of ataxia. Two different missense mutations resulting in gain-of-function and a duplication leading to the formation of a truncated protein have been previously described.

In this study, the DNA of 66 patients with ataxia, a positive family history, and exclusion of multiple SCA-associated gene loci was examined for mutations in *GRM1*. This was done by PCR-amplification and sequencing of the eight exons and their adjacent intronic regions.

16 SNPs were found, four of which being missense variants. Two of these missense variants (c.2785G>A, p.Val929Ile; c.3214C>G, p.Pro1072Ala) could be widely excluded as causes of disease by familial testing.

The variant c.2185C>A, p.Pro729Thr, a variant of unknown clinical significance, was detected in exon 7 in three patients of the collective and alters the sequence of an extracellular domain. While the high conservation of the affected amino acid and the bioinformatic assessment of the variant as deleterious suggest potential pathogenicity, this should be further investigated in functional experiments as well as familial testing. The present study shows that potentially pathogenic mutations can be found in *GRM1* in ataxia patients beyond those already demonstrated to be pathogenic. Testing for *GRM1* mutations should be offered as part of the diagnostic workflow, after exclusion of more common types of ataxia.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

*	Stoppcodon
µl	Mikroliter
A	Adenin
ACMG	American College of Medical Genetics and Genomics
ADCA	autosomal-dominante cerebelläre Ataxie
Ala	Alanin
ARCA	autosomal recessive cerebellar ataxias
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
C	Cytosin
c.	Position in der codieren Region der Basensequenz
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary DNA
Cys	Cystein
DAG	Diacylglycerin
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DRPLA	Dentatorubro-Pallidoluyische Atrophie
dsDNA	Doppelstrang-DNA
dup	Duplikation
EA	episodische Ataxie
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FRDA	Friedreich Ataxie
fs	frame shift
FXTAS	Fragiles-X-assoziiertes-Tremor-Ataxie-Syndrom
g	mittlere Erdbeschleunigung
G	Guanin
Gly	Glycin
<i>GRM1</i>	Metabotroper Glutamatrezeptor 1 - Gen
H <sub>2</sub> O	Wasser
HGVS	Human Genome Variation Society
IARC	International Agency for Cancer Research
iGluR	ionotroper Glutamatrezeptor
Ile	Isoleucin
IP3	Inositoltriphosphat
KSS	Kearns-Sayre-Syndrom
LBSL	Leukoencephalopathy with brainstem and spinal cord involvement and elevated lactate
LTD	long-term depression, Langzeit-Depression
Lys	Lysin
mA	Milliampere
MAF	Minor allele frequency

