Häufigkeit der Spinocerebellären Ataxie Typ 11 und Mutationssuche im *TTBK2*-Gen in einem Kollektiv von Ataxie-Patienten

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

vorgelegt von Lisa Jutta Ortmann
aus Fulda

Gießen 2020

Aus dem Institut für Humangenetik unter
der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. Dagmar Nolte,
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

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

Gutachter:

Herr Prof. Dr. Neubauer

Tag der Disputation:

19.11.2020

1. EINLEITUNG 1

1.1. ATAXIE 1
1.2. KLASSIFIKATION 1
1.2.1. ERWORBENE ATAXIEN 2
1.2.2. SPORADISCHE ATAXIEN 2
1.2.3. AUTOSOMAL REZESSIV VERERBTE ATAXIEN 3
1.2.4. X-CHROMOSOMAL VERERBTE ATAXIEN 4
1.2.5. MITOCHONDRIAL VERERBTE ATAXIEN 5
1.2.6. AUTOSOMAL DOMINANT VERERBTE ATAXIEN 5
1.3. SPINOCEREBELLÄRE ATAXIEN (SCA) 6
1.3.1. GENETIK DER SCA 6
1.3.2. DEFINITIONEN 10
1.3.3. SUBTYPEN DER SCA 10
1.4. SCA11 14
1.4.1. KLINISCHER PHÄNOTYP UND PRÄVALENZ 14
1.4.2. GENETIK DER SCA 11 15
1.4.2.1. Das *Tau-Tubulin Kinase 2*-Gen (*TTBK2*) 15
1.4.2.2. Die Tau-Tubulin Kinase (TTBK) Protein-Familie 16
1.4.2.3. Bekannte Mutationen im *TTBK2*-Gen (Phänotyp SCA11) 17
1.5. AUFGABENSTELLUNG DER VORLIEGENDEN ARBEIT 19

2. MATERIALIEN 20

2.1. CHEMIKALIEN 20
2.2. ENZYME 21
2.3. PRIMER 21
2.4. KITS 23
2.5. LÖSUNGEN, PUFFER UND GRÖßENSTANDARDS 23
2.6. GERÄTE 24
2.7. VERBRAUCHSMATERIALIEN 26
2.8. COMPUTERPROGRAMME 26

3. METHODEN 27

3.1. DNA-EXTRAKTION AUS BLUT 27
3.2. POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR) 28

3.3. GELELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG DER PCR-PRODUKTE 32
3.3.1. ANALYTISCHES AGAROSE-GEL 32
3.3.2. PRÄPARATIVES AGAROSE-GEL 34
3.4. REINIGUNG VON PCR-PRODUKTEN 34
3.4.1. REINIGUNGSKIT OLS OMNI LIFE SCIENCE GMBH 34
3.4.2. EXTRAKTION AUS AGAROSE-GEL (QIAGEN KIT) 35
3.4.3. ENZYMATISCHE AUFREINIGUNG EXO-SAP1 36
3.5. DNA-SEQUENZIERUNG 36
3.5.1. GRUNDLAGEN DER SEQUENZIERUNG 36
3.5.2. DURCHFÜHRUNG DER SEQUENZIERUNG 37
3.5.3. AUFREINIGUNG DER SEQUENZIERUNGSREAKTION 38
3.5.4. DATENAUSWERTUNG DER SEQUENZIERUNG 39

4. ERGEBNISSE 41

4.1. STUDIENPOPULATION 41
4.2. ANGABE DER ORIENTIERUNG 42
4.3. DARSTELLUNG DER EXONS OHNE SEQUENZVARIANTEN 42
4.4. EXONS MIT SEQUENZVARIANTEN 42
4.4.1. EXON 2 43
I. C.-67G>A, RS16957250 43
II. C.-37T>C, RS6493068 44
4.4.2. EXON 11 46
III. C.1665_1821DEL157, P.555QFS*46 46
IV. C.1799G>C, P.SER600THR, RS550845568 48
4.4.3. EXON 12 49
V. C.2019-52G>A, RS16957168 49
4.4.4. EXON 18 51
VI. C.4635A>G, P.PRO1545=, RS201347313 51
4.5. ÜBERSICHT IN DIESER ARBEIT NACHGEWIESENER VARIANTEN 52

5. DISKUSSION 53

5.1. HÄUFIGKEIT DER SCA11 53
5.2. GENETIK DER SCA11 54
5.2.1. BEKANNTE MUTATIONEN IN *TTBK2* 54

5.3. IDENTIFIZIERTE SEQUENZVARIANTEN IM NICHT CODIERENDEN BEREICH DES *TTBK2*-GENS 55
5.4. IDENTIFIZIERTE SEQUENZVARIANTEN IM CODIERENDEN BEREICH DES *TTBK2*-GENS 57
5.4.1. EXON 18 57
5.4.2. EXON 11 C.1665_1821DEL157, P.555QFS*46 58
5.4.3. EXON 11 C.1799G>C, P.SER600THR 59
5.5. DER C-TERMINUS DER TTBK2 61
5.6. EMPFEHLUNGEN ZUR MOLEKULARGENETISCHEN TESTUNG 63
5.7. AUSBLICK 66
5.7.1. SCA-DIAGNOSTIK 66
5.7.2. THERAPIE DER SCAS 66
5.7.3. HERAUSFORDERUNG DER SCA11 67

6. ZUSAMMENFASSUNG 68

7. SUMMARY 69

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 70

8.1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 70
8.2. BUCHSTABENCODE AMINOSÄUREN 73

9. ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS 74

9.1. ABBILDUNGSVERZEICHNIS 74
9.2. TABELLENVERZEICHNIS 75

10. LITERATURVERZEICHNIS 76

10.1. PUBLIKATIONEN 76
10.2. INTERNETSEITEN (ZULETZT GEPRÜFT AM 27.12.2019) 82

11. KONGRESSBEITRÄGE 83

12. ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION 84

13. DANKSAGUNG 85

14. LEBENSLAUF 86

1. Einleitung

1.1. Ataxie

Ataxie ist der Überbegriff eines neurologisch cerebellären Krankheitsbildes, bei dem es zu einer Beeinträchtigung der Bewegungskoordination kommt (Klockgether und Paulson, 2011). Durch eingeschränkte Koordination der Muskelbewegung werden das Gehen, die Sprache und das Sehvermögen beeinflusst. Ataxie kann als isoliertes Symptom oder im Rahmen einer komplexen Erkrankung auftreten (Sandford und Burmeister, 2014).

Um koordinierte Bewegungen auszuführen und Balance zu halten ist ein funktionierender, komplexer Regelkreis aus verschiedenen Komponenten verantwortlich. Zu den beteiligten Strukturen gehören unter anderem (u. a.) Basalganglien, Cerebellum, cerebraler Cortex, peripher motorische und sensorische Nervenbahnen. Fehlende Funktionalität einer oder mehrerer Komponenten kann zu Dysbalance, Einschränkung der Koordination und Ataxie führen (Akbar und Ashizawa, 2015).

1.2. Klassifikation

Eine bis in die 1980er-Jahre gültige Klassifizierung unterscheidet Ataxien anhand neuropathologischer Veränderungen in rein cerebelläre Atrophie, olivopontocerebelläre Atrophie, spinale oder spinopontine Atrophie (Greenfield, 1954). Aufgrund klinischer Heterogenität kann anhand des Erscheinungsbildes kein Rückschluss auf den Befall einer bestimmten Hirnregion getroffen werden (Paulson, 2009).

Es wurde eine klinische Klassifizierung der autosomal dominanten cerebellären Ataxien (ADCA) von Anita Harding vorgeschlagen (Harding et al., 1982). Diese kategorisiert die ADCA anhand des klinischen Phänotyps in drei Gruppen (Schöls et al., 2004).

- ADCA I umfasst cerebelläre Ataxien mit extracerebellären Symptomen wie zum Beispiel (z. B.) Ophthalmoplegie, pyramidalen oder extrapyramidalen Zeichen, kognitive Beeinträchtigung oder periphere Neuropathie.
- ADCA II beinhaltet cerebelläre Ataxien, die mit Retinitis pigmentosa und einer Degeneration der Retina assoziiert sind.
- ADCA III umfasst Krankheitsbilder mit „rein“ cerebellärer Ataxie.
  Die Spinocerebellären Ataxien (SCA) bilden quantitativ den größten Anteil der ADCA (Harding et al., 1982; Schöls et al., 2004; Matilla-Dueñas 2006).

Nach aktuellem Stand des Wissens über Ataxien werden diese anhand ihrer Ätiologie in **erworbene, sporadische und hereditäre Ataxien** unterschieden (Klockgether und Paulson, 2011; Klockgether, 2012).

Die Erhebung der Familienanamnese, eine körperliche Untersuchung, ein Neuroimaging und eine molekulargenetische Testung gehören zur diagnostischen Abklärung der Ataxie, um zwischen erworbenen und hereditären Formen zu differenzieren (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1138/, 27/11/2019; im Folgenden: Bird 1998, Last Revision 2019).

1.2.1. Erworbene Ataxien

Erworbene Ataxien stellen eine große und heterogene Gruppe dar, die autoimmun, toxisch, infektiös und durch Vitaminmangel bedingt sein können (Nachbauer et al., 2015).

Alkoholmissbrauch gilt als häufigste exogene Ursache einer erworbenen Ataxie. Weitere Toxine sind z. B. Lithium, Schwermetalle und Medikamente der Tumorbehandlung (Akbar und Ashizawa, 2015). Infektiöse Ursachen einer Ataxie werden häufiger bei Kindern beschrieben, sind aber auch bei Erwachsenen möglich. Am häufigsten ist das Varizella-Zoster-Virus ursächlich, weitere Erreger sind z. B. Mumps, das Epstein-Barr-Virus oder das Parvovirus (Nachbauer et al., 2015).

Ataxien können immunvermittelt sein oder durch Autoimmunität auftreten (z. B. bei Antikörpern gegen Glutaminsäure-Decarboxylase). Ein Vitamindefizit, besonders von Vitamin B12, aber auch von Vitamin B1 und E sowie die Superfiziale Sideridose können zu einer erworbenen Ataxie führen (Klockgether 2010; Nachbauer et al., 2015).

Als endogene nicht genetische Faktoren einer Ataxie werden weiterhin Apoplex, Traumata, Tumore und demyelinisierende Krankheiten, z. B. Multiple Sklerose, beschrieben (Akbar und Ashizawa, 2015).

1.2.2. Sporadische Ataxien

Bei Patienten mit sporadisch degenerativen Ataxien kann keine spezifische Ursache gefunden werden; es handelt sich weder um eine erworbene noch um eine genetische Form. Die cerebelläre Variante der Multisystematrophie und die davon abzugrenzende sporadische, im Erwachsenenalter beginnende Ataxie unklarer Ätiologie werden dieser Kategorie zugeordnet (Klockgether 2010).

1.2.3. Autosomal rezessiv vererbte Ataxien

Eine Unterscheidung hereditärer Ataxien erfolgt anhand des zugrunde liegenden Erbganges in autosomal rezessiv, X-chromosomal, mitochondrial und autosomal dominant (Jayadev und Bird, 2013).

Autosomal rezessiv vererbte Ataxien bilden eine heterogene Gruppe mit klinisch stark variierendem Phänotyp. Es können neben Ataxie Neuropathie, Krämpfe, ophthalmologische Störungen sowie neurologische und nicht neurologische Manifestationen assoziiert sein. Autosomal rezessiv vererbte Ataxien zeigen einen frühen Krankheitsbeginn (Hersheson et al., 2012).

Beaudin und Mitarbeiter untersuchten autosomal rezessiv vererbte Ataxien und konnten drei Kategorien unterscheiden: Primär autosomal rezessive Ataxien, andere rezessiv vererbte Bewegungs- oder Multisystemkrankheiten mit prominenter Ataxie und zuletzt rezessive Krankheiten, bei denen Ataxie als sekundäres Merkmal gelegentlich auftritt (Beaudin et al., 2017).

Die autosomal rezessiv vererbbaren Ataxien stellen damit eine große und heterogene Gruppe dar, wobei im Folgenden auf die häufigsten Formen kurz eingegangen wird. Dazu zählen die Friedreich-Ataxie (FRDA), die Ataxie-Telangiektasie (AT), die autosomal rezessive spastische Ataxie Typ Charlevoix-Saguenay (ARSACS) und die Ataxie mit okulomotorischer Apraxie Typ 1 und 2 (AOA1 und AOA2) (Storey, 2014).

Die FRDA ist die häufigste hereditäre Ataxie in Europa, im Nahen Osten, in Südasien und Nordafrika mit einer Prävalenz von 2-4/100.000. Die Krankheit ist gekennzeichnet durch einen frühen Krankheitsbeginn mit klinischen Symptomen wie Ataxie, Dysarthrie, Muskelschwäche, Skoliose, Fußdeformität und kardialen Symptomen (Palau and Espinós, 2006).

Die häufigste Mutation bei FRDA-Patienten ist eine homozygote intronische GAA Trinucleotid-Repeat-Expansion im *FXN*-Gen. Wenige Patienten sind compound heterozygot für eine Punktmutation und die GAA-Repeat-Expansionen (Hersheson et al., 2012).

Die AT manifestiert sich häufig schon im Alter von zwei bis vier Jahren mit progressiver cerebellärer Ataxie. Die Prävalenz wird mit 1-2,5/100.000 angegeben. Bei diesem Krankheitsbild ist die DNA-Reparatur durch Mutationen im *ATM*-Gen gestört. AT wird mit einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Strahlen und einem erhöhten Risiko für maligne

Erkrankungen, vor allem hämatologischen Ursprungs, in Verbindung gebracht (Palau und Espinós, 2006; Akbar und Ashizawa, 2015).

Die ARSACS, auch bekannt als Charlevoix-Saguenay-Syndrom, wurde zuerst in Quebec, Kanada, beschrieben. Dort gilt sie aufgrund des Gründereffekts als häufig. Der Krankheitsbeginn liegt zwischen ein und 14 Jahren. Die Krankheit ist gekennzeichnet durch Ataxie, Spastik sowie durch eine kombinierte axonale und demyelinisierende Neuropathie. Weitere Symptome wie ein eingeschränkter Intellekt sind möglich. Bei dem Charlevoix-Saguenay-Syndrom ist das *SACS*-Gen verändert, das für das Protein Sacsin codiert (Storey 2014).

Die AOA1 wurde ursprünglich in Japan beschrieben. Der klinische Phänotyp ist charakterisiert durch einen frühen Beginn der cerebellären Ataxie sowie durch eine okulomotorische Apraxie, Neuropathie und mentale Retardierung. Zusätzlich liegen bei einer AOA1 eine Hypalbuminämie und eine Hypercholesterinämie häufig vor. Veränderungen im *APTX*-Gen, das für Aprataxin codiert, konnten als ursächlich identifiziert werden (Le Ber et al., 2003).

Die AOA2 ist gekennzeichnet durch Ataxie und axonale Neuropathie. Eine okulomotorische Apraxie wird in circa (ca.) der Hälfte der Fälle der an AOA2 erkrankten Patienten berichtet, Chorea wird selten beschrieben, kann aber auftreten. Eine mentale Retardierung wird bei der AOA2 nicht beschrieben. Verursacht wird die AOA2 durch *loss-of-function* Mutationen in *SETX*-Gen, das für Senataxin codiert (Storey, 2014). Die AOA2 wird auch als autosomal rezessive Spinocerebelläre Ataxie Typ 1 bezeichnet (Palau und Espinós, 2006).

1.2.4. X-chromosomal vererbte Ataxien

X-chromosomal vererbte Ataxien sind bekannt, treten aber selten auf. Als häufigste zählt das Fragile X-assoziierte Tremor Ataxie Syndrom, das durch CGG-Repeat-Expansionen im 5´ untranslatierten Bereich (UTR) des *FMR1*-Gens ausgelöst wird und für das FMRP-Protein codiert. Symptome können u. a. Tremor, Ataxie, orthostatische Probleme, kognitive Beeinträchtigung sowie Parkinsonismus sein (Sandford und Burmeister, 2014).

1.2.5. Mitochondrial vererbte Ataxien

Verschiedene mitochondriale Erkrankungen können Ataxie als klinisches Symptom aufweisen. Mutationen des *mtATP6*-Gens gelten als ursächlich für verschiedene Krankheitsbilder, darunter das Syndrom mit Neuropathie, Ataxie und Retinitis pigmentosa. Weiterhin kann es zu einem Leigh-Syndrom oder zu Spinocerebellären Ataxien im Erwachsenenalter kommen (Pfeffer et al., 2012).

Die Fähigkeit der Adenosintriphosphat- (ATP) Produktion der Mitochondrien ist bei Mutationen des *mtATP6*-Gens durch Strukturveränderungen der ATP-Synthase reduziert (Sandford und Burmeister, 2014).

1.2.6. Autosomal dominant vererbte Ataxien

Zu den **autosomal dominant** vererbten Ataxien zählen die Episodische Ataxien (EA) und die Spinocerebellären Ataxien (SCA). Die gemittelte Prävalenz der ADCA liegt bei 2,7/100.000, wobei sie zwischen Populationen stark divergieren kann (Ruano et al., 2014).

Die EA sind charakterisiert durch Ataxie-Attacken, die mit anderen neurologischen Manifestationen wie Myokymie, Migräne, Krämpfen oder Chorea einhergehen können. Die Ursache der EA liegt in heterogenen Veränderungen der Ionenkanäle von Nervenzellen, die an deren Erregbarkeit beteiligt sind (Hersheson et al., 2012; Storey, 2014).

Es existieren weitere autosomal dominant vererbte neurologische Erkrankungen mit dem klinischen Symptom einer Ataxie. Dazu zählen u. a. der Morbus Alexander und die Dentatorubrale-Pallidoluysiale Atrophie (DRPLA). Die DRPLA wird durch verlängerte CAG-Repeats im *Atrophin-1*-Gen ausgelöst. Die DRPLA kommt weltweit selten vor, in Japan stellt sie dagegen mit einer Prävalenz von 0,8/100.000 eine wichtige Differentialdiagnose zu den SCAs dar (Hersheson et al., 2012).

Die klinische Ausprägung sowie der Krankheitsbeginn sind variabel. Eine höhere Anzahl an CAG-Repeats korreliert mit einem schwerwiegenderen Phänotyp und einem früheren Krankheitsbeginn. Symptome sind neben Ataxie Myoklonie, Demenz, Psychosen, Epilepsie und Chorea (Schöls et al., 2004).

1.3. Spinocerebelläre Ataxien (SCA)

Spinocerebelläre Ataxien (SCA) zählen zu den autosomal dominant vererbten Ataxien und umfassen eine heterogene Gruppe an Subtypen mit progressiven, neurodegenerativen Störungen (Sullivan et al., 2019).