MERRF	myoclonic epilepsy with ragged red fiber
mGluR1	Metabotroper Glutamatrezeptor 1 - Protein
MILS	maternally inherited Leigh's syndrome
MIRAS	mitochondriales rezessives Ataxiesyndrom
MR	Magnet-Resonanz
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MSA-C	Multisystematrophie vom zerebellären Typ
MSA-P	Multisystematrophie vom Parkinson-Typ
<i>mtATP6</i>	mitochondrially encoded ATP synthase 6
mtDNA	mitochondriale DNA
NARP	Neuropathie, Ataxie, Retinopathia Pigmentosa
NGS	next generation sequencing
NMR	nuclear magnetic resonance
OD	optische Dichte
OH	Hydroxylgruppe
p.	Position in der Aminosäuresequenz des Proteins
PCD	Paraneoplastic cerebellar degeneration
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
<i>POLG</i>	Polymerase-Gamma-Gen
prä-mRNA	heterogene nukleäre RNA
Pro Prolin	Prolin
Q	Glutamin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	revolutions per minute
rs	Reference SNP cluster ID
SANDO Syndrom	Sensorische ataktische Neuropathie, Dysarthrie und Ophthalmoplegie-
SAOA	Sporadic adult onset ataxia of unknown aetiology
SCA	Spinocerebelläre Ataxie
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SPAX	spastische Ataxie
T	Thymin
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
Thr	Threonin
Tyr	Tyrosin
U	Uracil
UTR	Untranslatierte Region, Untranslatierte Region
UV	ultraviolett
Val	Valin
WES	whole-exome sequencing
WGS	whole-genome sequencing
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>GRM1</i> -Transkriptvarianten nach ensembl.org .....	18
Abbildung 2: <i>GRM1</i> -Genexpression in verschiedenen Geweben .....	19
Abbildung 3: Struktur der Glutamatrezeptoren - ionotrope und metabotrope Glutamatrezeptoren .....	20
Abbildung 4: mGluR1 - Domänen .....	20
Abbildung 5 Ausschnitt des Aminosäure-Sequenzalignments der mGluR1-Sequenz um die hochkonservierte Position 262 (rot markiert) und Position 792 (blau markiert); .....	21
Abbildung 6: Schematische Darstellung der PCR .....	30
Abbildung 7: Agarose-Gelelektrophorese. Bandendarstellung der PCR-Produkte (511bp), PCR-Negativkontrolle N aufgetragen gegen Größenstandard M (100-3000bp).....	33
Abbildung 8: Schematische Darstellung der DNA-Sequenzierung nach Sanger .....	35
Abbildung 9: Beispielsequenz aus <i>GRM1</i> Exon 8, Patient 970 .....	36
Abbildung 10: Nachweis von <i>GRM1</i> -Transkripten in verschiedenen humanen Geweben.....	41
Abbildung 11: Sequenzausschnitt aus <i>GRM1</i> , Exon1, um c.147.....	43
Abbildung 12: Sequenzausschnitt aus <i>GRM1</i> , Exon 4 und Intron 4, um c.1433+10.....	44
Abbildung 13: Sequenzausschnitt aus <i>GRM1</i> , Intron 4, um c.1434-30 .....	45
Abbildung 14: Sequenzausschnitt aus <i>GRM1</i> , Intron 5, um c.1602+52 .....	46
Abbildung 15: Sequenzausschnitt aus <i>GRM1</i> , Intron 5, um c.1603-33 .....	47
Abbildung 16: Sequenzausschnitt aus <i>GRM1</i> , Intron 6, um c.1730-22 .....	48
Abbildung 17: Ausschnitt des Aminosäure-Sequenzalignments der mGluR1-Sequenz um Position 729 (rot markiert) .....	49
Abbildung 18: Sequenzausschnitt aus <i>GRM1</i> , Exon 7, um c.2185.....	49
Abbildung 19: Sequenzausschnitt aus <i>GRM1</i> , Intron 7, um c.2661-44 .....	50
Abbildung 20: Ausschnitt des Aminosäure-Sequenzalignments der mGluR1-Sequenz um Position 929 (rot markiert) .....	51
Abbildung 21: Sequenzausschnitt aus <i>GRM1</i> , Exon 8, um c.2785 und c.2793 .....	52
Abbildung 22: Sequenzausschnitt aus <i>GRM1</i> , Exon 8, um c.2922.....	53
Abbildung 23: Sequenzausschnitt aus <i>GRM1</i> , Exon 8, um c.2977 .....	54
Abbildung 24: Sequenzausschnitt aus <i>GRM1</i> , Exon 8, um c.3168 und c.3213 .....	56
Abbildung 25: Ausschnitt des Aminosäure-Sequenzalignments der mGluR1-Sequenz um Position 1072 (rot markiert) .....	57

Abbildung 26: Sequenzausschnitt aus <i>GRMI</i> , Exon 8, um c.3214.....	57
Abbildung 27: Sequenzausschnitt aus <i>GRMI</i> , Exon 8, um c.*14.....	58
Abbildung 28: Stammbaum Patient 453.1.....	61
Abbildung 29: Sequenzausschnitt aus <i>GRMI</i> , Exon 8, um c.2785, Familie 453.....	62
Abbildung 30: Stammbaum Patient 1119.1 .....	64
Abbildung 31: Sequenzausschnitt aus <i>GRMI</i> , Exon 8, um c.3214, Familie 1119.....	64

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der Spinocerebellären Ataxien mit zugrunde liegender Repeat-Expansion, modifiziert nach (Ashizawa et al. 2018) .....	13
Tabelle 2: Überblick über die SCA-Subtypen, die assoziierten Gene, Genloci, Proteine und Mutationen .....	14
Tabelle 3: Geräte & Gebrauchsgegenstände .....	23
Tabelle 4: Verbrauchsartikel .....	24
Tabelle 5: Chemikalien, Puffer und Lösungen.....	24
Tabelle 6: Größenstandard .....	25
Tabelle 7: Kits und Enzyme .....	25
Tabelle 8: <i>GRMI</i> -Primer .....	25
Tabelle 9: Software und Datenbanken .....	26
Tabelle 10: Mastermix 1 der cDNA-Synthese für 6 Proben .....	28
Tabelle 11: Mastermix 2 der cDNA-Synthese für 6 Proben .....	29
Tabelle 12: Mastermix <i>GRMI</i> -PCR Exon 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, cDNA .....	31
Tabelle 13: Mastermix <i>GRMI</i> -PCR Exon 3 .....	31
Tabelle 14: PCR-Grundbedingungen .....	31
Tabelle 15: PCR-Spezifikationen.....	32
Tabelle 16: Sequenzieransatz .....	36
Tabelle 17: <i>GRMI</i> -Sequenzierprimer .....	36
Tabelle 18: Sequenzierbedingungen .....	37
Tabelle 19: Verteilung der beobachteten Genotypen (TT, TG, GG) bei <i>GRMI</i> c.3168 im untersuchten Kollektiv .....	55
Tabelle 20: Verteilung der beobachteten Genotypen (TT, TG, GG) bei c.3213.....	55
Tabelle 21: Zusammenstellung aller gefundenen Varianten im <i>GRMI</i> -Gen.....	59

## 9 Literaturverzeichnis

Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR (2010) A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature methods* 7:248–249. doi:10.1038/nmeth0410-248.

Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson AD, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2014) *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*. [John Wiley and Sons], [Place of publication not identified]

Ashizawa T, Xia G (2016) Ataxia. *Continuum (Minneapolis, Minn.)* 22:1208–1226. doi:10.1212/CON.0000000000000362

Ashizawa T, Öz G, Paulson HL (2018) Spinocerebellar ataxias: prospects and challenges for therapy development. *Nature reviews. Neurology* 14:590–605. doi:10.1038/s41582-018-0051-6

Ayhan F, Ikeda Y, Dalton JC, Day JW, Ranum LPW (2014) *Spinocerebellar Ataxia Type 8*, Seattle (WA)

Ayoub MA, Angelicheva D, Vile D, Chandler D, Morar B, Cavanaugh JA, Visscher PM, Jablensky A, Pflieger KDG, Kalaydjieva L (2012) Deleterious GRM1 mutations in schizophrenia. *PloS one* 7:e32849. doi:10.1371/journal.pone.0032849

Bacchelli E, Cainazzo MM, Cameli C, Guerzoni S, Martinelli A, Zoli M, Maestrini E, Pini LA (2016) A genome-wide analysis in cluster headache points to neprilysin and PACAP receptor gene variants. *The journal of headache and pain* 17:114. doi:10.1186/s10194-016-0705-y

Beaudin M, Klein CJ, Rouleau GA, Dupré N (2017) Systematic review of autosomal recessive ataxias and proposal for a classification. *Cerebellum & ataxias* 4:3. doi:10.1186/s40673-017-0061-y

Becker EBE (2014) The Moonwalker mouse: new insights into TRPC3 function, cerebellar development, and ataxia. *Cerebellum (London, England)* 13:628–636. doi:10.1007/s12311-014-0564-5

Bekri S, D'Hooghe M, Vermeersch P (2014) GeneReviews®; X-Linked Sideroblastic Anemia and Ataxia, Seattle (WA)

Bird TD (2019) Hereditary Ataxia Overview; GeneReviews, Seattle (WA)

Budworth H, McMurray CT (2013) A Brief History of Triplet Repeat Diseases. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) 1010:3–17. doi:10.1007/978-1-62703-411-1\_1

Bürk K (2016) Ataxien. In: Hacke W (Hrsg) *Neurologie*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S 625–643

Campuzano V, Montermini L, Moltò MD, Pianese L, Cossée M, Cavalcanti F, Monros E, Rodius F, Duclos F, Monticelli A, Zara F, Cañizares J, Koutnikova H, Bidichandani SI, Gellera C, Brice A, Trouillas P, Michele G de, Filla A, Frutos R de, Palau F, Patel PI, Di Donato S, Mandel JL, Coccozza S, Koenig M, Pandolfo M (1996) Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* (New York, N.Y.) 271:1423–1427. doi:10.1126/science.271.5254.1423

Chatterjee S, Ahituv N (2017) Gene Regulatory Elements, Major Drivers of Human Disease. *Annual review of genomics and human genetics* 18:45–63. doi:10.1146/annurev-genom-091416-035537

Chinnery PF (2014) GeneReviews®; Mitochondrial Disorders Overview, Seattle (WA)

Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP (2012) Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PloS one* 7:e46688. doi:10.1371/journal.pone.0046688

Coarelli G, Brice A, Durr A (2018) Recent advances in understanding dominant spinocerebellar ataxias from clinical and genetic points of view. *F1000Research* 7. doi:10.12688/f1000research.15788.1.