Der Krankheitsverlauf ist gekennzeichnet durch eine langsame Degeneration des Cerebellums, oft in Begleitung degenerativer Veränderungen des Hirnstamms und weiterer Teile des zentralen Nerven Systems (ZNS), selten auch des peripheren Nervensystems (PNS) (Paulson, 2009; Shakkottai und Fogel, 2013).

Klinisch zeigen die Betroffenen eine progressive cerebelläre Ataxie mit Gangataxie, Standataxie und Ataxie der Extremitäten. Ein großes Spektrum neurologischer Symptome wird beschrieben, darunter cerebelläre Dysarthrie, okulomotorische Störungen, Retinopathie, Optikusatrophie, Spastik, extrapyramidalmotorische Störungen, periphere Neuropathie, Sphinkterstörung, kognitive Beeinträchtigung und Epilepsie (Schöls et al., 2004; Matilla-Dueñas 2006; Klockgether und Paulson, 2011; Sullivan et al., 2019) Eine SCA kann sich auch als isoliertes cerebelläres Syndrom äußern (Hersheson et al., 2012).

1.3.1. Genetik der SCA

Derzeit sind 44 SCA-Subtypen bekannt, die als SCA1 bis SCA48 bezeichnet werden. Dabei wurden einige Loci doppelt beschrieben, bei anderen ist die Lokalisation unbekannt. Eine Zuordnung der SCA-Subtypen zu den beschriebenen Loci ist in Tabelle 1 zu finden (https://www.omim.org/ 25/11/2019; Bird 1998, Last Revision 2019).

Ein Teil der dominant vererbten SCAs wird durch **Repeat-Expansionen** verursacht. Repetitive Sequenzabschnitte können in codierenden, seltener in nicht codierenden Bereichen relevanter Gene vorkommen (Sullivan et al., 2019).
CAG-Expansionen im codierenden Bereich der Gene werden am häufigsten beschrieben und konnten bei SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7 und SCA17 nachgewiesen werden (Sandford und Burmeister, 2014). Das Triplett CAG codiert für Glutamin, das mit dem Einbuchstaben-Code Q abgekürzt wird, daher auch Polyglutamin-Expansionen oder polyQ-Expansionen (Storey, 2014).

Repeat-Expansionen in nicht codierenden Bereichen können in Introns oder in untranslatierten Regionen von Genen auftreten. Diese können durch Beeinflussung der Regulation zugehöriger Gene Ataxien verursachen (Sandford und Burmeister, 2014).

Beschrieben sind CAG-Expansionen bei SCA12 im 5´ UTR. Repeat-Expansionen in Introns werden bei SCA8 (CTG-Expansion), bei SCA10 (ATTCT-Expansionen), SCA31 (TGGAA-Expansionen) und SCA36 (GGCCTG-Expansionen) beschrieben (Shakkottai und Fogel, 2013; Sandford und Burmeister, 2014).

Repeat-Expansions-Ataxien zeigen das Phänomen der Antizipation. Dabei wird der Ausbruch der Krankheit in aufeinanderfolgenden Generationen früher beobachtet. Ursache ist eine Repeat-Instabilität in der Keimbahn, was zu zusätzlichen Repeat-Expansionen führt (Shakkottai und Fogel, 2013). Eine höhere Anzahl der Repeats geht mit einem früheren Krankheitsbeginn und einem schwerwiegenderen Phänotyp einher. Eine genaue Angabe des Krankheitbeginns lässt sich im Voraus jedoch nicht treffen (Schöls et al., 2004), da es sich um ein komplexes Zusammenspiel mehrerer Faktoren wie genetischer und Umweltfaktoren handelt (Sandford und Burmeister, 2014).

Weitere Ursache einer SCA sind **Konventionelle Mutationen**. Einige Mutationen wurden nur in einzelnen Populationen oder Familien berichtet, wohingegen andere weltweit vorkommen (Sandford und Burmeister, 2014).

Direkte Mutationen des Ionenkanals oder eine sekundäre Ionenkanal-Dysfunktion gelten in der Pathogenese der SCA5, SCA6, SCA13, SCA15/16, SCA19/22 und SCA27 als ursächlich (Shakkottai und Fogel, 2013).

Mutationen in zellulären Signaltransduktionsmolekülen sind Ursache der SCA11, SCA14, SCA23 (Shakkottai und Fogel, 2013).

Die SCA24 wird autosomal rezessiv vererbt und ist somit keiner der drei ADCA-Gruppen zuzuordnen (Sun et al., 2016).

Tabelle 1: SCA-Loci mit zugehöriger chromosomaler Lokalisation, Gen- und Proteinbezeichnung

SCA	**Locus**	**Gen**	**Protein**	**Repeat/ Mutation**
SCA1	6p22.3	*ATXN1*	Ataxin-1	CAG-R
SCA2	12q24.12	*ATXN2*	Ataxin-2	CAG-R
SCA3	14q32.12	*ATXN3*	Ataxin-3	CAG-R

SCA4	16q22.1	U	U	U
SCA5	11q13	*SPTBN2*	ß-III Spectrin	PM, Deletion
SCA6	19p13	*CACNA1A*	s.abh. Calcium Kanal, P/Q Typ, α1A Untereinheit	CAG-R
SCA7	3p14.1	*ATXN7*	Ataxin-7	CAG-R
SCA8	13q21.33	*ATXN8OS/ ATXN8*	Ataxin-80S/Ataxin 8	CTG/CAG-R
SCA9	U	U	U	U
SCA10	22q13.31	*ATXN10*	Ataxin-10	ATTCT-R
SCA11	15q15.2	*TTBK2*	Tau-Tubulin Kinase 2	PM (Insertion, Deletion)
SCA12	5q32	*PPP2R2B*	Serin/ Threonin Proteinphosphatase 2A, regulatorische Untereinheit β	CAG-R
SCA13	19q13.33	*KCNC3*	s.abh. Kaliumkanal (Kv3.3)	PM
SCA14	19q13.42	*PRKCG*	Proteinkinase Cγ	PM
SCA15/16	3p26.1	*ITPR1*	Inositol 1, 4,5-triphosphat Rezeptor Typ 1	PM, Große Deletion
SCA17	6q27	*TBP*	TATA Box-binding Protein	CAG/CAA-R
SCA18	7q22-q32	*IFRD1*	Interferon-related developmental regulator 1	PM
SCA19/22	1p13.2	*KCND3*	s.abh. Kaliumkanal Kv4.3	PM, Deletion
SCA20	11q12	U	U	Große Duplikation
SCA21	1p36.33	*TMEM240*	Transmembran Protein 240	PM
SCA23	20p13	*PDYN*	Prodynorphin	PM, Deletion

SCA24	1p36	U	U	U
SCA25	2p21-q13	U	U	U
SCA26	19p13.3	*EEF2*	Eukaryotic translation elongation factor 2	PM
SCA27	13q33.1	*FGF14*	Fibroblast growth factor 14	PM
SCA28	18p11.21	*AFG3L2*	ATPase-family-gene-3-like-2	PM
SCA29	3p26.1	*ITPR1*	Inositol triphosphate Rezeptor 1	PM
SCA 30	4q34.3-q35.1	U	U	U
SCA31	16q21	*BEAN1*	Brain-expressed protein associating with NEDD4	TGGAA-R
SCA32	7q32-q33	U	U	U
SCA34	6q14.1	*ELOVL4*	Elongation of very long chain fatty acids protein 4	PM
SCA35	20p13	*TGM6*	Transglutaminase 6	PM
SCA36	20p13	*NOP56*	Nuclear protein 56	GGCCTG-R
SCA37	1p32.2	*DAB1*	Disabled homolog 1	ATTTC-R
SCA38	6p12.1	*ELOVL5*	Elongation of very long chain fatty acids protein 5	PM
SCA40	14q32.11-q32.12	*CCDC88C*	Coiled-coil domain containing 88C	PM
SCA41	4q27	U	U	U
SCA42	17q21.33	*CACNA1G*	Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 G	PM
SCA43	3q25.2	*MME*	Neprilysin	PM
SCA44	6q24.3	*GRM1*	Glutamate metabotropic receptor 1	PM
SCA45	5q33.1	*FAT2*	FAT Atypical Cadherin 2	PM
SCA46	19q13.2	*PLD3*	Phospholipase D3	PM

SCA47	1p35.2	*PUM1*	Pumilio homolog 1	PM
SCA48	16p13.3	*STUB1*	STIP1 homology und U-box containing protein 1	PM

M: Mutation U: unbekannt PM: Punktmutation R: Repeats
A: Andere s.abh.: spannungsabhängig

(Nolte und Müller, 2006; Paulson 2009; Klockgether und Paulson, 2011; Hersheson et al., 2012; Jacobi et al., 2013; Shakkottai und Fogel, 2013; Sun et al., 2016; Bird 1998, Last Revision 2019, https://www.omim.org/ 20/11/2019)

1.3.2. Definitionen

Die Begriffe Mutation und Polymorphismus werden wie folgt definiert: Als **Mutation** gilt eine Veränderung der Basenabfolge, die in der Regel krankheitsauslösend ist. Ein **Polymorphismus** wird als Sequenzvariante definiert, der mit keinem Krankheitsbild einhergeht (http://varnomen.hgvs.org/bg-material/glossary/ 17/12/2019). Ein Polymorphismus ist eine DNA-Variante mit einer Häufigkeit von mehr als 1%. Dies suggeriert, dass Polymorphismen häufiger vorkommen als Mutationen. Ein Polymorphismus kann der Austausch einer oder mehrere Nucleotide sein (Karki et al., 2015).

SNVs (single nucleotide variant) sind Sequenzvarianten einzelner Nucleotide in genomischer DNA. Dazu zählen SNPs (single nucleotide polymorphism), Punktmutationen, Transitionen und Transversionen (http://www.sequenceontology.org/browser/current_release/term/SO:0001483 17/12/2019).

Die Pathogenität der im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Varianten wird entsprechend der Terminologie der „Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants“ angegeben. Diese unterscheidet Varianten in fünf Klassen: pathogen, wahrscheinlich pathogen, unbestimmte Signifikanz, wahrscheinlich benigne und benigne (Richards et al., 2015).

1.3.3. Subtypen der SCA

Die SCA1 ist die erste dominant vererbte Ataxie, für die Locus und Gendefekt identifiziert wurde (Paulson, 2009).

Der häufigste SCA-Subtyp weltweit ist die SCA3, die auch als Machado-Joseph Krankheit bekannt ist. Die zweithäufigste SCA weltweit ist die SCA2 (Bird 1998, Last Revision

2019; Ruano et al., 2014). Die Prävalenz der SCA weltweit wird mit etwa 3/100.000 angegeben (Schöls et al., 2004).

Allein die fünf häufigen Subtypen SCA1, SCA2, SCA3, SCA6 und SCA7 machen 60% der identifizierten SCAs in den USA aus (Paulson, 2009) und ca. 64% der ADCA in den Niederlanden (Van De Warrenburg et al., 2002).

Die Häufigkeitsverteilung der SCA-Subtypen kann zwischen verschiedenen Populationen durch Gründereffekte divergieren (Bird 1998, Last Revision 2019). Die SCA2 stellt beispielsweise den häufigsten SCA-Subtyp in Holguín (Kuba) und Cantabria (Spanien) dar, weltweit betrachtet ist die SCA2 zweithäufigste Ursache einer SCA. Nicht zuletzt aus diesem Grund ist es wichtig, die Herkunft des Patienten bei Diagnosestellung zu berücksichtigen (Ruano et al., 2014).

Alle SCA-Patienten zeigen eine Ataxie des Stammes, der Extremitäten und/ oder des Ganges. Zusätzlich zeigen die Patienten variable Symptome wie z. B. kognitive Beeinträchtigung, periphere Neuropathie oder Krämpfe (Shakkottai und Fogel, 2013).

Neben Ataxie können bei der SCA weitere Symptome auftreten. Die häufigsten Symptome der jeweiligen SCA-Subtypen werden in nachfolgender Tabelle 2 zusammengefasst. Da es sich bei einer SCA um ein sehr variables Krankheitsbild handelt, ist eine breite Spanne an vielen weiteren Symptomen möglich, auf die in der nachfolgenden Tabelle 2 jedoch verzichtet wird. Eine eindeutige Zuordnung ausschließlich anhand der klinischen Symptomatik zu einem SCA-Subtyp ist folglich nicht möglich.

Die zugehörige Gruppe der ADCA, die im Kapitel 1.2. *Klassifikation* näher erläutert wurde, ist in der rechten Spalte aufgeführt.

Tabelle 2: SCA-Subtypen und Symptome

SCA	Klinische Symptome neben Ataxie	ADCA Typ
SCA1	Beginn mit Gangstörung; periphere Neuropathie, Sakkaden, Pyramidenbahnzeichen	I
SCA2	Sehr variabler Phänotyp; oft Dysarthrie, langsame Sakkaden, periphere Neuropathie, selten Areflexie, Demenz, Parkinsonismus	I
SCA3	Pyramidenbahnzeichen, Ophthalmoparese, Dystonie, Polyneuropathie, Parkinsonismus, Restless Legs Syndrom	I
SCA4	Sensorisch axonale Neuropathie	I

SCA5	Rein cerebelläre Ataxie (selten Tremor, Nystagmus)	III
SCA6	Rein cerebelläre Ataxie (gelegentlich Dysarthrie)	III
SCA7	Retinadegeneration, Visusverlust, Ophthalmoparese, Erblindung	II
SCA8	kognitive Defizite, Hyperreflexie, Spastik, Schluckstörung, Neuropathie	I
SCA9	Extrapyramidale- und Pyramidenbahnzeichen, Ophthalmoparese	A
SCA10	Kognitive Dysfunktion, Krämpfe, Epilepsie	I
SCA11	Rein cerebelläre Ataxie, milden Pyramidenbahnzeichen, Nystagmus	III
SCA12	Aktionstremor, sensorische Neuropathie, Demenz	I
SCA13	mentale Retardierung, Nystagmus	I
SCA14	Dysarthrie, Nystagmus; ggf. Myoklonie, Tremor, Dystonie, Depression, kognitive Beeinträchtigung	I
SCA15/16	Tremor	I
SCA17	Dysarthrie, weitere Symptome wie Parkinsonismus, Dystonie, Chorea und psychiatrische Symptome möglich	I
SCA18	Motorische und sensorische Neuropathie, Muskelschwäche, –atrophie	I
SCA19/22	Kognitive Einschränkung, Myoklonie, Tremor	I
SCA20	Dysarthrie, palataler Tremor, Phonationsstörung hypermetrische Sakkaden, Calzifikation des Nucleus dentatus	I
SCA21	Extrapyramidale Zeichen wie Akinesie, kognitive Beeinträchtigung, Parkinsonismus	I
SCA23	Distale sensorische Neuropathie, Pyramidenbahnzeichen, Tremor, proximale Beinparese	I
SCA24	axonale sensorisch-motorische Polyneuropathie, Pyramidenbahnzeichen	ar
SCA25	Peripher sensorische Neuropathie, Areflexie, gastrointestinale Probleme	I
SCA26	Rein cerebelläre Ataxie	III

SCA27	Tremor, mentale Retardierung, psychiatrische Probleme	I
SCA28	Dysarthrie, Nystagmus, Hyperreflexie, Ptosis, Ophthalmoparese, Spastik	I
SCA29	Rein cerebelläre Ataxie	III
SCA30	Rein cerebelläre Ataxie (ggf. Hyperreflexie)	III
SCA31	Rein cerebelläre Ataxie, progressive Hörminderung	I
SCA32	Kognitive Einschränkung, bei Männern Azoospermie	I
SCA34	Neurokutane Syndrome, gesteigerte Reflexe	I
SCA35	Pyramidenbahnzeichen, Tremor, Hyperreflexie, Tortikollis	I
SCA36	Motoneuron-Dysfunktion, Höreinschränkung, Atrophie, Faszikulationen der Zunge	I
SCA37	anormale Augenbewegung	I
SCA38	Reine Ataxie, axonale Neuropathie	I
SCA40	Spastik	A
SCA42	Milde Pyramidenbahnzeichen, Sakkaden	I
SCA43	Periphere Neuropathie, Pyramidenbahnzeichen	I
SCA44	Kognitive Beeinträchtigung, Pyramidenbahnzeichen	I
SCA45	Rein cerebelläre Ataxie	III
SCA46	Periphere Neuropathie	I
SCA47	cerebelläre Ataxie	I
SCA48	Gang- und Standataxie	A

ar: autosomal rezessiv ggf.: gegebenenfalls A: andere

(Klockgether, 2008; Paulson, 2009; Klockgether und Paulson, 2011; Hersheson et al., 2012; Jacobi et al., 2013; Sun et al., 2016; Bird, 1998, Last Revision 2019; Sullivan et al., 2019)

1.4. SCA11

1.4.1. Klinischer Phänotyp und Prävalenz

Die Spinocerebelläre Ataxie Typ 11 äußert sich klinisch als langsam progressive cerebelläre Ataxie mit hypometrischen Sakkaden, horizontalem und vertikalem Nystagmus. Gelegentlich treten Pyramidenbahnzeichen, Dysarthrie und Schluckbeschwerden auf (Giunti et al., 2012; https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1757/, im Folgenden Houlden et al., 2008, Last Update 2019). Bei einigen Patienten wurden periphere Neuropathie und Dystonie beobachtet (Houlden et al., 2007). Eine milde Hyperreflexie der Extremitäten wurde bei Betroffenen beschrieben (Xu et al., 2010).

Bei allen betroffenen Individuen wurde eine mild bis stark ausgeprägte cerebelläre Atrophie beider Hemisphären und des Vermis in der Magnetresonanztherapie (MRT) beschrieben. Es konnte keine pathologische Veränderung der Nervenleitgeschwindigkeit, der Elektromyographie und der somatosensorisch evozierten Potenziale beobachtet werden (Giunti et al., 2012).

Die von Giunti und Mitarbeitern beschriebene neuropathologische Untersuchung des Hirns einer mit 77 Jahren verstorbenen Patientin zeigte mikroskopisch im Cerebellum einen nahezu kompletten Verlust der Purkinjezellen bei Erhalt der Korbzellen sowie einen signifikanten Verlust der Granulazellen (Giunti et al., 2012). Neurofibrilläre Bündel (NFT) und Tau-positive Neuriten sowie β-Amyloid-positive Plaques wurden in einigen Regionen des Gehirns beschrieben (Houlden et al., 2007).

Das mittlere Erkrankungsalter liegt im frühen Erwachsenenalter bei durchschnittlich 24,2 Jahren mit einer Spanne von ± 8,4 Jahren (das Erkrankungsalter variiert zwischen 15 und 43 Jahren) (Ikezu und Ikezu, 2014). Die Lebenserwartung der in Nordeuropa lebenden Erkrankten ist normal, viele werden älter als 75 Jahre. Der Verlauf variiert von leichten Beschwerden bis hin zu beeinträchtigenden Problemen wie Schluckstörungen, Sprachstörungen und das Benötigen eines Rollstuhls (Houlden et al., 2008, Last Update 2019).

SCA11 ist eine äußerst seltene Form der SCA. Von 238 getesteten Familien mit Verdacht auf SCA konnte bei vier eine Mutation nachgewiesen werden. Die vier betroffenen Familien kamen aus Devon im Vereinten Königreich, Deutschland, Frankreich und Pakistan. Die SCA11 macht ca. 1 % der ADCA der Gruppe III aus, die Prävalenz ist jedoch unbekannt (Bauer et al., 2010; Houlden et al., 2008, Last Update 2019).

1.4.2. Genetik der SCA 11

Mutationen im *TTBK2*-Gen, das für die Tau-Tubulin Kinase 2 codiert, wurden als ursächlich für eine SCA11 identifiziert. Die Rate der de novo Mutationen ist unbekannt (Houlden et al., 2008, Last Update 2019).

Die Konstruktion der Haplotypen definierte ein 7,6-cM Intervall zwischen den flankierenden Markern D15S146 und D15S1016. Dies erlaubte die Zuordnung des Krankheitslocus zu der chromosomalen Region 15q14-q21.3 (Worth et al., 1999).

Houlden und Mitarbeiter konnten durch Feinkartierung feststellen, dass der SCA11-Locus eine 5,6-cM große Region darstellt, die 134 Gene beinhaltet; eines dieser Gene ist *TTBK2* (Houlden et al. 2007).

1.4.2.1. Das *Tau-Tubulin Kinase 2*-Gen (*TTBK2*)

Das *TTBK2*-Gen ist in der chromosomalen Region 15q15.2 lokalisiert und reicht auf dem reversen Strang von 42,738,730 bis 42,920,809 (ENSG00000128881) und codiert für die Tau-Tubulin Kinase 2 (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000128881;r=15:42738734-42920809;t=ENST00000622375 14/08/2019).

Ausgehend vom *TTBK2*-Gen sind acht Transkripte unterschiedlicher Länge bekannt, davon sind sieben proteincodierend. Die verschiedenen Transkripte entstehen durch alternatives Spleißen und werden ubiquitär in adultem und fetalem Gewebe des Menschen exprimiert (Houlden et al. 2007). Die Transkripte werden in nachfolgender Darstellung abgebildet. Die Ensembl GenID des *TTBK2* Gens lautet ENSG00000128881 (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000128881;r=15:42738734-42920809;t=ENST00000622375 24/08/2019).

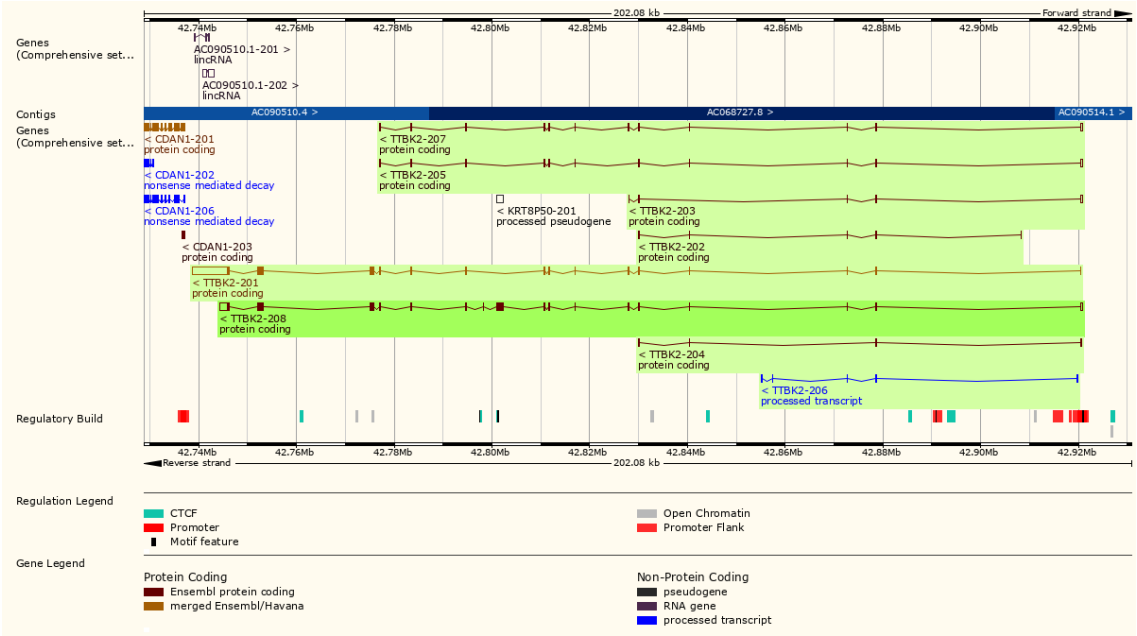


Abbildung 1: *TTBK2*-Gen und bekannte Transkriptvarianten (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000128881;r=15:42738734-42920809;t=ENST00000622375, 28/07/2018)

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Transkript TTBK2-208 untersucht, das 6891 Basenpaare (Bp) umfasst und für ein Protein von 1649 Aminosäuren (AS) codiert. Die Transkript ID lautet ENST00000622375.4. 17 der 18 Exons sind codierend (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000128881;r=15:42744352-42920809;t=ENST00000622375 17/12/2019).

1.4.2.2. Die Tau-Tubulin Kinase (TTBK) Protein-Familie

Zur Familie der Tau-Tubulin Kinasen gehört TTBK1 und TTBK2, die zur Gruppe der eukaryotischen Proteinkinase Casein-Kinase 1 (CK1) zählen. Die CK1 Gruppe beinhaltet die CK1-Isoformen α1, α2, γ1, γ2, γ3, δ und ε, TTBK1 und TTBK2, sowie die vaccinia-related-Kinase (VRK) Isoformen VRK1, VRK2 und VRK3 (Ikezu und Ikezu, 2014).

Die Isoformen TTBK1 und TTBK2 beinhalten homologe Kinase-Domänen, die zu 88 % identisch und zu 96 % ähnlich sind. Die nicht-katalytischen Regionen der beiden Isoformen weisen ebenfalls homologe Bereiche auf (Bouskila et al., 2011,Liao et al., 2015)

Die **TTBK1** wird spezifisch im ZNS exprimiert, davon stark in kortikalen Neuronen. Es ist an der Phosphorylierung und Aggregation von Tau involviert. Hyperphosphoryliertes

Protein Tau ist eine mögliche Komponente von NFT, die bei Tauopathien wie Morbus Alzheimer und frontotemporaler Demenz vorkommen. Die Expression der TTBK1 ist in Gehirnen von Alzheimer-Patienten signifikant gesteigert. Genetische Variationen des *TTBK1*-Gens sind assoziiert mit spät einsetzender Alzheimer-Krankheit (Ikezu und Ikezu, 2014).

Die **TTBK2** ist eine Serin/Threonin-Kinase, die Tau und Tubulin phosphorylieren kann. Die Kinase-Domäne wird durch AS-Rest 21 bis 280 gebildet. TTBK2 wird in zahlreichen Geweben exprimiert, vor allem (v. a.) ist es in den Purkinjezellen des Kleinhirns hoch exprimiert und scheint dort eine wichtige Rolle in der Tau-Kaskade zu spielen. Eine hohe Expression der TTBK2 wird weiterhin in der Körnerzellschicht des Cerebellums, im Hippocampus, im Mittelhirn und in der Substantia nigra beschrieben. Es wird in allen Hirnregionen exprimiert sowie in vielen weiteren Geweben, darunter in Leber, Niere, Herz, Pankreas und Skelettmuskel. Geringer exprimiert wird TTBK2 im Cortex (Houlden et al., 2007; Edener et al., 2009a; Ikezu und Ikezu, 2014; Liao et al., 2015).

Mehrere biologische Funktionen der TTBK2 konnten identifiziert werden. TTBK2 ist eine essentielle Kinase für die Initiation der Ciliogenese und wichtig für die Entwicklung des Nervensystems. TTBK2 wird mit Tumorprogression, einer Transporter-Stimulation, TDP-43 Akkumulation und anderen Prozessen in Verbindung gebracht. Eine veränderte TTBK2 ist assoziiert mit SCA11 (Liao et al., 2015; Bowie et al., 2018).

1.4.2.3. Bekannte Mutationen im *TTBK2*-Gen (Phänotyp SCA11)

Aktuell sind weltweit vier Familien bekannt, bei denen Angehörige klinisch an einer SCA11 erkrankt sind. Durch Punktmutationen werden vorzeitige Stoppcodons an den Codons 448, 449 beziehungsweise (bzw.) 450 generiert, die zu verkürzten TTBK2-Proteinen führen (Liao et al., 2015).

Die Angaben beziehen sich hierbei auf das Transkript TTBK2-201 (ENST00000267890.10), welches 10905 Bp lang ist und für ein Protein von 1244 AS codiert. Das Transkript hat 15 Exons. In der hier vorliegenden Arbeit wurde das längere Transkript TTBK2-208 (ENST00000622375.4) untersucht (siehe Kapitel 1.4.2.1 *Das Tau-Tubulin Kinase 2*-Gen*).*

Familie 1 c.1329dupA, p.Arg444ThrfsTer7, rs80356538

Bei einer englischen Familie wurde die Insertion eines Adenins (A) in Exon 13 an Position 1329 der codierenden DNA (cDNA) gefunden. Die erste veränderte AS des Proteins befindet sich an Position 444, dort wird anstelle von Arginin Threonin verwendet. Die Insertion hat einen Frameshift zur Folge, der zu einem frühzeitigen Stoppcodon (TGA) führt (p.Arg444ThrfsTer7). Das Protein ist auf 450 AS anstelle von 1244 AS verkürzt (Houlden et al., 2007).

In dieser Familie wurden 36 erkrankte Angehörige über acht Generationen beschrieben. Die Betroffenen erkrankten mit Mitte 20 (Houlden et al., 2008, Last Update 2019).

Familie 2 c.1287_1288delAG, p.Glu429AspfsTer21, rs80356539

Bei einer pakistanischen Familie wurde eine Deletion von zwei Basen, Adenin und Guanin (AG), in Exon 13 des *TTBK2*-Gens bei Nucleotid 1287_1288 entdeckt. An Position 429 des Proteinproduktes befindet sich Asparaginsäure anstelle von Glutaminsäure. Die Mutation hat einen Frameshift zur Folge, das Protein ist aufgrund eines frühzeitigen Stoppcodons verkürzt (p.Glu429AspfsTer21). Bei dieser Familie sind fünf Individuen über drei Generationen an SCA11 erkrankt (Houlden et al., 2008, Last Update 2019).

Familie 3 c.1306_1307delGA, p.Asp436TyrfsTer14, rs318240735

Bei zwei nicht miteinander verwandten Familien, einer deutschen und einer französischen, wurde eine identische Mutation in Exon 12 entdeckt. Durch eine Deletion von zwei Basen (GA) kommt es zu einem Frameshift, mit der Folge eines vorzeitigen Stoppcodons an Position 448. Die Proteinbezeichnung lautet p.Asp436TyrfsTer14 (Bauer et al., 2010; Houlden et al., 2008, Last Update 2019).

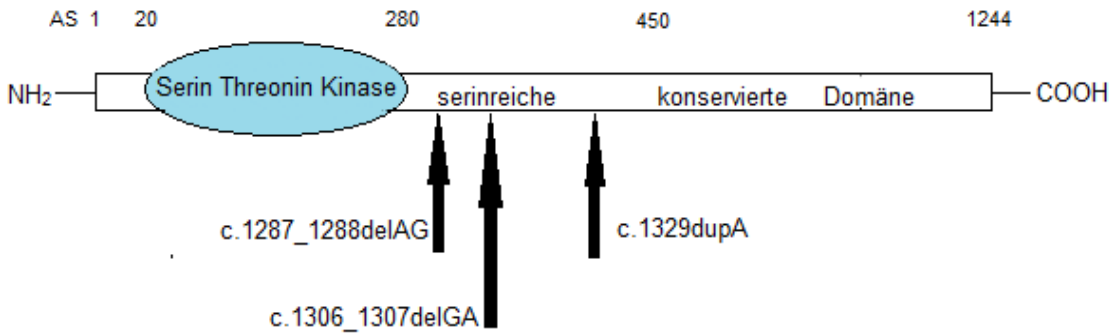


Abbildung 2: Darstellung der Domänen der Tau-Tubulin Kinase
(modifiziert nach Houlden et al., 2007; Giunti et al., 2012)

Alle drei bekannten Mutationen führen zu einer Verkürzung des mRNA-Stranges aufgrund eines vorzeitigen Stoppcodons. Folge ist ein Nonsense-vermittelter Zerfall des mutierten Transkriptes oder eine Verkürzung des Transkriptes, der zum Verlust der Proteinfunkton führt (Houlden et al. 2007; Edener et al. 2009a). Die bekannten Mutationen im *TTBK2*-Gen sind in der Serin-reichen konservierten Domäne des Proteins lokalisiert (siehe Abbildung 2) (Giunti et al., 2012).

1.5. Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde die DNA von 30 Ataxie-Patienten auf etwaige pathogene Varianten im *TTBK2*-Gen untersucht. Alle Patienten des Studienkollektivs wurden zuvor auf die häufig vorkommenden SCA-Formen SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7 und SCA17 getestet. Weiterhin konnten seltenere Subtypen wie SCA8, SCA10, SCA12, SCA14, SCA19, SCA23, SCA27 und SCA28 bei den Patienten ausgeschlossen werden. Die Patienten hatten einen langsam progredienten Verlauf der klinischen Symptomatik und eine positive Familienanamnese.

Ziel der Arbeit war es, alle 17 codierenden der insgesamt 18 Exons des *TTBK2*-Gens mit PCR-Produkten abzudecken und in der Sequenzanalyse nach bekannten und neuen Varianten zu suchen.

2. Materialien

2.1. Chemikalien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	**Hersteller**
Betain 5M	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Borsäure	Merck, Darmstadt, DE
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg, DE
EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethidiumbromidlösung 0,025% in wässriger Lösung, 250 µg/ml	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Formamid	Applied Biosystems, Warrington, UK
Gelagarose “GEN Agarose L.E. GX04090”	inno-train Diagnostik GmbH Kronberg/ Taunus, DE
Nucleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 100 mM	Promega Madison, USA
PCR 10x Puffer Tris-Cl, KCl, $(NH_4)_2SO_4$, 15 mM $MgCl_2$, pH 8.7 (20 °C)	QIAGEN, Hilden, DE
Sephadex™ G-50 superfine	GE Healthcare Bio- Sciences AB, Uppsala, SE
Sucrose	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
TRISMA-Base	Sigma-Aldrich, Steinheim, DE
Wasser, destilliert: Ecotainer®	Aqua B. Braun, Melsungen, DE
Xylene-Zyanol	Serva, Heidelberg, DE

EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure Tris: Trishydroxymethylaminomethan

2.2. Enzyme

Tabelle 4: Enzyme und Enzymgemische

Enzyme	**Hersteller**
DdeI	New England Biolabs, Ipswich, USA
Exo-SAP1	USB/ Affymetrix, Cleveland, USA
Taq-Polymerase 5 units/µl	QIAGEN, Hilden, DE

2.3. Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von den Herstellern Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, DE) oder Microsynth AG (Balgach, CH) synthetisiert.

Tabelle 5: Primer zur Amplifikation der Exons des *TTBK2*-Gens

Exon	Primer	Orientierung
2	5´-TCACTGGGCATCTGTAATAG-3´	F
2	5´-CACACTCTCTGAGATGTACA-3´	R
3	5´-TTCTTCTTGGCATATACATAG-3´	F
3	5´-GCTGACACCAGTACATTCA-3´	R
4	5´-AGGAATAGTACAGTGCCTGG-3´	F
4	5´-TACAGTTCCATCTGCATAGT-3´	R
5	5´-TGGTAAGTGAGTAGTTTCCC-3´	F
5	5´-TGCTTCCAGGTCTCTATTG-3´	R
6	5´-CATGTGTGTTATATAGAGCTT-3´	F
6	5´-GCCACTTCTTAGATAACATC-3´	R
7	5´-TGTGACAATAAAGGACGTG-3´	F
7	5´-AAGAAGTCAATCTGATTTAAGC-3´	R
8	5´-ATGGTTAGACCTTGAACAATG-3´	F

8	5´-TCTAATGTCAGCTCACACAG-3´	R
9	5´-GTACATTAAGCTGTTAGTAAGAGC-3´	F
9	5´-CACGCTGACACTCTCATC-3´	R
10	5´-TTACCAATGTTGCTAAAATCCC-3´	F
10	5´-TGCACACCACAGGTCATCC-3´	R
11	5´-AAGTATAAGGAGCTGCAGAC-3´	F
11	5´-ATGGGCTGAGGGCTAGG-3´	R
11	5´-TGTTCCCCTGCACAGTGGC-3´	Rnes
12	5´-TCAGATGTATACTAGATTTTCAGAG-3´	F
12	5´-GTGATCCACCCACCTCG-3´	R
13	5´-TGAGTCTGGTGTGCTTTCTC-3´	F
13	5´-TCTGAGGGAATCTGGATGAAG-3´	R
14	5´-CTTAATTATGTGTGGAGTCAT-3´	F
14	5´-CCAGCCTTCTGAACTGTAAG-3´	R
15	5´-GATTCCTCTCATGTGTGTTG-3´	F
15	5´-TGGAGCTGAATAGACTCAGTG-3´	R
16	5´-CAGGATGTGGCAGGTAGAG-3´	F
16	5´-GCACCTTGAGTGGATAACAG-3´	R
16	5´-GACAAATGAGGCTGTAGGACA-3´	F2
17	5´-CTGGTCAACATCTGTGTTCTTC-3´	F
17	5´-GGCAGGAAAGAAAGATACTGAG-3´	R
17	5´-TGACATCATGAGTGAAGACTTG-3´	F1
17	5´-GGATTCGGCTGTGTCTAGTTAC-3´	R1
18	5´-CACATTCACATTATGATTTTGG-3´	F
18	5´-GCCTGCCTTAGGTAATTCC-3´	R

F: vorwärts R: rückwärts

2.4. Kits

Tabelle 6: Verwendete Kits

Kits	**Hersteller**
BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits	AB Applied Biosystems, Foster City ThermoFisher Scientific, USA
Qiagen quick Gel Extraction Kit (SC)	Qiagen, Hilden, DE
Straight pcr-OLS®	OLS OMNI Life ScienceGmbH & Co. KG, Bremen, DE
QIAamp® DNA Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden, DE

2.5. Lösungen, Puffer und Größenstandards

10x Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE):

540 g TRISMA-Base

275 g Borsäure

200 ml 0,5 M EDTA pH 8,0

ad 5000 ml H_2O destilliert

pH einstellen auf 8,2-8,4

1x TBE

250 ml 10x TBE

2,25 l H_2O destilliert

10x Gel-Ladepuffer

10 ml 10x TBE

40 g Sucrose

0,25 g Xylene-Zyanol

0,25 g Bromphenolblau

TBE ad 100 ml

Ladepuffer 1:10 verdünnt

10 ml Ladepuffer

90 ml H_2O

Nucleotidmix

380 µl 10 mM Tris-HCl (pH 7,5)

5 µl dATP (100 mM)

5 µl dCTP (100 mM)

5 µl dGTP (100 mM)

5 µl dTTP (100 mM)

Sequenzierungs-Primer (10 pmol/µl)

40 µl 10 mM Tris-HCl

10 µl Primer (50 pmol/µl)

pUC-Größen-Standard

Plasmid pUC9 verdaut mit DdeI (Länge der generierten Fragmente: 166, 240, 409, 426, 540, 890 Bp).