Cook A, Giunti P (2017) Friedreich's ataxia: clinical features, pathogenesis and management. *British medical bulletin* 124:19–30. doi:10.1093/bmb/ldx034

Copani A, Bruno VM, Barresi V, Battaglia G, Condorelli DF, Nicoletti F (1995) Activation of metabotropic glutamate receptors prevents neuronal apoptosis in culture. *Journal of neurochemistry* 64:101–108. doi:10.1046/j.1471-4159.1995.64010101.x

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* 9:329. doi:10.3389/fphys.2018.00329

Davarniya B, Hu H, Kahrizi K, Musante L, Fattahi Z, Hosseini M, Maqsoud F, Farajollahi R, Wienker TF, Ropers HH, Najmabadi H (2015) The Role of a Novel TRMT1 Gene Mutation and Rare GRM1 Gene Defect in Intellectual Disability in Two Azeri Families. *PloS one* 10:e0129631. doi:10.1371/journal.pone.0129631

Dhir A, Buratti E (2010) Alternative splicing: role of pseudoexons in human disease and potential therapeutic strategies. *The FEBS journal* 277:841–855. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07520.x

Dryer SE (2015) Glutamate receptors in the kidney. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 30:1630–1638. doi:10.1093/ndt/gfv028

Duarri A, Jezierska J, Fokkens M, Meijer M, Schelhaas HJ, den Dunnen WFA, van Dijk F, Verschuuren-Bemelmans C, Hageman G, van de Vlies P, Küsters B, van de Warrenburg BP, Kremer B, Wijmenga C, Sinke RJ, Swertz MA, Kampinga HH, Boddeke E, Verbeek DS (2012) Mutations in potassium channel *kcnd3* cause spinocerebellar ataxia type 19. *Annals of neurology* 72:870–880. doi:10.1002/ana.23700

Edener U, Bernard V, Hellenbroich Y, Gillessen-Kaesbach G, Zühlke C (2011) Two dominantly inherited ataxias linked to chromosome 16q22.1: SCA4 and SCA31 are not allelic. *Journal of neurology* 258:1223–1227. doi:10.1007/s00415-011-5905-4.

Ewers M (25.08.2016) PCR Zyklus. <https://www.uni-bielefeld.de/teutolab/fachorientiert/biotechnologie/Arbeitsmaterial/PCR-Zyklus>. Zugegriffen: 12. Februar 2020

Filla A, Michele G de, Cavalcanti F, Pianese L, Monticelli A, Campanella G, Coccozza S (1996) The relationship between trinucleotide (GAA) repeat length and clinical features in Friedreich ataxia. *American Journal of Human Genetics* 59:554–560

Finsterer J (2009) Mitochondrial ataxias. *The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques* 36:543–553. doi:10.1017/s0317167100008027

Frank RAW, McRae AF, Pocklington AJ, van de Lagemaat LN, Navarro P, Croning MDR, Komiyama NH, Bradley SJ, Challiss RAJ, Armstrong JD, Finn RD, Malloy MP, MacLean AW, Harris SE, Starr JM, Bhaskar SS, Howard EK, Hunt SE, Coffey AJ, Ranganath V, Deloukas P, Rogers J, Muir WJ, Deary IJ, Blackwood DH, Visscher PM, Grant SGN (2011) Clustered coding variants in the glutamate receptor complexes of individuals with schizophrenia and bipolar disorder. *PloS one* 6:e19011. doi:10.1371/journal.pone.0019011

Friedman KJ, Kole J, Cohn JA, Knowles MR, Silverman LM, Kole R (1999) Correction of aberrant splicing of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene by antisense oligonucleotides. *The Journal of biological chemistry* 274:36193–36199. doi:10.1074/jbc.274.51.36193

García-Murias M, Quintáns B, Arias M, Seixas AI, Cacheiro P, Tarrío R, Pardo J, Millán MJ, Arias-Rivas S, Blanco-Arias P, Dapena D, Moreira R, Rodríguez-Trelles F, Sequeiros J, Carracedo A, Silveira I, Sobrido MJ (2012) 'Costa da Morte' ataxia is spinocerebellar ataxia 36: clinical and genetic characterization. *Brain : a journal of neurology* 135:1423–1435. doi:10.1093/brain/aws069

Gilman S, Wenning GK, Low PA, Brooks DJ, Mathias CJ, Trojanowski JQ, Wood NW, Colosimo C, Dürr A, Fowler CJ, Kaufmann H, Klockgether T, Lees A, Poewe W, Quinn N, Revesz T, Robertson D, Sandroni P, Seppi K, Vidailhet M (2008) Second consensus statement on the diagnosis of multiple system atrophy. *Neurology* 71:670–676. doi:10.1212/01.wnl.0000324625.00404.15

Graus F, Saiz A, Dalmau J (2010) Antibodies and neuronal autoimmune disorders of the CNS. *Journal of neurology* 257:509–517. doi:10.1007/s00415-009-5431-9

Guergueltcheva V, Azmanov DN, Angelicheva D, Smith KR, Chamova T, Florez L, Bynevelt M, Nguyen T, Cherninkova S, Bojinova V, Kaprelyan A, Angelova L, Morar B, Chandler D, Kaneva R, Bahlo M, Tournev I, Kalaydjieva L (2012) Autosomal-recessive congenital cerebellar ataxia is caused by mutations in metabotropic glutamate receptor 1. *American Journal of Human Genetics* 91:553–564. doi:10.1016/j.ajhg.2012.07.019

Harding AE (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 : a journal of neurology* 104:589–620. doi:10.1093/brain/104.3.589

Harding AE (1982) The clinical features and classification of the late onset autosomal dominant cerebellar ataxias. A study of 11 families, including descendants of the 'the Drew family of Walworth'. *Brain : a journal of neurology* 105:1–28. doi:10.1093/brain/105.1.1

Hartmann J, Dragicevic E, Adelsberger H, Henning HA, Sumser M, Abramowitz J, Blum R, Dietrich A, Freichel M, Flockerzi V, Birnbaumer L, Konnerth A (2008) TRPC3 channels are required for synaptic transmission and motor coordination. *Neuron* 59:392–398. doi:10.1016/j.neuron.2008.06.009

Hartmann J, Henning HA, Konnerth A (2011) mGluR1/TRPC3-mediated Synaptic Transmission and Calcium Signaling in Mammalian Central Neurons. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3. doi:10.1101/cshperspect.a006726

Hentsch S (2017) Pschyrembel Online | Ataxie. <https://www.pschyrembel.de/Ataxie/K033G/doc/>. Zugegriffen: 31. März 2020

Hersheson J, Haworth A, Houlden H (2012) The inherited ataxias: genetic heterogeneity, mutation databases, and future directions in research and clinical diagnostics. *Human mutation* 33:1324–1332. doi:10.1002/humu.22132

Jansohn M, Rothhämel S (2012) *Gentechnische Methoden; Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. Spektrum Akademischer Verlag; Imprint, Heidelberg

Jen JC, Graves TD, Hess EJ, Hanna MG, Griggs RC, Baloh RW (2007) Primary episodic ataxias: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Brain : a journal of neurology* 130:2484–2493. doi:10.1093/brain/awm126

Kano M, Hashimoto K, Tabata T (2008) Type-1 metabotropic glutamate receptor in cerebellar Purkinje cells: a key molecule responsible for long-term depression, endocannabinoid signalling and synapse elimination. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 363:2173–2186. doi:10.1098/rstb.2008.2270

Kelleher RJ, Geigenmüller U, Hovhannisyan H, Trautman E, Pinard R, Rathmell B, Carpenter R, Margulies D (2012) High-throughput sequencing of mGluR signaling pathway genes reveals enrichment of rare variants in autism. *PloS one* 7:e35003. doi:10.1371/journal.pone.0035003