2.6. Geräte

Tabelle 7: Geräte

GERÄTE	**Hersteller**
Analysewaage, LabStyle 5001	Mettler-Toledo GmbH, Greifensee, CH
Elektrophorese-Kammer, 41060, Horizon®58 Horizontal Gel Electrophoresis System	LIFE TECHNOLOGIES GmbH Carlsbad, USA
Elektrophorese-Spannungsquelle Serial No. 77916	Biometra GmbH, Göttingen, DE
Entwicklungsgerät Bilder	Mitsubishi Electric Europe, B.V., Barcelona, ES

Gefrierschrank -20 °C	Robert Bosch GmbH, Gerlingen-Schillerhöhe, DE
Gelschlitten	von Keutz-Labortechnik, Reiskirchen, DE
Gelschlitten-Kämme	von Keutz-Labortechnik, Reiskirchen, DE
Heizblock Dri-Block DB3, Techne®	Bibby Scientific, Staffordshire, UK
Kühlschrank 4 °C	Robert Bosch GmbH, Gerlingen-Schillerhöhe, DE
Mikrowelle Modell: MS-196VUT	LG Electronics Deutschland GmbH, Ratingen, DE
Multifuge	SORVALL® Heraeus, Hanau, DE
Pipette 10 µl	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Pipette 100 µl LABMATE 247441718	Kinesis GmbH (vormals ABIMED GmbH), Langenfeld, DE
P200 µl Pipetman® C22677C	Gilson S.A.S., Villiers le Bel, FR
P1000 µl Pipetman® L11896C	Gilson S.A.S., Villiers le Bel, FR
Sequenzer ABI Prism 3130XL	Thermo Fisher Scientific, Applied Biosystems, Foster City, USA
Thermocycler TProfessional basic, Serial No. 202135	Biometra GmbH, Göttingen, DE
Tischzentrifuge, „Minicentrifuge“	Labnet International, Inc.
UV-Lampe, Macro Vue UV-25, 230 V	Hoefer Pharmacia Biotech Inc., USA
Vortex Reax 2000	Heidolph, Schwabach, DE
Wasserbad	GFL, Burgwedel, DE
Zentrifuge “Biofuge pico“	Heraeus, Hanau, DE

2.7. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	**Hersteller**
Desinfektion Flächen, 80 % Ethanol	Carl Roth GmBH + Co KG, Karlsruhe, DE
Eppendorf-Gefäße (1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Erlenmeyerkolben 250 ml	DURAN Group GmbH, Wertheim/Main, DE
Multiply®-µStrip Pro 8-strip	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE
Pipettenspitzen 0,1-10 µl Volumen Premium Tips, Extended Length Micropoint Pipette Tips	Biozym® made in USA
Pipettenspitzen 20-300 µl Volumen epT.I.P.S. Standard	Eppendorf AG Hamburg, DE
Pipettenspitzen 50-1000 µl Volumen epT.I.P.S. Standard	Eppendorf AG Hamburg, DE
8 Domed Cap Strips	Thermo Fisher Scientific, UK
24-Well Slidetiter Piko PCR	Thermo Fisher Scientific, FIN
96-Well- Multiscreen Platte, 0.45 µm hydrophil, binding Durapore Membran	Merck Millipore, Tullagreen, Carrigtwohill, IRL
96-Well Multiply® PCR plate 0.3 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, DE

2.8. Computerprogramme

Tabelle 9: Computerprogramme

SeqScape Version 2.5.	Applied Biosystems, Foster City, USA
Finch TV 1.4	Geospiza, Inc. Seattle, USA

3. Methoden

3.1. DNA-Extraktion aus Blut

Für die Amplifizierung und Sequenzierung von Patienten-DNA muss zunächst genomische DNA extrahiert werden. Dazu wurde in den vorliegenden Versuchen die Patienten-DNA aus EDTA-Blut durch das Qiagen DNA Blood Mini Kit entsprechend den Herstellervorgaben gewonnen. Es wurden die Reagenzien und Gefäße des QIAGEN Kits verwendet.

Das EDTA-Blut-Röhrchen wurde vorsichtig aufgeschüttelt.

In ein 1,5 ml Volumen fassendes Eppendorf-Gefäß wurden 20 µl Protease pipettiert. 200 µl Lysepuffer AL und 200 µl des EDTA-Blutes wurden hinzugefügt.

Im Folgenden wurde die Probe für 10 s gevortext und anschließend in einem Wasserbad bei 52 °C für 10 min inkubiert. Die Probe nahm dabei eine bräunliche Farbe an.

Um die DNA zu fällen wurden 200 µl Ethanol absolut ins Eppendorf-Gefäß pipettiert und die Probe wurde für 10 s auf dem Vortex gemischt.

Der komplette Inhalt wurde auf einen QIAamp Säulenfilter pipettiert, der sich auf einem 2 ml Auffangröhrchen befand. Es folgte eine Zentrifugierung für 1 min bei 8000 rpm. Die Säule mit dem darin befindlichem Eluat wurde verworfen. Der Filter mit der gebundenen DNA wurde auf eine neue Säule platziert und 500 µl Waschpuffer 1 wurden hinzugefügt. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurden Bestandteile am Rand der Fritte gelöst. Es folgt eine Zentrifugation für 1 min bei 8000 rpm.

Das Auffangröhrchen inklusive des Durchflusses wurde verworfen.

Es wurden 500 µl Waschpuffer 2 hinzugefügt, nachdem der Filter auf ein neues Auffangröhrchen gesetzt wurde. Der Ansatz wurde 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert.

Der Säulenfilter wurde auf ein 1,5 ml fassendes Eppendorf-Gefäß gesetzt, die Säule wurde verworfen. Es wurden 200 µl Elutionspuffer auf den Säulenfilter pipettiert. Der Ansatz wurde ohne Inkubationszeit bei 13000 rpm für 1 min zentrifugiert.

Die DNA befand sich schließlich im Eppendorf-Gefäß befindlichen Eluat, der Filter konnte verworfen werden. Die extrahierte DNA lag nach Verwendung des Kits in einer Konzentration von 25-30 µg/ml vor und wurde im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

3.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction; PCR) ist eine von den Arbeitsgruppen um Saiki und Mullis entwickelte Methodik, die der in vitro Amplifizierung bestimmter DNA-Abschnitte dient (Saiki et al., 1985; Heinrich et al., 2014).

Durch den Einsatz von Nucleotiden, Enzymen, Oligonucleotid-Primern und Puffer kann in thermisch aufeinanderfolgenden Zyklen eine exponentielle Vervielfachung der Template-DNA erzielt werden (Saiki et al., 1988).

Eine PCR gliedert sich in die Schritte Denaturierung, Primer-Annealing und Verlängerung (Saiki et al., 1988). Die Temperatur des Thermocyclers variiert in den verschiedenen Schritten, sodass eine optimale Bedingung für den jeweiligen Schritt erzielt wird. Nach jedem Zyklus verdoppelt sich der DNA-Gehalt im Gemisch, sodass sich der DNA-Gehalt nach mehreren Zyklen exponentiell vervielfacht hat (Heinrich et al., 2014).

Für den initialen Schritt der Denaturierung wird eine hohe Temperatur von 94 °C gewählt, die eine Spaltung der DNA in ihre zwei Einzelstränge bewirkt (Heinrich et al., 2014).

Der folgende Schritt wird als Annealing bezeichnet. Die Temperatur beträgt zwischen 50-60 °C. Die eingesetzten vorwärts Primer (F Primer) und rückwärts Primer (R Primer) lagern sich an das 3´ Ende der Template-DNA. Primer sind zu den Enden der DNA komplementäre Nucleotidsequenzen. Diese spezifisch gewählten Oligonucleotide aus 15 bis 20 Nucleotiden flankieren die DNA (Saiki et al., 1988).

Die Primer sollten aus einen ausbalancierten G/C und A/T Gehalt bestehen und eine Schmelztemperatur zwischen 50-60 °C aufweisen, um optimal arbeiten zu können. Sie sollten möglichst nicht aus repetitiven Sequenzen wie Dinucleotid-Wiederholungen oder Poly-A-Sequenzen bestehen, um eine fehlerhafte Anlagerung zu vermeiden (Lorenz, 2012).

In der Extension wird die Temperatur auf etwa 72 °C reguliert. Das entspricht dem Temperaturoptimum der *Thermus aquaticus* (Taq) Polymerase. Die verwendete Polymerase wird aus thermophilen Bakterien gewonnen und hat die besondere Eigenschaft, hitzestabil zu sein. Sie wird nicht durch die hohen Temperaturen der Denaturierung geschädigt (Heinrich et al., 2014).

An den Primern beginnend verbindet die Polymerase freie, der Template-DNA komplementäre Desoxynucleotide (dNTPs) miteinander, dazu zählen dATP, dCTP, dGTP und dTTP. Der neue DNA-Strang wird vom 5´ zum 3´ Ende synthetisiert (Heinrich et al., 2014).

Der Zyklus aus Denaturierung, Annealing und Extension wird in den vorliegenden Versuchen 35-mal wiederholt, sodass der DNA-Gehalt sich exponentiell erhöht.

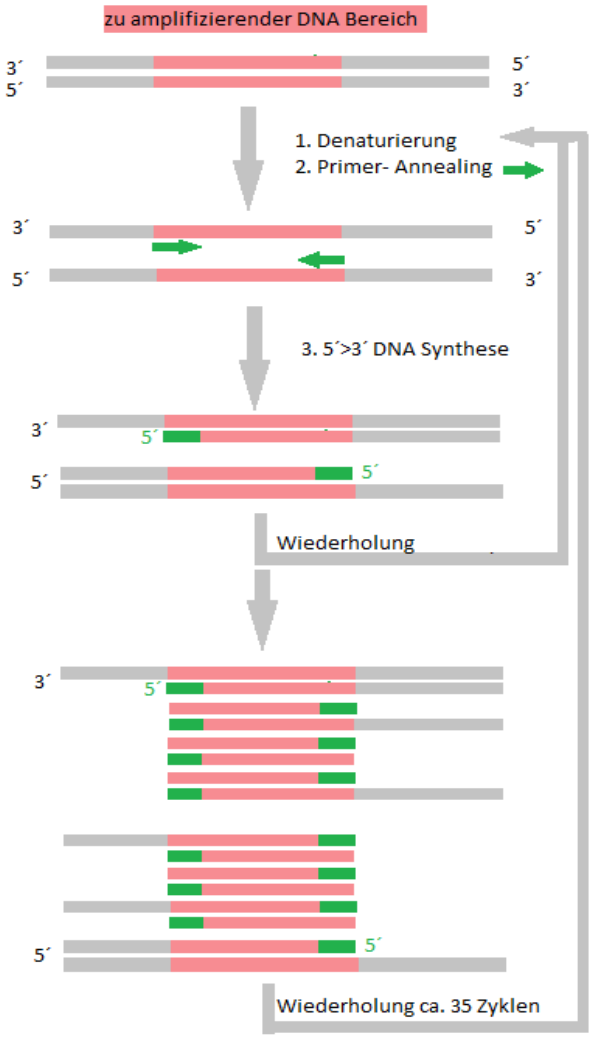


Abbildung 3: Amplifikation einer bestimmten DNA-Sequenz mittels PCR (modifiziert nach Heinrich et al., 2014)

Folgende standardisierten Ansätze wurden als Mastermix für die PCR-Reaktion in ein 1,5 µl Eppendorf-Gefäß pipettiert:

PCR-Ansatz A		**Konzentration**
20 µl	10x Puffer	
40 µl	Kalt-Mix (dNTP)	
3 µl	Primer F	50 pmol/µl
3 µl	Primer R	50 pmol/µl
1,8 µl	Taq-Polymerase	
132 µl	H_2O destilliert	
200 µl		

Dieser Ansatz wurde verwendet für Exon 3, 5, 7, 9,10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18.

PCR-Ansatz B		**Konzentration**
20 µl	10x Puffer	
40 µl	Kalt-Mix (dNTP)	
20 µl	Betain	
3 µl	Primer F	50 pmol/µl
3 µl	Primer R	50 pmol/µl
1,8 µl	Taq-Polymerase	
112 µl	H_2O destilliert	
200 µl		

Ansatz B wurde verwendet für Exon 2, 4, 6, 8, 13.

Die Sequenzen der eingesetzten Primer werden in Tabelle 5: Primer zur Amplifikation der Exons des *TTBK2*-Gens aufgelistet.

39 µl des Ansatzes werden mit 1 µl der Proben-DNA in einem 0,5 ml Eppendorf-Gefäß vermengt, 5 s zentrifugiert und in den Thermocycler platziert.

Die Schematische Darstellung der PCR-Bedingungen der Exons des *TTBK2*-Gens lautet wie folgt:

Zyklen	Temperatur	Dauer	
1	94 °C	3 min	Initiale Denaturierung
	94 °C	30 s	Denaturierung
35	50-60 °C	30 s	Annealing
	72 °C	40 s*	Extension
1	72 °C	2 min	Terminale Extension
	15 °C		Endtemperatur

Die Annealing Temperatur wurde für die jeweiligen Primer optimiert und variiert somit. Die in den Versuchen angewendeten Temperaturen können nachfolgender Tabelle 10 entnommen werden.

Tabelle 10: Annealing-Temperaturen für die jeweiligen Exons

Exon (neu)	Annealing Temperatur PCR in °C	Größe Exon in Bp	Größe PCR-Produkt in Bp	Ansatz
2	54	136	318	B
3	54	148	422	A
4	54	73	397	B
5	54	141	368	A
6	50	105	330	B
7	53	66	238	A
8	56	93	329	B
9	55	126	457	A
10	55	785	1020	A
11	60	471	717	A
12	55	19	271	A
13	59	158	324	B
14	55	217	375	A
15	58	212	424	B
16	60	589	809	A
17	59	1274	1527	A
18	59	1906, davon 463 codierend	731	A

Ansatz A: ohne Betain Ansatz B: mit Betain

(https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG00000128881;r=15:42738734-42920809;t=ENST00000622375 03/12/2019)

Im Anschluss werden die PCR-Produkte auf ein analytisches Gel aus Agarose aufgetragen, um den DNA-Gehalt zu kontrollieren und mögliche Störbanden zu detektieren.

3.3. Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte

Die Elektrophorese ist eine Methode, mit der man geladene Moleküle im elektrischen Feld auftrennen und isolieren kann, sofern sich diese auf einem Trägermedium oder in freier Flüssigkeit befinden (Gey, 2015).

In den durchgeführten Versuchen wurde das Trägermedium durch ein Agarose-Gel definiert, das sich in einem Gelschlitten befand.

Die negativ geladene DNA wandert beim Anlegen einer elektrischen Spannung im Gel in Richtung Anode. Die Geschwindigkeit, mit der die Fragmente das Gel passieren, ist einerseits abhängig von der Porengröße des Gels, die durch die Konzentration des Agarosegehaltes definiert wird. Andererseits ist sie abhängig von der Größe der Fragmente; kleinere durchlaufen die siebartige Struktur des Agarose-Gels schneller als größere. Weitere Faktoren, die die Laufgeschwindigkeit beeinflussen, sind Ladung und Konformität der DNA-Fragmente sowie die angelegte Spannung (Gey, 2015).

Der Agarosegehalt des Gels wird abhängig von der Größe der DNA-Fragmente gewählt. Für kleinere Fragmente, deren PCR-Produkte bis zu 720 Bp lang sind, wird ein 1,5%iges Agarose-Gel verwendet (Exon 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15), für größere Fragmente hingegen wird das 1%ige Gel gewählt (Exon 10, 16, 17, 18).

Dem Agarose-Gel wurde Ethidiumbromid hinzugefügt, eine interkalierende Substanz, die an Nucleinsäuren bindet und fluoreszierende Eigenschaften aufweist. Auf diese Weise können PCR-Produkte unter einer UV-Lampe sichtbar gemacht werden (Heinrich et al., 2014).

Der eingesetzte Größenstandard pUC/DdeI markiert Banden der Länge 166, 240, 409, 426, 540 und 890 Bp.

3.3.1. Analytisches Agarose-Gel

Das Gel wurde in der vorliegenden Arbeit hergestellt, indem in einem 250 ml Volumen fassenden Erlenmeyerkolben 1 g Agarose für ein 1%iges Agarose-Gel bzw. 1,5 g Agarose für ein 1,5%iges Gel mit 100 ml 1x TBE suspendiert wurde. Das Gemisch wurde für 2 min in der Mikrowelle aufgekocht, mit 4 Tropfen Ethidiumbromid-Lösung versetzt, das entspricht etwa 15 µl, und durch Schwenken gemischt.

Ein Gelschlitten wurde vorbereitet, indem die offenen Seiten mit Klebeband abgeklebt wurden und Kämme eingelassen wurden. Die Suspension wurde in den präparierten Gelschlitten gegossen. Sofern Luftblasen im Gel vorlagen, wurden diese entfernt.

Nach etwa 30 min erstarrte die Suspension und wurde gelartig. Die Klebestreifen an den Seiten wurden entfernt. Die Kämme wurden entfernt und bildeten Taschen, in die PCR-Produkte aufgetragen wurden.