- Kim JS, Cho JW (2015) Hereditary Cerebellar Ataxias: A Korean Perspective. *Journal of movement disorders* 8:67–75. doi:10.14802/jmd.15006
- Klockgether T (2018a) Ataxien-des-Erwachsenenalters; Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. [www.dgn.org/leitlinien](http://www.dgn.org/leitlinien). Zugegriffen: 01. April 2020
- Klockgether T (2018b) Sporadic adult-onset ataxia. *Handbook of clinical neurology* 155:217–225. doi:10.1016/B978-0-444-64189-2.00014-7
- Kritis AA, Stamoula EG, Paniskaki KA, Vavilis TD (2015) Researching glutamate - induced cytotoxicity in different cell lines: a comparative/collective analysis/study. *Frontiers in cellular neuroscience* 9:91. doi:10.3389/fncel.2015.00091
- Lin J, Jo SB, Kim T-H, Kim H-W, Chew SY (2020) RNA interference in glial cells for nerve injury treatment. *Journal of tissue engineering* 11:2041731420939224. doi:10.1177/2041731420939224
- Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Bretscher A, Ploegh H, Amon A, Martin KC (2016) *Molecular cell biology*. W. H. Freeman and Co, New York
- Lykke-Andersen S, Jensen TH (2015) Nonsense-mediated mRNA decay: an intricate machinery that shapes transcriptomes. *Nature reviews. Molecular cell biology* 16:665–677. doi:10.1038/nrm4063.
- Manto M (2012) Toxic agents causing cerebellar ataxias. *Handbook of clinical neurology* 103:201–213. doi:10.1016/B978-0-444-51892-7.00012-7
- Mascalchi M, Vella A (2020) Neuroimaging Biomarkers in SCA2 Gene Carriers. *International journal of molecular sciences* 21. doi:10.3390/ijms21031020
- Mathupala SP (2009) Delivery of small-interfering RNA (siRNA) to the brain. *Expert opinion on therapeutic patents* 19:137–140. doi:10.1517/13543770802680195
- Matilla-Dueñas A, Volpini V (2019) *Spinocerebellar Ataxia Type 37*, Seattle (WA)
- Matsuura T, Ashizawa T (2019) *Spinocerebellar Ataxia Type 10*, Seattle (WA)
- Meera P, Pulst SM, Otis TS (2016) Cellular and circuit mechanisms underlying spinocerebellar ataxias. *The Journal of physiology* 594:4653–4660. doi:10.1113/JP271897

Moseley ML, Zu T, Ikeda Y, Gao W, Mosemiller AK, Daughters RS, Chen G, Weatherspoon MR, Clark HB, Ebner TJ, Day JW, Ranum LPW (2006) Bidirectional expression of CUG and CAG expansion transcripts and intranuclear polyglutamine inclusions in spinocerebellar ataxia type 8. *Nature genetics* 38:758–769. doi:10.1038/ng1827

Mülhardt C (2013) *Der Experimentator Molekularbiologie Genomics*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg

Müller H-J (2016) *PCR - Polymerase-Kettenreaktion*. Springer Spektrum, Heidelberg

Orr HT, Chung MY, Banfi S, Kwiatkowski TJ, Servadio A, Beaudet AL, McCall AE, Duvick LA, Ranum LP, Zoghbi HY (1993) Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Nature genetics* 4:221–226. doi:10.1038/ng0793-221

Palau F, Espinós C (2006) Autosomal recessive cerebellar ataxias. *Orphanet journal of rare diseases* 1:47. doi:10.1186/1750-1172-1-47

Pfeffer G, Blakely EL, Alston CL, Hassani A, Boggild M, Horvath R, Samuels DC, Taylor RW, Chinnery PF (2012) Adult-onset spinocerebellar ataxia syndromes due to MTATP6 mutations. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 83:883–886. doi:10.1136/jnnp-2012-302568

Plon SE, Eccles DM, Easton D, Foulkes WD, Genuardi M, Greenblatt MS, Hogervorst FBL, Hoogerbrugge N, Spurdle AB, Tavtigian SV (2008) Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. *Human mutation* 29:1282–1291. doi:10.1002/humu.20880

Prober JM, Trainor GL, Dam RJ, Hobbs FW, Robertson CW, Zagursky RJ, Cocuzza AJ, Jensen MA, Baumeister K (1987) A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science (New York, N.Y.)* 238:336–341. doi:10.1126/science.2443975

Rath A, Nguengang Wakap S (2020) Prävalenz seltener Krankheiten : Bibliographische Angaben; Prävalenzen, Inzidenzen oder Anzahl publizierter Fälle sortiert nach Krankheiten (Alphabetische Liste). [http://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/DE/Pravalenzen\\_seltener\\_Krankheiten\\_Alphabetische\\_Liste.pdf](http://www.orpha.net/orphacom/cahiers/docs/DE/Pravalenzen_seltener_Krankheiten_Alphabetische_Liste.pdf)

Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL (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 : official journal of the American College of Medical Genetics* 17:405–424. doi:10.1038/gim.2015.30

Rossenbacker T, Schollen E, Kuipéri C, Ravel TJL de, Devriendt K, Matthijs G, Collen D, Heidebüchel H, Carmeliet P (2005) Unconventional intronic splice site mutation in SCN5A associates with cardiac sodium channelopathy. *Journal of medical genetics* 42:e29. doi:10.1136/jmg.2004.029058