Das Agarose-Gel wurde in einer Kammer positioniert, die mit ausreichend, das Gel bedeckenden, Ladepuffer 1x TBE gefüllt wurde, sodass das Gel mit dem Ladepuffer bedeckt war.

Es wurden je 3 µl PCR-Produkt mit 7 µl 1: 10 verdünntem Ladepuffer vermengt und in die Taschen des Agarose-Gels aufgetragen. In eine weitere freie Tasche wurden 5 µl des Größenstandards pUC/DdeI aufgetragen.

In dem Ladepuffer waren die zwei Farbstoffe Xylene-Zyanol und Bromphenolblau enthalten, wodurch die Wanderungsgeschwindigkeit der Fragmente sichtbar wurde.

Die Kammer verfügte über zwei Spannungsanschlüsse, einen für die Kathode, einen weiteren für die Anode. Diese wurden mit einer Stromquelle verbunden. Es wurde ein Gleichstrom von 40 mA für ca. 25 min angelegt. Anschließend wurde das Gel auf einer UV-Lichtquelle platziert. Die DNA-Banden wurden durch das Interkalieren von Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Ein Bild wurde zur Dokumentation ausgedruckt.

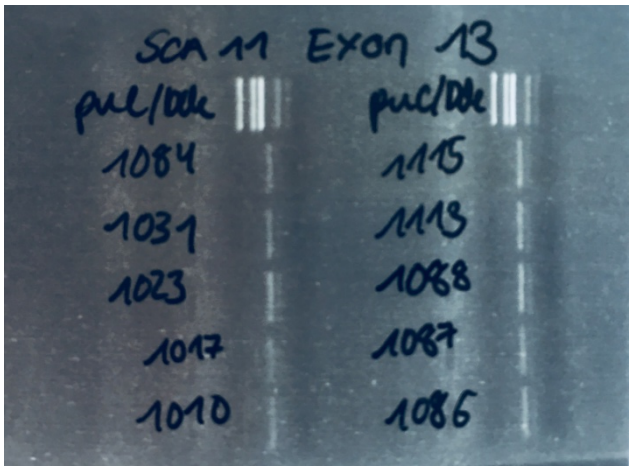


Abbildung 4: Analytisches Gel mit PCR-Produkten und Größenstandard pUC/Dde Bandengrößen: 890, 540, 426, 409, 240 und 166 Bp

3.3.2. Präparatives Agarose-Gel

Die Herstellung präparativer 1%iger bzw. 1,5%iger Agarose-Gele entspricht der Anleitung, die in Kapitel 3.3.1. *Analytisches Agarose-Gel* beschrieben ist.

Ein Gelschlitten wurde vorbereitet, indem die Seiten abgeklebt wurden. Für präparative Gele wurden größere Kämme positioniert, sodass in die resultierenden größeren Taschen ein höheres Volumen aufgetragen werden konnte.

Das Gel wurde in den Schlitten gegossen, nach dem Aushärten wurden Klebestreifen und Kämme entfernt und das Gel in der Kammer platziert.

Der Rest eines PCR-Produktes, ca. 37 µl, wurde mit 3 µl unverdünntem Ladepuffer versetzt und in die Taschen aufgetragen. Nach einer Laufzeit bei 40 mA für ca. 35 min konnten die PCR-Produkte aus dem Gel über einer UV-Lichtquelle extrahiert werden. Zum weiteren Vorgehen siehe 4.2. Extraktion aus Agarose-Gel (QIAGEN Kit).

3.4. Reinigung von PCR-Produkten

Voraussetzung einer erfolgreichen Sequenzierung sind gereinigte PCR-Produkte, die frei von Störfaktoren wie Primern und Nucleotiden sind.

In den Versuchen wurden drei verschiedene Methoden durchgeführt, die nachfolgend erläutert werden.

3.4.1. Reinigungskit OLS OMNI Life Science GmbH

Bei dieser Reinigungsmethode wurde das Reinigungskit von OLS gemäß der Gebrauchsanweisung verwendet.

Ein Spinfilter wurde auf ein 2 ml Volumen fassendes Auffangröhrchen „receiver tube“ gesetzt. 500 µl Bindepuffer BP wurden in den „spin filter“ pipettiert, anschließend wurde die gesamte PCR-Reaktion (ca. 36 µl) hinzugefügt und durch mehrmaliges Pipettieren vermischt.

Das wurde Gemisch für 2 min bei 10.000 rpm zentrifugiert, sodass die DNA an die Fritte des Filters gebunden vorlag.

Der Auffangcup, in dem sich der Durchfluss befand, wurde verworfen, der Säulenfilter wurde auf ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gesetzt.

Abhängig von dem DNA-Gehalt, der mit der Bandenstärke des fluoreszierenden Gels korreliert, wurde Elutionspuffer EB auf die Filtermitte pipettiert. Dadurch löste sich die DNA von der Fritte. Bei hohem DNA-Gehalt wurde ein größeres Volumen Elutionspuffer verwendet, ca. 35 µl, bei wenig Produkt etwa 20 µl.

Nach einer 1 bis 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur fand eine Zentrifugierung für 1 min bei 6000 rpm statt. Das gereinigte PCR-Produkt befand sich anschließend im Eppendorf-Gefäß und wurde bei -20 °C gelagert oder direkt für die Sequenzierung genutzt. Der Spinfilter konnte verworfen werden.

3.4.2. Extraktion aus Agarose-Gel (QIAGEN Kit)

Die Methode der Gelextraktion mittels des Kits QIAquick Gel Extraction wurde angewendet, wenn im analytischen Gel deutliche Störbanden sichtbar waren (z. B. im Rahmen von Mehrfachbanden und Primer-Resten) und wurde nach Angaben des Herstellers verwendet.

Zuerst wurde ein präparatives Agarose-Gel hergestellt, siehe dazu Kapitel 3.3.2. *Präparatives Agarose-Gel.*

Die PCR-Produkte wurden in die Taschen eines Agarose-Gels aufgetragen, ausgeschnitten und gemäß der Gebrauchsanweisung des Herstellers in folgenden Schritten gereinigt.

Der Rest des PCR-Produktes, etwa 37 µl, wurden mit 3,0 µl unverdünntem Ladepuffer versetzt, kurz zentrifugiert und in die Taschen des ausgehärteten Gels aufgetragen. In die kleinen Taschen wurden 5µl des Größenstandards pUC/DdeI pipettiert.

Nach einer Laufzeit von 35 min bei 40 mA wurde das Gel auf einen UV-Illuminator platziert. Die sichtbaren Banden wurden mithilfe eines Skalpells ausgeschnitten, wobei darauf geachtet wurde, die Bande so präzise wie möglich auszuschneiden. Die Banden wurden in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben und auf einer Analysewaage gewogen.

Jeder ausgeschnittenen Bande im Eppendorf-Gefäß wurde das dreifache Volumen des Puffers QG des Kits hinzugefügt. Es folgte eine Inkubation im Wasserbad für 10 min auf 50 °C, wobei die Eppendorf-Gefäße alle 3 min kurz gevortext wurden. Die einfache Menge des ermittelten Gewichtes an Isopropanol wurde anschließend hinzugefügt.

Bis zu 500 µl des Gemisches wurden in eine „QIAquick spin“ Säule pipettiert, die auf einem 2 ml fassenden Auffangröhrchen platziert wurde. Die Röhrchen wurden bei 13.000 rpm für 1 min zentrifugiert, um die DNA im Säulenfilter zu binden. Das Eluat wurde verworfen.

Sofern sich in den anfänglichen Eppendorf-Gefäßen ein Volumen größer 500 µl befand, wurde der beschriebene Schritt wiederholt.

Um alle Agarose-Reste zu entfernen, wurden 0,5 ml des Puffers QG hinzugefügt und für 1 min zentrifugiert. Das Eluat im Auffangröhrchen wurde verworfen und eine weitere Zentrifugation für 1 min folgte.

Anschließend wurden 0,75 ml Puffer PE (Waschpuffer) in den Säulenfilter pipettiert und für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde inklusive des Auffangröhrchens verworfen. Der Säulenfilter wurde auf ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gesetzt.

Anschließend wurde je nach Bandendicke, die unter UV-Licht beurteilt wurde, 30-50 µl Elutionspuffer EB auf den Filter pipettiert, um die DNA zu eluieren. Die Säule wurde nach ca. 1 min Inkubationszeit für 1 min zentrifugiert.

3.4.3. Enzymatische Aufreinigung Exo-SAP1

Die Aufreinigung der PCR-Produkte mittels Exo-SAP1 ist eine enzymatische Variante, die es ermöglicht, Störfaktoren der Sequenzierung zu eliminieren.

Das Enzym Exonuclease 1 (Exo) baut dabei freie Primer ab, das zweite Enzym Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) spaltet Nucleotidtriphosphate zu Nucleosiden und Phosphat.

Abhängig von der Bandenstärke wurden 1-5 µl des PCR-Produktes in einen 0,2 ml Streifen pipettiert und mit 0,5 µl Exo-SAP1 vermengt.

Zuerst wurde eine Temperaturstufe von 37 °C für 15 min gewählt, dies entspricht dem Temperaturoptimum der Enzyme. Es folgte eine Inaktivierung der Enzyme bei 80 °C für 15 min. Anschließend konnte mit diesem Ansatz direkt die Sequenzierungsreaktion angesetzt werden.

3.5. DNA-Sequenzierung

3.5.1. Grundlagen der Sequenzierung

Eine Analyse der Basenabfolge der DNA ist durch die Sequenzierungsreaktion möglich, die auf der Didesoxy-Kettenabbruchmethode beruht (Sanger et al., 1977). Diese erlaubt es, mögliche Veränderungen und Mutationen der Erbsubstanz zu erkennen. Die Sequenzierungsreaktion ist eine enzymatische Methode, bei der einzelsträngige Matrizen-DNA mit einem Primer hybridisiert und von diesem ausgehend ein komplementärer DNA-Strang durch die DNA-Polymerase synthetisiert wird (Jansohn und Rothhämel, 2012).

Im Ansatz des Sequenzierungsgemisches sind sowohl Desoxynucleotide (dNTPs) als auch mit Fluorochromen markierte Didesoxynucleotide (ddNTPs) vorhanden. Die ddNTPs unterscheiden sich von den dNTPs durch eine fehlende freie 3´ Hydroxyl (OH) Gruppe. Nach dem Zufallsprinzip werden entweder dNTPs oder ddNTPs eingebaut. Der Einbau eines ddNTP führt zu einem frühzeitigen Kettenabbruch, da der in Richtung 3´

arbeitende Primer aufgrund der fehlenden OH-Gruppe keine Phosphodiesterbindung zwischen dem ddNTP und einem weiteren dNTP ausbilden kann (Sanger et al., 1977).

Es entstehen unterschiedlich lange DNA-Fragmente, die mit einer fluoreszierenden Markierung enden. Jedes der vier Nucleotide ddTTP, ddATP, ddGTP, ddCTP ist mit einem unterschiedlichen Fluorochrom markiert, sie besitzen verschiedene Emissionsspektra. Bei der Analyse durch einen Kapillarsequenzer werden die Fragmente längenabhängig aufgetrennt. Der Laser des Sequenzers detektiert die Basenabfolge anhand der fluoreszierenden Markierung (Jansohn und Rothhämmel, 2012; Heinrich et al., 2014).

In den Versuchen wurde ein Kapillarsequenzer von ABI Prism 3130XL verwendet (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific).

Eine visuelle Darstellung erfolgt im Elektropherogramm. Verschiedenfarbige Peaks signalisieren die Abfolge der vier Basen (Heinrich et al., 2014).

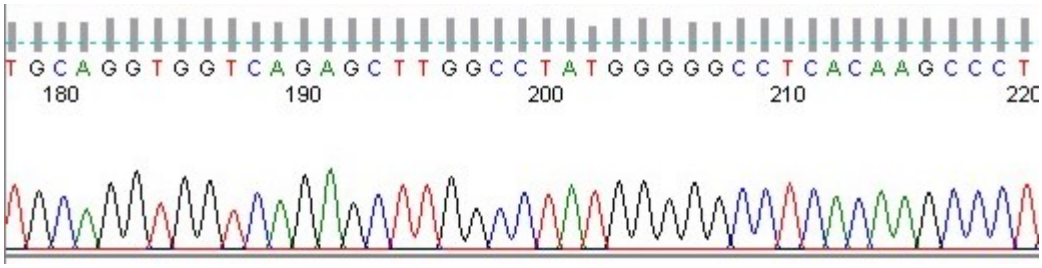


Abbildung 5: Ausschnitt eines exemplarischen Elektropherogramms der Sequenzierung des Exon 11 der DNA des Patienten 684
Die Auswertung erfolgte durch SeqScape v2.5., der rote Peak steht für die Base Thymin, der grüne für Adenin, der blaue für Cytosin und der schwarze für die Base Guanin.

3.5.2. Durchführung der Sequenzierung

In einen 0,2 ml Streifen wurden 0,5-5 µl PCR-Produkt pipettiert, 2,5 µl ABI Sequenzierungs-Mix, 1,5 µl vorwärts (F) Primer oder rückwärts (R) Primer in der Verdünnung von 10 pmol/µl und 1 µl 5x Puffer. Destilliertes Wasser wurde für ein Gesamtvolumen von 15 µl hinzugefügt. Die Menge des verwendeten PCR-Produktes wurde anhand der im UV-Licht sichtbaren Bandenstärke gewählt. Je kräftiger die Bande, desto weniger gereinigtes Produkt wurde für den Ansatz verwendet.

Handelte es sich um besonders lange Exons oder genügte eine Sequenzierung in eine Richtung nicht aus, wurden zwei separate Sequenzierungen mit F und R Primern durchgeführt. In einigen Fällen erfolgte eine zusätzliche Sequenzierungsreaktion mit F1, R1 und/ oder internen (Int) Primern.

Sequenzierungsansatz

2,5 µl ABI Prism v3.1

1,5 µl Primer (10 pmol/µl)

1 µl 5x Puffer

x µl gereinigtes PCR-Produkt

ad 15 µl H_2O destilliert

Sequenzierungszyklus

Einer beginnenden Denaturierung auf hoher Temperatur folgt das Annealing für 10 s und die Extension für 2,5 min. Diese Schritte werden in 25 Zyklen wiederholt.

Zyklen	Temperatur	Dauer	
1	96 °C	1 min	Initiale Denaturierung
	96 °C	10 s	Denaturierung
25	57 °C*	10 s	Annealing
	50 °C	2 min 30 s*	Extension
1	72 °C	2 min	Terminale Extension
	15 °C		Endtemperatur

*exemplarisch 57 °C Annealing-Temperatur und 2 min 30 s Extension bei Exon 11

3.5.3. Aufreinigung der Sequenzierungsreaktion

Die Produkte der Sequenzierungsreaktion müssen gereinigt werden, um potenzielle Störfaktoren der Sequenzanalyse zu entfernen. Dazu nutzt man die Filtration mittels Sephadex G-50 Superfine, welches eine Gelmatrix aus Dextran- und Epichlorhydrinmolekülen ausbildet. Freie Nucleotide, Primer und Verunreinigungen werden in den Poren zurückgehalten, wohingegen die großen DNA-Moleküle passieren können.

Dem Eluat wurde deionisierendes Formamid hinzugefügt, welches die Ausbildung von Sekundärstrukturen verhindert. Solche würden die Analyse der Sequenzierung während der Kapillarelektrophorese durch anormales Wanderverhalten stören.

Durchführung:

Es wurden für jeden zu reinigenden Ansatz 300 µl Sephadex G-50 Superfine, gequollen in TRIS-HCl, in eine beschriftete 96-Well-Multiscreen-Platte pipettiert.

Die Multiscreen-Platte wurde auf eine 96-Well Multiply® PCR-Auffangplatte gesetzt und gewogen. Die aufeinanderliegenden Platten wurden mit einem Gegengewicht austariert und bei 2100 rpm für 2 min zentrifugiert. Das Eluat der Auffangplatte wurde verworfen.

Dieser Schritt wurde wiederholt, nachdem 200 µl gequollenes Sephadex in die Multiscreen-Platte pipettiert wurden. Das Eluat der Auffangplatte wurde ebenfalls verworfen und die Auffangplatte wurde durch eine neue, unbenutzte Platte ersetzt.

Die gesamte Menge der Sequenzierungs-PCR einer Probe, ca. 15 µl, wurde auf eine Sephadexsäule pipettiert. Es wurde erneut das Gegengewicht zu den aufeinanderliegenden Platten ermittelt. Die Platten wurden bei 2100 rpm für 2 min zentrifugiert.

Der in der Auffangplatte befindliche gereinigte Sequenzierungsansatz wurde in eine 24-Well-Platte überführt, 10 µl Formamid wurden pro Well hinzugefügt. Die 24-Well-Platte wurde lichtgeschützt zum Sequenzer transportiert.

3.5.4. Datenauswertung der Sequenzierung

Die Ergebnisse der Sequenzanalyse wurden mit Referenzsequenzen der Datenbanken dbSNP des National Center für Biotechnology Information der USA (NCBI) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/) und dem Ensembl Genome Browser (http://www.ensembl.org/index.html Ensemble Release 97 (Juli 2019)) verglichen. Die bekannten Genome Browser beinhalten Informationen des menschlichen Genoms und anderer Spezies.

Die Wildtypsequenz des *TTBK2*-Gens und Varianten sowie Häufigkeitsangaben dieser sind von den Datenbanken beschrieben und codiert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden mit diesen Daten verglichen.

Die in der vorliegenden Arbeit detektierten Sequenzvarianten werden anhand der Nomenklatur des dbSNP zitiert, sofern von Ensembl und dbSNP beschrieben.

Jede vom Wildtyp abweichende Variante, die an NCBI übermittelt wird, bekommt eine eigene und eindeutige submitted SNP ID Nummer (ss#) zugeordnet. Die Datenbank identifiziert identische, auf dem gleichen Genort befindliche ss# und kreiert ein reference SNP cluster (rs#), das die zusammengehörigen ss# zusammenfasst. Unter rs# findet man verschiedene Informationen zu der jeweiligen Variante (Sherry, 2001).

Das komplette menschliche Genom von über 2500 Menschen aus 26 Populationen wurde im Rahmen des 1000-Genome-Projektes sequenziert und analysiert. Es folgte eine Kategorisierung und Veröffentlichung. Dabei wurden mehr als 88 Millionen Varianten entdeckt, die vom Wildtyp abweichen (Ruano et al., 2014; Auton et al., 2015).

Aufgrund der vielen beschriebenen Varianten wird im Folgenden nur auf solche eingegangen, die bei dem Studienkollektiv festgestellt wurden.

4. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die DNA von 30 Patienten untersucht, die an einer klinisch gesicherten SCA erkrankt waren. Alle 17 codierenden Exons des *TTBK2*-Gens des Transkriptes ENST00000622375.4 wurden mit PCR-Produkten abgedeckt. Mittels Sequenzanalyse konnte die Basenabfolge der Patienten-DNA festgestellt werden und so Rückschlüsse auf etwaige Abweichungen vom Wildtyp erkannt werden. Referenzsequenzen wurden dem Ensembl Genome Browser und dbSNP des NCBI entnommen. Die Sequenzvarianten der Studienpopulation werden gemäß den HGVS-Richtlinien angegeben (http://varnomen.hgvs.org/ 15/08/2019).

4.1. Studienpopulation

Die Studienpopulation setzt sich aus 30 Personen zusammen, die an einer SCA erkrankt sind. Bei der vorherigen Testung anderer bekannter SCA-Loci konnten keine Mutationen nachgewiesen werden. Eine SCA-Diagnostik wurde explizit von den betreuenden Fachärzten der Patienten angefordert. Eine Einverständniserklärung der Patienten nach dem Gendiagnostik-Gesetz lag vor. Ebenso wurde die hier vorliegende Arbeit von der Ethik-Kommission der JLU Gießen, Fachbereich Medizin, gebilligt.

EDTA-Blut der hier untersuchten Patienten, davon 16 weiblich und 14 männlich, wurde zwischen 1999 und 2016 an das Institut für Humangenetik versandt. DNA wurde aus dem Blut extrahiert, nummernkodiert, anonymisiert und im Kühlschrank bei 4 °C asserviert.

Die Patienten des Studienkollektivs sind nicht miteinander verwandt.

Die Patienten weisen ähnliche Symptomatik auf. Es werden Gang- und Standataxie sowie langsam progrediente Bewegungsstörung, cerebelläres oder spinocerebelläres Syndrom und Tremor aufgeführt. Oft werden unspezifische Sehstörungen und eine zentrale Störung der Okulomotorik sowie Nystagmus beschrieben. Weiterhin werden beginnende Demenz, Dysarthrie, Schluckstörung oder eine ungerichtete Fallneigung erwähnt. Wurde bei den Patienten ein MRT durchgeführt, so ist eine Kleinhirnatrophie nachweisbar.

Die SCA11 ist eine genetische Erkrankung mit autosomal dominantem Erbgang. Wichtig ist aus diesem Grund, die Familienanamnese zu erheben und den Stammbaum zu analysieren. Bei den Patienten des Kollektivs wiesen Elternteile, Großeltern, Geschwister oft eine ähnliche klinische Symptomatik auf. In einigen Fällen wurde die Symptomatik als neurologische Erkrankung unklarer Ursache beschrieben. Bei vereinzelten Patienten

war die Familienanamnese leer oder negativ. Bei jenen sind Eltern und Großeltern früh verstorben.

4.2. Angabe der Orientierung

Das *TTBK2*-Gen befindet sich auf dem reversen Strang des langen Arms des Chromosoms 15 von 42.744.352 (3´, zum Centromer weisend) bis 42.920.809 (5´, zum Telomer weisend).

Die Transkription erfolgt am codogenen Strang vom Telomer (5´) zum Centromer (3´). Das Transkript ist komplementär zum reversen Strang.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem Transkript ENST00000622375.4 gearbeitet, welches 6891 Bp umfasst. Das Transkript umfasst 18 Exons, 17 davon sind codierend. Das Exon 1 befindet sich am 5´ Ende des Transkriptes, das Exon 18 weist in Richtung 3´.

Die Allele der Varianten im Ergebnisteil werden entsprechend der Orientierung des Transkriptes des *TTBK2*-Gens angegeben.

Die verwendeten Datenbanken beziehen die Angabe der Allele jedoch teilweise auf die Orientierung des codogenen Stranges, teilweise auf die Orientierung des Transkriptes und können aus diesem Grund abweichen.

4.3. Darstellung der Exons ohne Sequenzvarianten

Die Ergebnisse der Sequenzanalyse wurden mit den Wildtypsequenzen und den Informationen bekannter Varianten verglichen.

Die Auswertung der Exons 3-10 und der Exons 13-17 des *TTBK2*-Gens zeigten bei den 30 Patienten des Studienkollektivs keine vom Wildtyp abweichende Basenabfolge (Exons 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 16, 17 entsprechen der Wildtypsequenz).

4.4. Exons mit Sequenzvarianten

Bei der Auswertung der Exons 2, 11, 12 und 18 wurden Varianten festgestellt. Diese werden im Folgenden genauer erläutert. Die Nomenklatur der nachgewiesenen Varianten bezieht sich auf das Ensembl-Transkript ENST00000622375.4.

4.4.1. Exon 2

I. c.-67G>A, rs16957250

Bei der Sequenzanalyse des Exon 2 wurde an der Position c.-67 im 5´ UTR ein Austausch der Base G zu A festgestellt. Die Variante ist in der Literatur bereits beschrieben (rs16957250).

Die Häufigkeiten der vom Wildtyp abweichenden Varianten werden durch die minor allele frequency (MAF) beschrieben. Die Häufigkeitsangabe bezieht sich dabei auf das zweithäufigste in einer Population vorkommende Allel.

Die MAF des 1000-Genome-Projektes liegt bei dieser SNV bei 0,087. Die Allelfrequenz der Studienpopulation beträgt 0,2 und liegt damit etwas höher als die MAF des 1000-Genome-Projektes.

Die Berechnung der MAF dient dem Vergleich der Häufigkeiten der im Rahmen dieser Arbeit detektierten Varianten gegenüber denen des 1000-Genome-Projektes. Aufgrund des kleinen vorselektierten Kollektivs dieser Arbeit kann jedoch keine signifikante Aussage bezüglich Häufigkeitsverteilungen in der Allgemeinbevölkerung getroffen werden.

In dem Studienkollektiv wurde bei fünf Patienten ein heterozygoter Basenaustausch festgestellt, bei einer Person ein homozygoter.

Mit der Testung 15 weiterer vorselektierter Ataxie-Patienten erweiterte sich das Kollektiv auf 45 nicht miteinander verwandte Personen. Die Einverständniserklärung sowie eine angeforderte SCA-Diagnostik durch die betreuenden Fachärzte lagen vor. Die MAF des erweiterten Kollektivs beträgt ebenfalls 0,2. Sieben Probanden waren heterozygote Träger des Allels, zwei homozygote.

Tabelle 11: Genotyp-Frequenz rs16957250

Heterozygot G|A	Homozygot A|A	Wildtyp G|G	Gesamt
5	1	24	30
0,167	0,033	0,8	1
7	2	36	45
0,16	0,04	0,8	1



Abbildung 6: Ausschnitt der Sequenzanalyse des Exon 2 des *TTBK2*-Gens, c.-67G>A

Die Auswertung erfolgte mit SeqScape v2.5. In der linken Spalte aufgelistet befinden sich die Nummern der anonymisierten Patienten. In der Referenzleiste ist die Position der Variante rs16957250 grau markiert. Das Elektropherogramm des Patienten 1120.1 zeigt die Wildtypvariante, das des Patienten 1008.1 die heterozygote Variante G|A, das des Patienten 1124.1 die homozygote Variante A|A.

Der rote Balken stellt bei den Abbildungen der Sequenzanalyse das Intron dar, der grüne Balken den codierenden Bereich des Exons und der türkise den nicht-codierenden Bereich des Exons.

II. c.-37T>C, rs6493068

Eine SNV wurde bei der Sequenzierung des Exon 2 bei 16 Patienten an Position c.-37 festgestellt. Bei dieser Variante im 5´ UTR lag ein Basenaustausch von T zu C vor.

Es handelt sich bei dieser Missense-Variante um einen benignen SNP, der als rs6493068 codiert wird.

Die Frequenz des Allels T beträgt in der Population aller Getesteten des 1000-Genome-Projektes Phase 3 0,485, die Frequenz des Allels C 0,515.

In der Studienpopulation konnte der Basenaustausch T zu C bei 16 von 30 Patienten festgestellt werden, woraus sich eine MAF der getesteten Studienpopulation von 0,533 berechnet.

Bei 13 der 30 Patienten wurde diese Variante als eine heterozygote festgestellt, bei drei der Patienten als eine homozygote.

Auch in diesem Fall wurde das Kollektiv auf 45 nicht miteinander verwandte Patienten erweitert. Die Einverständniserklärung sowie die angeforderte SCA-Diagnostik durch Fachärzte lagen vor.

Die Frequenz des Allels C betrug 0,511 (23/45). Bei 18 Patienten trat die Variante heterozygot auf, bei fünf homozygot.

Tabelle 12: Genotyp-Frequenz rs6493068

Heterozygot T|C	Homozygot C|C	Wildtyp T|T	Gesamt
13	3	14	30
0,433	0,1	0,467	1
18	5	22	45
0,4	0,111	0,489	1

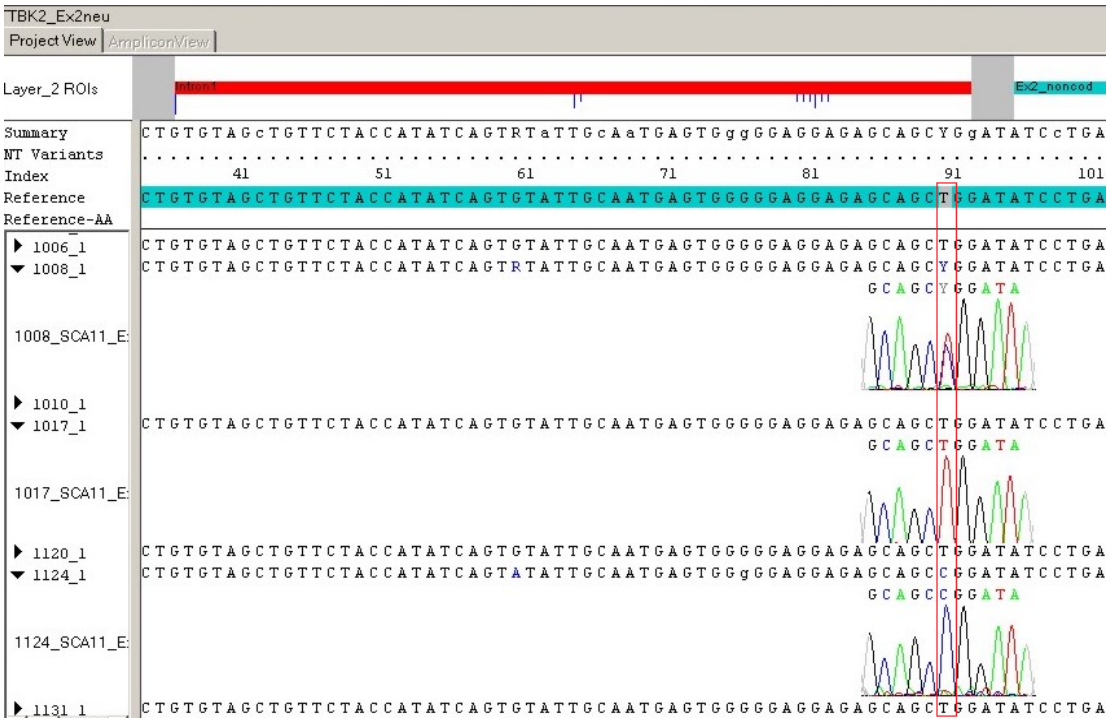


Abbildung 7: Ausschnitt der Sequenzanalyse des Exon 2 des *TTBK2*-Gens, c.-37T>C

Die Auswertung erfolgte mit SeqScape v2.5. In der Referenzleiste ist die Position der Variante II. rs6493068 markiert. Das Elektropherogramm des Patienten 1017.1 zeigt die Wildtypvariante, das von 1008.1 eine heterozygote Variante T|C, das des Patienten 1124.1 eine homozygote Variante C|C.

4.4.2. Exon 11

III. c.1665_1821del157, p.555Qfs*46

Bei der Sequenzierung des Exon 11 wurde eine Frameshift-Variante an Position c.1665_1821 entdeckt. Dabei handelte es sich um eine Deletion von 157 Basenpaaren. Durch diese Deletion entsteht ein Frameshift, der die AS-Sequenz verändert. An AS-Position 555 wird ein Glutamin eingebaut. Die folgenden AS entsprechen nicht der Wildtypsequenz, das Codon 46 wird zum Terminationscodon (p.555Qfs*46). Diese Variante wird von den Genome Browsern wie Ensembl nicht aufgeführt, wurde aber 2009 erstmals von der Arbeitsgruppe um Edener beschrieben (Edener et al., 2009b).

Diese Variante wurde bei drei der 30 Getesteten entdeckt, die MAF beträgt somit 0,1.

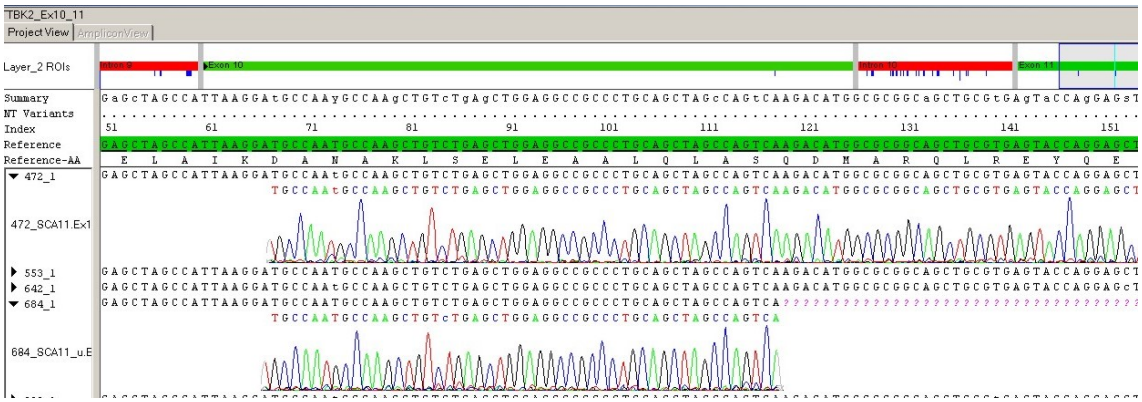


Abbildung 8: Ausschnitt der Sequenzanalyse des Exon 11 des *TTBK2*-Gens, c.1665_1821del157, vorderer Bruchpunkt

Die Auswertung erfolgte mit SeqScape v2.5. Das Elektropherogramm zeigt den vorderen Bruchpunkt der Deletion (Richtung 5´ weisend).

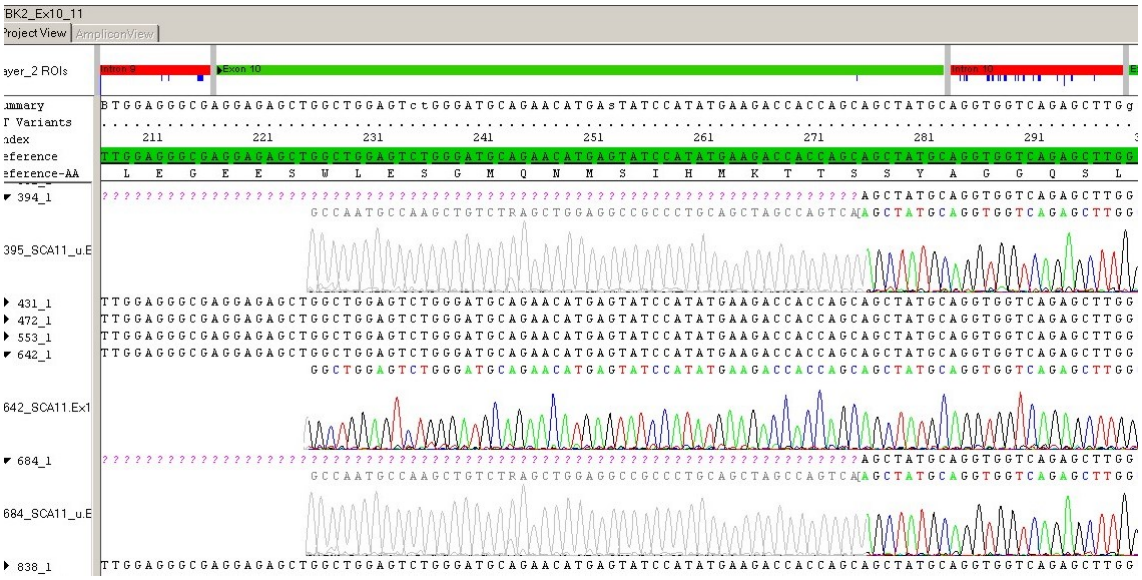


Abbildung 9: Ausschnitt der Sequenzanalyse des Exon 11 des *TTBK2*-Gens, c.1665_1821del157, hinterer Bruchpunkt

Die Auswertung erfolgte mit SeqScape v2.5. Das Elektropherogramm zeigt den hinteren Bruchpunkt der Deletion (Richtung 3´ weisend).

Die Sequenz am vorderen Bruchpunkt lautet bei vorliegendem Wildtyp AA. Am hinteren Bruchpunkt geht die Sequenz ebenfalls mit A weiter. Daher ist nicht eindeutig erkennbar, zwischen welchen Adeninen die Deletion erfolgt.

IV. c.1799G>C, p.Ser600Thr, rs550845568

An der Position c.1799 wurde ein heterozygoter Austausch von G zu C nachgewiesen, das Codon wird von AGT zu ACT modifiziert. Der Austausch hat auf Aminosäureebene an Position 600 einen Austausch von Serin zu Threonin zur Folge (p.Ser600Thr). Diese Missense-Variante ist sehr selten beschrieben und wird mit einer MAF von 0,0002 im 1000-Genome-Projekt angegeben. Nur ein Kolumbianer aus Medellin von 5008 getesteten Probanden wies die Variante auf.