Rossi PIA, Vaccari CM, Terracciano A, Doria-Lamba L, Facchinetti S, Priolo M, Ayuso C, Jorge L de, Gimelli S, Santorelli FM, Ravazzolo R, Puliti A (2010) The metabotropic glutamate receptor 1, GRM1: evaluation as a candidate gene for inherited forms of cerebellar ataxia. *Journal of neurology* 257:598–602. doi:10.1007/s00415-009-5380-3

Ruano L, Melo C, Silva MC, Coutinho P (2014) The global epidemiology of hereditary ataxia and spastic paraplegia: a systematic review of prevalence studies. *Neuroepidemiology* 42:174–183. doi:10.1159/000358801

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science (New York, N.Y.)*:1350–1354. doi:10.1126/science.2999980

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)* 239:487–491. doi:10.1126/science.2448875

Sakai H, Yoshida K, Shimizu Y, Morita H, Ikeda S-i, Matsumoto N (2010) Analysis of an insertion mutation in a cohort of 94 patients with spinocerebellar ataxia type 31 from Nagano, Japan. *Neurogenetics* 11:409–415. doi:10.1007/s10048-010-0245-6

Salman MS (2018) Epidemiology of Cerebellar Diseases and Therapeutic Approaches. *Cerebellum (London, England)* 17:4–11. doi:10.1007/s12311-017-0885-2.

Sandford E, Burmeister M (2014) Genes and genetic testing in hereditary ataxias. *Genes* 5:586–603. doi:10.3390/genes5030586

Sanger F, Nicklen S, Coulson A (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74:5463–5467. doi:10.1073/pnas.74.12.5463

Scheefhals N, MacGillavry HD (2018) Functional organization of postsynaptic glutamate receptors. *Molecular and cellular neurosciences* 91:82–94. doi:10.1016/j.mcn.2018.05.002

Shakkottai VG, Fogel BL (2013) Clinical neurogenetics: autosomal dominant spinocerebellar ataxia. *Neurologic clinics* 31:987–1007. doi:10.1016/j.ncl.2013.04.006

Shaul O (2017) How introns enhance gene expression. *The international journal of biochemistry & cell biology* 91:145–155. doi:10.1016/j.biocel.2017.06.016.

Sillevis Smitt P, Kinoshita A, Leeuw B de, Moll W, Coesmans M, Jaarsma D, Henzen-Logmans S, Vecht C, Zeeuw C de, Sekiyama N, Nakanishi S, Shigemoto R (2000) Paraneoplastic cerebellar ataxia due to autoantibodies against a glutamate receptor. *The New England journal of medicine* 342:21–27. doi:10.1056/NEJM200001063420104

Stitzel NO, Kiezun A, Sunyaev S (2011) Computational and statistical approaches to analyzing variants identified by exome sequencing. *Genome biology* 12:227. doi:10.1186/gb-2011-12-9-227

Storey E, Bahlo M, Fahey M, Sisson O, Lueck CJ, Gardner RJM (2009) A new dominantly inherited pure cerebellar ataxia, SCA 30. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 80:408–411. doi:10.1136/jnnp.2008.159459

Storey E (2014) Genetic cerebellar ataxias. *Seminars in neurology* 34:280–292. doi:10.1055/s-0034-1386766.

Suh YH, Chang K, Roche KW (2018) Metabotropic glutamate receptor trafficking. *Molecular and cellular neurosciences* 91:10–24. doi:10.1016/j.mcn.2018.03.014

Sullivan R, Yau WY, O'Connor E, Houlden H (2019) Spinocerebellar ataxia: an update. *Journal of neurology* 266:533–544. doi:10.1007/s00415-018-9076-4

Tiselius A (1937) A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures. *Trans. Faraday Soc.* 33:524. doi:10.1039/TF9373300524

Tsai Y-A, Liu R-S, Lirng J-F, Yang B-H, Chang C-H, Wang Y-C, Wu Y-S, Ho JH-C, Lee OK, Soong B-W (2017) Treatment of Spinocerebellar Ataxia With Mesenchymal Stem Cells: A Phase I/IIa Clinical Study. *Cell transplantation* 26:503–512. doi:10.3727/096368916X694373

Tsuji S, Onodera O, Goto J, Nishizawa M (2008) Sporadic ataxias in Japan--a population-based epidemiological study. *Cerebellum (London, England)* 7:189–197. doi:10.1007/s12311-008-0028-x.