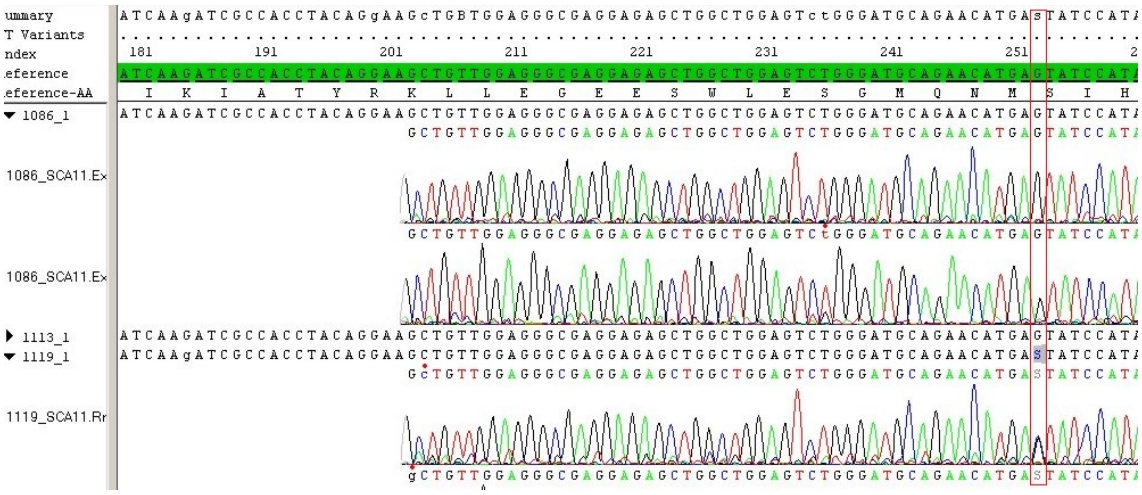


Abbildung 10: Ausschnitt der Sequenzanalyse des Exon 11 des *TTBK2*-Gens, c.1799G>C

Die Auswertung erfolgte mit SeqScape v2.5. Der heterozygote Austausch des Patienten 1119.1 und die Referenzsequenz sind markiert.

Symptome des Patienten 1119.1:

Der Patient 1119.1 leidet seit 2008 an einem ataktischen Syndrom in Kombination mit einer ausgeprägten Sehstörung. Die Familienanamnese des Patienten ist leer. Eine Testung auf häufige SCA-Loci, insbesondere auf SCA7, die häufig mit Sehstörungen assoziiert ist, war negativ.

Nach einer genetischen Beratung wurden Bruder und Mutter dieses Patienten getestet. Beide waren klinisch gesund. Die Basensequenz des Bruders (1119.2) entsprach dem Wildtyp. Bei der Sequenzauswertung der Mutter (1119.3) fiel die gleiche heterozygote Variante wie beim Patienten 1119.1 auf.

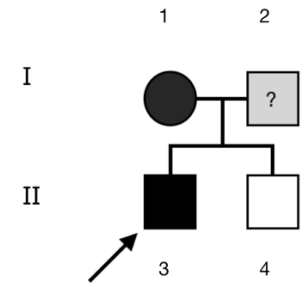


Abbildung 11: Stammbaum der Familie 1119

Symbole in schwarz kennzeichnen Familienangehörige mit der Variante c.1799G>C im Exon 11 des *TTBK2*-Gens. Das graue Symbol repräsentiert den Vater, der nicht zur Testung zur Verfügung stand.

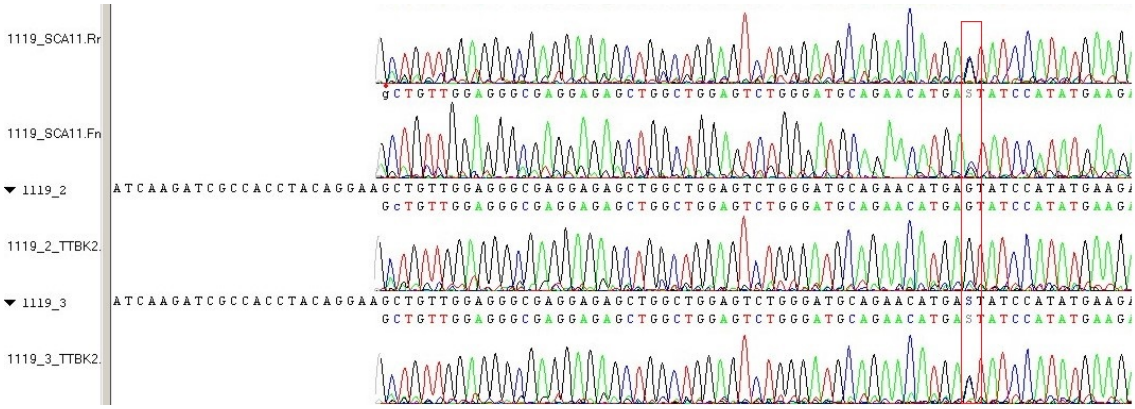


Abbildung 12: Ausschnitt der Sequenzanalyse des Exon 11 des *TTBK2*-Gens, c.1799G>C

Die Auswertung erfolgte mit SeqScape v2.5. Der heterozygote Austausch des Patienten 1119.1, die Wildtypsequenz des Bruders 1119.2 und die heterozygote Variante der Mutter 1119.3 sind markiert.

4.4.3. Exon 12

V. c.2019-52G>A, rs16957168

Bei der Sequenzierung des Exon 12 konnte eine intronische Variante des Intron 11-12 festgestellt werden. Der SNP befindet sich an Position c.2019-52, das bedeutet 52 Bp vor der codierenden DNA-Sequenz von Exon 12. Es handelt sich um einen Basenaustausch von G zu A (IVS 11-52G>A). Die Variante ist als rs16957168 bekannt.

Die MAF der Allgemeinbevölkerung wird mit 0,24 (1000-Genome-Projektes) angegeben. Die errechnete MAF der vorliegenden Ergebnisse beträgt 0,33 (10 von 30).

Im Kollektiv dieser Arbeit zeigten neun Patienten eine heterozygote Variante, ein Patient eine homozygote.

Tabelle 13: Genotyp-Frequenz rs16957168

Heterozygot G|A	Homozygot A|A	Wildtyp G|G	Gesamt
9	1	20	30
0,3	0,033	0,667	1



Abbildung 13: Ausschnitt der Sequenzanalyse des Intron 11-12 und Exon 12 des *TTBK2*-Gens, c.2019-52G>A

Die Auswertung erfolgte mit SeqScape v2.5. Die Position des SNPs rs16957168 ist in der Referenzleiste markiert. Das Elektropherogramm des Patienten 1017.1 zeigt den Wildtyp. Das Elektropherogramm der Patienten 1084.1 und 1115.1 zeigt eine heterozygote Variante G|A, das von 1088.1 eine homozygote Variante A|A.

4.4.4. Exon 18

VI. c.4635A>G, p.Pro1545=, rs201347313

Im Exon 18 konnte an der Position c.4635 ein heterozygoter Basenaustausch bei einem Patienten nachgewiesen werden. Der Austausch von A zu G an dritter Stelle des Tripletts führt zu einem modifizierten Codon CCG anstelle von CCA. Das hat keine Änderung der Aminosäurensequenz zur Folge, beide Tripletts codieren für Prolin (p.Pro1545=). Die synonyme Variante wird in der Literatur mit der Nummer rs201347313 zitiert. Die MAF ist kleiner 0,01 beschrieben (Ensembl release 97). Die Frequenz des getesteten Kollektivs liegt bei 0,03 (1/30).

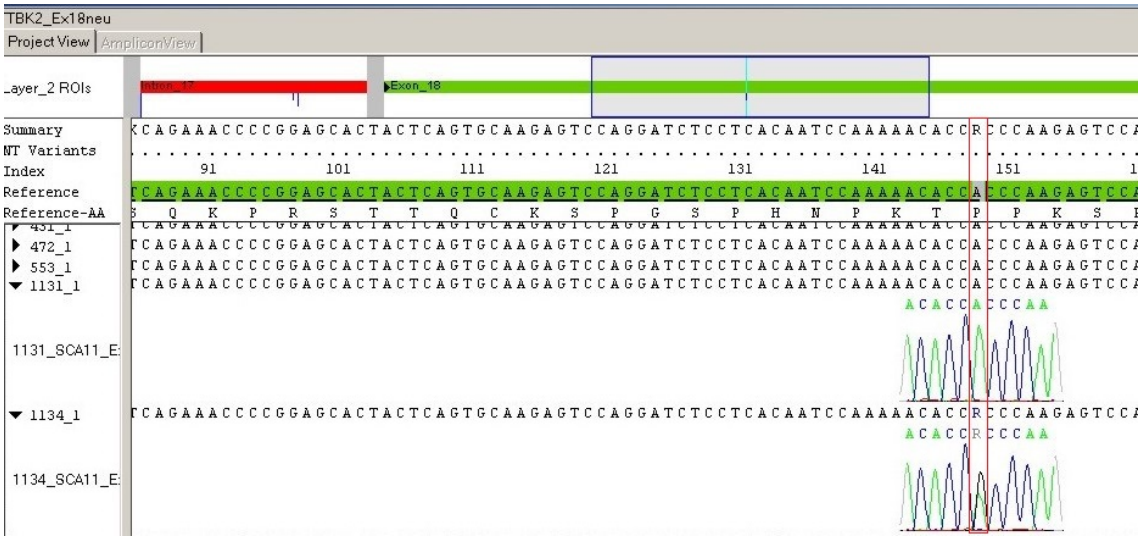


Abbildung 14: Ausschnitt der Sequenzanalyse des Exon 18 des *TTBK2*-Gens, c.4635A>G

Die Auswertung erfolgte mit SeqScape v2.5. In der Referenzleiste ist die Position der Variante rs201347313 markiert. Das Elektropherogramm des Patienten 1131.1 zeigt die Wildtypvariante, das von 1134.1 eine heterozygote Variante A|G.

4.5. Übersicht in dieser Arbeit nachgewiesener Varianten

In Tabelle 14 sind alle im Rahmen der Arbeit gefunden Varianten des Studienkollektivs dargestellt.

Tabelle 14: Übersicht gefundener Varianten im *TTBK2*-Gen

Lokalisation	**Bezeichnung**	**AS-Austausch**	**#rs-Nummer**	**MAF** 1000-Genome-Projekt	**MAF** Patienten-kollektiv
Exon 2	c.-67G>A		rs16957250	0,087	0,2
	c.-37T>C		rs6493068	0,515	0,533
Exon 11	c.1665_1821del157	p.555Qfs*46			0,1
	c.1799G>C	p.Ser600Thr	rs550845568	0,0002	0,033
Intron 11-12	c.2019-52G>A		rs16957168	0,24	0,333
Exon 18	c.4635A>G	p.Pro1545=	rs201347313	0,00006	0,033

Alle Varianten beziehen sich auf das Transkript TTBK2-208 (ENST00000622375.4).

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Patientenkollektiv aus 30 Ataxie-Patienten, von denen DNA zur Verfügung stand, auf das Vorliegen einer SCA11 getestet. Die Ataxie-Loci SCA1-3, 6-8, 10, 12, 14, 17, 19, 23, 27 und 28 konnten durch vorherige Testung ausgeschlossen werden. SCA11 wird autosomal dominant vererbt, die Erkrankung ist durch progressive cerebelläre Ataxie, Nystagmus und Sakkaden gekennzeichnet. Weitere Symptome wie periphere Neuropathie, Dysarthrie, Schluckbeschwerden und Dystonie können auftreten (Houlden et al., 2007; Giunti et al., 2012). Ursächlich sind Mutationen im *TTBK2*-Gen, das im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde.

5.1. Häufigkeit der SCA11

Mit einer geschätzten Prävalenz von 0,9-3/100.000 in Europa zählen die Spinocerebellären Ataxien zu den seltenen Erkrankungen (Bauer et al., 2010). Die Prävalenz der SCA weltweit wird mit etwa 3/100.000 angegeben (Schöls et al., 2004). Unter dem Begriff „seltene Erkrankungen“ werden Erkrankungen zusammengefasst, die mit einer geringeren Prävalenz als 1/2000 auftreten (https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Education_AboutRareDiseases.php?lng=EN). Jedoch resultieren die epidemiologischen Daten der SCA aus Ergebnissen einiger weniger Studien, die in abgegrenzten geographischen Regionen erhoben wurden. Sie können daher nicht das weltweite Auftreten der Krankheiten widerspiegeln. Die tatsächliche Prävalenz wird wahrscheinlich unterschätzt (Schöls et al., 2004). Prävalenzstudien wurden selten erhoben (Van De Warrenburg et al., 2002).

Der häufigste SCA-Subtyp weltweit ist die SCA3, der zweithäufigste ist die SCA2. Beide werden durch Repeat-Expansionen verursacht. Verschiedene SCA-Subtypen kommen in bestimmten Regionen gehäuft vor, was u. a. durch Gründereffekte erklärbar ist. Die SCA2 stellt den häufigsten Subtyp in Holguín (Kuba) und Cantabria (Spanien) dar, wohingegen die SCA3 z. B. in Portugal der häufigste Subtyp ist (Ruano et al., 2014; Bird 1998, Last Revision 2019).

SCA11 wurde bis heute bei nur vier Familien nachgewiesen, darunter in einer deutschen (Bauer et al., 2010). Weniger als 1 % der Patienten mit ADCA der Gruppe III leiden an einer SCA11, die genaue Prävalenz der SCA11 ist unbekannt (Bauer et al., 2010; Houlden et al., 2008, Last Update 2019).

Das in der vorliegenden Arbeit getestete Kollektiv von 30 Patienten ist zu klein, um Angaben zur Häufigkeit der SCA11 in Deutschland treffen zu können. Die Daten dieser

Arbeit weisen darauf hin, dass SCA11 in Deutschland vermutlich auf wenige Familien beschränkt vorkommt.

5.2. Genetik der SCA11

Die Arbeitsgruppe um Houlden identifizierte im Jahr 2007 Punktmutationen im *TTBK2*-Gen als ursächlich für SCA11. Das *TTBK2*-Gen befindet sich in der chromosomalen Region 15q15.2 und reicht auf dem reversen Strang von 42,738,730 bis 42,920,809 (ENSG00000128881). Durch alternatives Spleißen existieren acht Transkriptvarianten des *TTBK2*-Gens, davon sind sieben proteincodierend. Die bekannten Mutationen wurden durch Untersuchungen des Transkriptes TTBK2-201 (ENST00000267890.11) identifiziert. Dieses ist das längste der acht Transkripte, es umfasst 10.905 Bp und codiert für ein Protein von 1244 AS. Bei dieser Transkriptvariante sind 14 der 15 Exons codierend (Houlden et al. 2007; Bauer et al., 2010; http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000128881;r=15:42738734-42920809;t=ENST00000622375 15/08/2019; Houlden et al., 2008, Last Update 2019).

In den Untersuchungen dieser Arbeit wurde mit dem Transkript TTBK2-208 (ENST00000622375.4) gearbeitet. Das Transkript ist mit 6891 Bp kürzer, das Protein ist jedoch 1649 AS lang, da diese Transkriptvariante die einzige ist, die drei zusätzliche Exons aufweist (Exon 10, 11 und 12) (siehe Abbildung 1: *TTBK2*-Gen und bekannte Transkriptvarianten).

Die fünf weiteren proteincodierenden Transkriptvarianten umfassen weniger als 2000 Bp und weisen weniger als 12 Exons auf (TTBK2-207 hat 12 Exons, TTBK2-205 hat 11, TTBK2-203 und TTBK2-202 haben 5, TTBK2-204 hat 4 Exons).

5.2.1. Bekannte Mutationen in *TTBK2*

Bei den vier an SCA11 erkrankten Familien sind Insertionen bzw. kleine Deletionen im *TTBK2*-Gen ursächlich, die zu einem verkürzten Protein führen mit der Folge eines Funktionsverlustes. Die drei Mutationen sind in Exon 12 (c.1306_1307delGA, rs318240735) und 13 (c.1329dupA, rs80356538; c.1287_1288delAG, rs80356539) lokalisiert (Bauer et al., 2010; Houlden et al., 2008, Last Update 2019).

Eine dänische Arbeitsgruppe um Lindquist konnte eine Frameshift-Mutation in Exon 12 des *TTBK2*-Gens nachweisen (c.1205_1207delinsA, p.(Thr402fs)) mit der Folge eines auf 402 AS verkürzten Proteins. Die Mutation wurde de novo bei einer 1968 geborenen Dänin entdeckt. Ihre Eltern und ihr Bruder sind gesund, ihre zwei Söhne sind beide

heterozygote Träger und entwickelten eine ähnliche Ataxie-Symptomatik. Der Krankheitsbeginn wird in dieser Familie bereits in Kindheitsjahren berichtet, früher als bei den vier bekannten, an SCA11 erkrankten Familien (Lindquist et al., 2017).

Von der chinesischen Arbeitsgruppe um Deng wurde eine neue Mutation c.3290T>C, p.Val1097Ala in Exon 15 des *TTBK2*-Gens bei einer Familie mit hereditärer Ataxie detektiert. Die anhand von Programmen ermittelte Vorhersagewahrscheinlichkeit der Proteinfunktion gibt an, dass diese Mutation wahrscheinlich zu einer Schädigung des Proteins führt (Deng et al., 2019).

Die beiden Alterationen im *TTBK2*-Gen, die durch die dänische und chinesische Arbeitsgruppe beschrieben wurden, bedürfen noch weiteren Untersuchungen, z. B. um zu überprüfen, ob diese Mutationen tatsächlich Ursache der Ataxie der Patienten sind und auch, um den genauen Pathomechanismus der Mutationen zu verstehen (Lindquist et al., 2017; Deng et al., 2019). Die beiden Alterationen werden derzeit noch nicht von den Genome Browsern wie dbSNP als ursächliche Mutationen einer SCA11 aufgeführt.

Aus den Untersuchungen der dänischen und chinesischen Arbeitsgruppe ist anzunehmen, dass die Dunkelziffer, der an SCA11 erkrankten Personen durchaus etwas höher ist, als bisher erwartet, wenngleich es sich um eine seltene Erkrankung handelt, die bis dato bei höchstens sechs Familien diagnostiziert wurde.

5.3. Identifizierte Sequenzvarianten im nicht codierenden Bereich des *TTBK2*-Gens

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei bekannte Varianten im 5´ UTR an Position c.-67G>A (rs16957250) und c.-37T>C (rs6493068) nachgewiesen. Im Intron zwischen Exon 11 und 12 wurde eine SNV an Position c.2019-52G>A (rs16957168) festgestellt.

Nur ca. 2 % des menschlichen Genoms bestehen aus Exons. Die Sequenzierung der codierenden Region kann etwa 25 bis 50 % der genetischen Diagnosen erbringen. Ein großer Anteil des menschlichen Genoms besteht aus funktionellen Elementen, die sich in nicht codierenden Bereichen befinden. Mutationen in nicht codierenden Bereichen, die die Funktion regulatorischer Elemente beeinflussen, können Einfluss auf die Genexpression haben und so die Ursache von diversen Krankheiten sein (Scacheri und Scacheri, 2015).