Wallace SE, Bird TD (2018) Molecular genetic testing for hereditary ataxia: What every neurologist should know. *Neurology. Clinical practice* 8:27–32. doi:10.1212/CPJ.0000000000000421

Watanabe H, Saito Y, Terao S, Ando T, Kachi T, Mukai E, Aiba I, Abe Y, Tamakoshi A, Doyu M, Hirayama M, Sobue G (2002) Progression and prognosis in multiple system atrophy: an analysis of 230 Japanese patients. *Brain : a journal of neurology* 125:1070–1083. doi:10.1093/brain/awf117

Watson LM, Bamber E, Schnekenberg RP, Williams J, Bettencourt C, Lickiss J, Jayawant S, Fawcett K, Clokie S, Wallis Y, Clouston P, Sims D, Houlden H, Becker EBE, Németh AH (2017) Dominant Mutations in GRM1 Cause Spinocerebellar Ataxia Type 44. *American Journal of Human Genetics* 101:451–458. doi:10.1016/j.ajhg.2017.08.005

Wenning GK, Colosimo C, Geser F, Poewe W (2004) Multiple system atrophy. *The Lancet Neurology* 3:93–103. doi:10.1016/S1474-4422(03)00662-8

Zamba-Papanicolaou E, Koutsou P, Daiou C, Gaglia E, Georghiou A, Christodoulou K (2009) High frequency of Friedreich's ataxia carriers in the Paphos district of Cyprus. *Acta myologica : myopathies and cardiomyopathies : official journal of the Mediterranean Society of Myology* 28:24–26

Zambonin JL, Bellomo A, Ben-Pazi H, Everman DB, Frazer LM, Geraghty MT, Harper AD, Jones JR, Kamien B, Kernohan K, Koenig MK, Lines M, Palmer EE, Richardson R, Segel R, Tarnopolsky M, Vanstone JR, Gibbons M, Collins A, Fogel BL, Dudding-Byth T, Boycott

KM (2017) Spinocerebellar ataxia type 29 due to mutations in ITPR1: a case series and review of this emerging congenital ataxia. Orphanet journal of rare diseases 12:121. doi:10.1186/s13023-017-0672-7

Zanni G, Bertini ES (2011) X-linked disorders with cerebellar dysgenesis. Orphanet journal of rare diseases 6:24. doi:10.1186/1750-1172-6-24

Zhou Y, Danbolt NC (2014) Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996) 121:799–817. doi:10.1007/s00702-014-1180-8

### **Internetquellen**

*Zuletzt geprüft am 15.09.2021:*

[https://jan2020.archive.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000152822;r=6:146027646-146437601](https://jan2020.archive.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000152822;r=6:146027646-146437601)

<https://www.gtexportal.org/home/gene/GRM1>

[https://jan2020.archive.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSG00000152822;r=6:146027646-146437601;t=ENST00000282753](https://jan2020.archive.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSG00000152822;r=6:146027646-146437601;t=ENST00000282753)

<http://www.hgvs.org/>

<https://www.uniprot.org/uniprot/Q13255>

## 10 Erklärung zur Dissertation

„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

## **11 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Promotionsschrift unterstützt haben und ohne deren Mithilfe sie niemals zustande gekommen wäre:

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Prof. Dr. rer. nat. Dagmar Nolte für die Vergabe des Themas und die exzellente Betreuung. Fragen konnte ich immer zeitnah los werden und von den Antworten, den Tipps sowie positiver Kritik sehr profitieren und lernen.

Danke auch an die Mitarbeiter des humangenetischen Labors. Insbesondere Frau Pia Winter möchte ich herzlich danken für die gute, freundliche und auch freundschaftliche Zusammenarbeit, die Mitbenutzung ihres Labors und die zahllosen, wertvollen Tipps und Erklärungen.

Meiner Familie, ganz besonders meinen Eltern bin ich zu tiefst dankbar. Dankbar für die Unterstützung beim Anfertigen dieser Arbeit aber auch dankbar, dass sie mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglicht haben.

Weiterhin möchte ich mich bei meiner Freundin bedanken, die mich stets unterstützt und immer wieder motiviert hat.

Darüber hinaus gilt mein Dank allen Freunden und Verwandten für die Unterstützung und das Interesse an meiner Arbeit.