Veränderungen der Genexpression können u. a. auf Ebene der Transkription gesteuert werden. Eine Kontrolle der Transkription kann durch Transkriptionsfaktoren erreicht werden, die mit regulatorischen Sequenzen interagieren können. Diese regulatorischen Sequenzen sind in Promotor- und Enhancer-Regionen der Zielgene vorhanden sind. Es wurden Schlüsseltranskriptionsfaktoren identifiziert, die viele zelluläre Reaktionen regulieren. Dazu zählen insbesondere Transkriptionsfaktoren, die zur CAAT-Familie der Enhancer-Binding-Proteinfamilie gehören. Viele pathophysiologische Zustände konnten mit einer Fehlfunktion derer in Verbindung gebracht werden. Es wurden einige Mutationen der CAAT/ Enhancer-Binding-Protein (C/EBP) entdeckt, wie z. B. C/EBP alpha bei Patienten mit akuter myloische Leukämie. Bei solchen Mutationen ist die Promotoraktivität drastisch reduziert mit der Folge einer veränderten Proteinmenge (Ramji und Foka, 2002; Maston et al., 2006)).
Es sollte überprüft werden, ob es sich bei den Varianten c.-67G>A und c.-37T>C um Promotor-, Enhancer-, oder andere regulatorische Sequenzen handelt, die eine veränderte bzw. reduzierte Menge an TTBK2 zur Folge haben.

Varianten im 5´ UTR können durch Beeinflussung regulatorischer Elemente Einfluss auf die Translation haben. Die Translationsinitiation kann z. B. durch 5´ UTR-Strukturen in eukaryotischer mRNA kontrolliert werden (Leppek et al., 2018).
Die Arbeitsgruppe um Hornig konnte feststellen, dass die Mutation c.-547C>T im 5´ UTR des Androgenrezeptors zu einer Reduktion der Translation führt und so zu einer Androgenresistenz führen kann. Außerdem werden Mutationen im 5´ UTR beschrieben, die zu Brustkrebs und Prostatakrebs führen können (Hornig et al., 2016).
Weiterhin kann die Translationseffizienz durch die Kozak-Sequenz beeinflusst werden, eine das Translationsstartcodon AUG umgebende Sequenz der mRNA. Eine starke Kozak-Sequenz verbessert z. B. das Erkennen von Startcodons (Leppek et al., 2018). Die Varianten c.-67G>A und c.-37T>C sind jedoch zu weit vom Startcodon entfernt, sodass diese die Kozak-Sequenz nicht betreffen.

Die durchschnittliche Häufigkeit des selteneren A-Allels bei der bekannten Variante an Position c.-67G>A wird in der Literatur mit 8,7 % angegeben (1000-Genome-Projekt), die Variante konnte im getesteten Kollektiv bei 20 % der Proben nachgewiesen werden. Wenn man die Häufigkeitsverteilung dieser Variante zwischen verschiedenen Kontinenten betrachtet, fällt auf, dass diese zwischen 0,6% in Afrika und 15,7% in Ost-Asien divergiert. In Europa beträgt die durchschnittliche Häufigkeit 10,1 %. Eine Häufigkeit von 18,8% wird bei in Kalifornien Lebenden mexikanischer Herkunft beschrieben. Aufgrund divergierender Häufigkeiten zwischen den Populationen ist es wahrscheinlich, dass die

Variante c.-67G>A ohne pathologische Konsequenz im Kollektiv häufiger detektiert wurde.

Etwa die Hälfte der Allgemeinbevölkerung weist an Position c.-37 ein T auf (51,5 %), die andere Hälfte ein C (48,5 %) (Ensembl release 97). Annähernd die gleiche Häufigkeitsverteilung konnte im Ataxie-Kollektiv dieser Arbeit nachgewiesen werden; 53,3 % weisen an dieser Position ein T auf, 46,7 % ein C. Aus diesem Grund scheint es sich bei dieser Variante eher um einen benignen Polymorphismus zu handeln als um eine pathogene Mutation.
Auch wenn es sich bei den beiden bekannten Varianten im 5´ UTR wahrscheinlich um benigne Polymorphismen handelt, sollte anhand weiterer Untersuchungen überprüft werden, ob Elemente betroffen sind, die zu einer Beeinträchtigung der Transkriptions- oder Translationseffizienz führen.

Präzises Spleißen der mRNA ist für die Proteintranslation essentiell. Es ist u. a. von cis-Sequenzen abhängig, die Exon-Intron-Grenzen und regulatorische Sequenzen definieren. Varianten in bestimmten Abschnitten von Introns können zu Spleißvarianten führen, die ein Exon-Skipping oder das Verwenden falscher Spleißstellen zur Folge haben, das Leseraster der Translation verschieben oder zu einer Änderung der Proteinstruktur führen. Beispielsweise kommt es beim Vorliegen der Mutation c.253-19_253-16del des *F9*-Gens bei Hämophilie B zu ineffizientem Spleißen und zu einem Exon-Skipping des Exon 3 durch eine Verkürzung des Polypyrimidin-Abschnittes von 24 auf 20 Nucleotide (Schaaf und Zschocke, 2018; Abramowicz und Gos, 2018).
Bei der intronischen Variante c.2019-52G>A (rs16957168) ist die nachfolgende Basensequenz unverändert, sodass falsches Spleißen oder Exon-Skipping nicht anzunehmen sind. Zudem ist die identifizierte Variante c.2019-52G>A eine häufige, die bei 24 % der Allgemeinbevölkerung (Ensembl release 97) und bei 33 % des Studienkollektivs nachweisbar ist.

5.4. Identifizierte Sequenzvarianten im codierenden Bereich des *TTBK2*-Gens

5.4.1. Exon 18

Bei der Sequenzanalyse des Exon 18 wurde bei einem Patienten des Studienkollektivs eine synonyme Variante c.4635A>G nachgewiesen. Hierbei liegt ein Basenaustausch von A zu G vor, sodass das Codon CCG anstelle von CCA verwendet wird. Aufgrund der Degeneriertheit des genetischen Codes ist die Aminosäurensequenz des Proteins

unverändert (p.Pro1545=). In den Datenbanken ist diese Variante als rs201347313 bekannt. Die Häufigkeit des selteneren Allels wird kleiner als 1 % angegeben, in einem ca. 250.000 Personen umfassenden Kollektiv konnte diese bei 0,0064 % nachgewiesen werden (Ensembl release 97; gnomAD exomes 9). Im Ataxie-Kollektiv dieser Arbeit konnte die Variante bei einem Patienten festgestellt werden (3,3 %).

Unterschiedliche Spezies verwenden synonyme Codons verschieden häufig. Dieses Phänomen wird als „Codon Usage“ bezeichnet. Damit kann das Verwenden eines anderen synonymen Codons Auswirkungen auf Prozesse wie z. B. RNA-Prozessierung, Protein-Translationsgeschwindigkeit und Proteinfaltung haben und dadurch die Genexpression beeinflussen (Fredrick und Ibba, 2010; Plotkin und Kudla, 2011).

Das Triplett CCA wird mit einer Frequenz von 16,9/1.000 verwendet, das synonyme Codon CCG wird mit einer Frequenz von 6,9/1.000 seltener verwendet (https://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=9606 30/08/2019).

Durch Bestimmungen der TTBK2-Menge in Zellkulturen, die die Variante c.4635A>G tragen, könnte untersucht werden, in welchem Ausmaß die Codon Usage die Menge des Proteinproduktes beeinflusst. Dadurch könnte festgestellt werden, ob durch das weniger häufig verwendete Codon eine Konsequenz im Sinne einer reduzierten Proteinmenge resultiert.

5.4.2. Exon 11 c.1665_1821del157, p.555Qfs*46

Bei drei der 30 getesteten Patienten wurde bei der Sequenzierung des Exon 11 eine Deletion von 157 Basenpaaren an der Position c.1665_1821 entdeckt. Durch den resultierenden Frameshift ist die AS-Sequenz verändert. An AS-Position 555 wird ein Glutamin eingebaut, die folgenden 45 Aminosäuren entsprechen nicht der Wildtypsequenz und an Position 601 kommt es zur Termination. Diese Variante wird bis dato nicht in den Genome Browsern aufgeführt. Die Arbeitsgruppe um Edener konnte bei der Sequenzierung des Transkriptes TTBK2-208 die gleiche Deletion über 157 Bp in Exon 11 feststellen. Diese Variante konnte bei 8,5 % der Ataxie-Patienten nachgewiesen werden sowie bei 12,5 % einer Kontrollkohorte aus 95 nicht verwandten Individuen (Edener et al., 2009b). Im Ataxie-Kollektiv dieser Arbeit wurde die Variante bei 10 % der untersuchten DNA-Proben auf einem Allel festgestellt.

Die Häufigkeitsverteilung dieser Variante bei Gesunden und Ataxie-Patienten spricht gegen ein krankheitsverursachendes Potential (Edener et al., 2009b).

Lediglich das Transkript TTBK2-208 weist die Exons 10, 11 und 12 auf. Bei den anderen Transkripten TTBK2-201, TTBK2-205, TTBK2-207 befindet sich dort intronische Sequenz (siehe Abbildung 1: *TTBK2*-Gen und bekannte Transkriptvarianten). Daher ist es möglich, dass bei Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, die vorwiegend mit dem Transkript TTBK2-201 arbeiteten, diese Deletion nicht detektiert wurde und daher nicht in Genome Browsern aufgeführt ist.

Durch Untersuchungen mit Antikörpern konnte festgestellt werden, dass das Protein TTBK2 in endokrinem Gewebe, im Rückenmark und Immunsystem, in glattem Muskelgewebe, in Lunge, Leber und Gallenblase, im Pankreas, in Hodengewebe sowie in Brustgewebe der Frau nachweisbar ist. Die Expression der RNA ist im Hoden am höchsten, folgend von Strukturen des Hirns (cerebraler Cortex, Pons, Medulla, Cerebellum) (https://www.proteinatlas.org/ENSG00000128881-TTBK2/tissue#gene_information 08/09/2019).

Auf die Gewebespezifität der unterschiedlich langen Transkripte wurde bei diesen Untersuchungen nicht eingegangen. Diese sollte genauer untersucht werden. Durch Mutationen verursachte Veränderungen der TTBK2 im Rückenmark, im Kleinhirn oder in anderen neuronalen Strukturen können ursächlich für die Ausprägung einer SCA11 sein, während veränderte TTBK2 in anderen Geweben, wie z.B. im Hoden, eher keinen Einfluss auf die Entstehung einer SCA11 hat. Derzeit ist weiterhin nicht bekannt, mit welcher Häufigkeit das Transkript TTBK2-208 in welchem Gewebe nachweisbar ist. Edener und Kollegen konnten das 18 Exons umfassende Transkript weder in Lymphoblasten der Ataxie-Patienten noch in solchen der Kontrollgruppe nachweisen (Edener et al., 2009b). Es sollten Experimente durchgeführt werden, die die Expression des Transkriptes TTBK2-208 in neuronalen Strukturen untersuchen, die in die Pathogenese von Bewegungsstörungen und Ataxie-Symptomatik involviert sind.

5.4.3. Exon 11 c.1799G>C, p.Ser600Thr

Der Patient 1119.1 leidet seit 2008 an einem ataktischen Syndrom, kombiniert mit einer ausgeprägten Sehstörung. Die Familienanamnese des Patienten war leer. Eine Testung auf häufige SCA-Loci, insbesondere auf SCA7, die mit Sehstörungen assoziiert ist, war negativ.
Bei diesem Patienten konnte in Exon 11 eine Variante nachgewiesen werden, die zu einem Austausch von Guanin zu Cytosin an Position c.1799 führt. Folge ist eine

veränderte Aminosäuresequenz. Es wird an Position 600 Threonin anstelle von Serin verwendet (c.1799G>C, p.Ser600Thr).
Diese Variante wird in Datenbanken (Ensembl.org) als rs550845568 beschrieben und wurde bei nur einem von 5008 Probanden detektiert. Bei der Person handelt es sich um einen Kolumbianer aus Medellin, sein Gesundheitsstatus und sein Alter sind nicht in der Datenbank erfasst.

Die klinisch gesunden Familienangehörigen des Index-Patienten 1119.1, Bruder und Mutter, wurden auf das Vorliegen der Variante c.1799G>C getestet. Die Basensequenz des Bruders entspricht dem Wildtyp. Die klinisch gesunde Mutter ist heterozygote Trägerin der Variante c.1799G>C. Die DNA des Vaters lag nicht vor, sodass diese nicht untersucht werden konnte (vergleiche Abbildung 11: Stammbaum der Familie 1119).
Bei den vier gesichert an SCA11 erkrankten Familien wird über eine vollständige Penetranz berichtet (Lindquist et al., 2017). Daher ist es eher unwahrscheinlich, dass die Mutter des Index-Patient 1119.1 erst viele Jahre nach ihrem Sohn erkrankt und eine ataktische Symptomatik aufgrund derselben Variante entwickelt. Eine aktuelle Anamnese der Mutter wäre jedoch interessant, um dies zu überprüfen.

Durch die Änderung der AS-Sequenz des Proteins können sich Auswirkungen auf die Proteinfunktion ergeben. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Variante einen Effekt auf die Proteinfunktion hat, kann von Genome Browsern wie Ensembl anhand verschiedener Programme vorhergesagt werden. Die Wahrscheinlichkeit wird unter Beachtung verschiedener Eigenschaften des Proteins, wie z. B. chemischer, physikalischer und der Sequenz-Homologie, errechnet.
Für die Variante rs550845568 wird der SIFT-Wert mit 0,5 angegeben, was auf eine Tolerierbarkeit der Variante hindeutet. Der SIFT-Wert wird jedoch mit geringer Konfidenz beurteilt. Der PolyPhen-Wert für diese Variante ist unbekannt. Der CADD Score liegt bei 8 und bedeutet, dass die Variante wahrscheinlich benigne ist. Der REVEL Score beträgt 0,098 und impliziert, dass die Variante wahrscheinlich benigne ist. Der MetaLR Score beträgt 0,19, was eine Tolerierbarkeit bedeutet(http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Mappings?db=core;r=15:42800686-42801686;v=rs550845568;vdb=variation;vf=454895952#ENST00000622375_454895952_G_tablePanel 02/08/2019). Die in silico Analysen weisen darauf hin, dass es sich bei der Variante wahrscheinlich um eine benigne handelt, die toleriert wird.

Die DNA des Patienten 1119.1 wurde im Rahmen der Doktorarbeit von Frau Ley auf Mutationen im *KCNC3*-Gen (SCA13) untersucht. Dabei konnte eine Variante im 5´ UTR des *KCNC3*-Gens, 6 Basen vor dem Startcodon der Translation (c.-6C>A, rs111909830), nachgewiesen werden. Diese Variante befindet sich im konservierten Bereich um den Translationsstart und kann möglicherweise die Effizienz der Translation beeinflussen und hat einen möglichen Einfluss auf die Transkription (Ley, 2018).
Die Variante ist in den Datenbanken als rs111909830 hinterlegt und wurde zuvor nur einmal bei einem Asiaten nachgewiesen. Die DNA der Mutter und des Bruders des Index-Patienten 1119.1 wurden untersucht. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die Variante c.-6C>A beim jüngeren Bruder des Index-Patienten nachweisbar ist, dieser zum Zeitpunkt der Testung jedoch keinerlei klinische Symptomatik aufweist. Die DNA der Mutter entsprach dem Wildtyp. Eine putative Pathogenität dieser Variante ist möglich unter der Berücksichtigung, dass der jüngere Bruder als Träger der Variante in späteren Jahren erkranken kann (Ley, 2018).

Oft führt nicht die Mutation nur eines Gens zu einer Erkrankung oder einem auffälligen Phänotyp, sondern häufig scheinen komplexe genetische Modelle als ursächlich, bei denen Mutationen mehrerer Gene eine spezifische Krankheit verursachen oder modulieren können. Oligogene Erbgänge und multiloculäre genetische Ursachen konnten für Krankheiten identifiziert werden, die ursprünglich als monogener Erbgang verstanden wurden, wie z. B. die Phenylketonurie. Studien zur Gen-Netzwerkanalyse stützen die Annahme, dass ein auffälliger Phänotyp selten das Ergebnis einer Mutation eines alleinigen Gens ist und zeigen, dass eine Vielzahl an Krankheiten durch mehrere Gene moduliert werden (Papadimitriou et al., 2019).

Eine mögliche Erklärung für die klinische Symptomatik des Index-Patienten 1119.1 könnte das gleichzeitige Vorliegen der beiden Varianten rs550845568 im *TTBK2*-Gen und rs111909830 im *KCNC3*-Gen sein. Damit wäre erklärbar, dass Mutter und Bruder, beide nur Träger je einer Variante, an keiner ataktischen Symptomatik leiden. Erst das Vorliegen der beiden entdeckten Varianten in Kombination führt möglicherweise durch einen komplexen, bisher unverstandenen Mechanismus zu einer ataktischen Symptomatik, wie sie bei dem Patienten 1119.1 vorliegt.

5.5. Der C-Terminus der TTBK2

Das Protein TTBK2 des Transkriptes TTBK2-201 besteht aus 1244 AS, wobei die Reste 21-280 die Kinasedomäne bilden (Liao et al., 2015) (vergleiche 1.4.3.2 Bekannte

Mutationen im *TTBK2*-Gen (Phänotyp SCA11), Abbildung 2: Darstellung der Domänen der Tau-Tubulin Kinase).

Die Kinasedomäne des Transkriptes TTBK2-208 wird von den AS-Resten 1-264 gebildet (https://www.uniprot.org/uniprot/Q8IWY7 02/08/2019).

Zwischen dem Ende der Kinasedomäne und der AS-Position 448 des Transkriptes TTBK2-201 befindet sich ein Serin-reiches Segment. Dieses beinhaltet die Aminopeptidase Q und Kollagen alpha-1 (XVIII) Sequenzen, deren Funktionen noch unerforscht sind (Liao et al., 2015).

Der lange C-Terminus, der sich bei dem Transkript TTBK2-201 C-terminal des Restes 448 befindet, ist wichtig, um TTBK2 zur Muttercentriole zu lenken und wahrscheinlich für die Regulation der Funktion der TTBK2 (Liao et al., 2015).

Es konnte festgestellt werden, dass der C-Terminus der TTBK2 (AS-Rest 450-1243) für die Selbstinteraktion essentiell ist. Anhand von Untersuchungen an Knock-in Mäusen mit SCA11-ähnlichen Mutationen konnte die Arbeitsgruppe um Bowie feststellen, dass durch ein verkürztes Protein die Regulation von TTBK2 und die Wechselwirkung von TTBK2 mit dessen Substraten beeinträchtigt wird. Da die Verkürzung des mutierten Proteins nicht die gesamte Länge betrifft, ist es wahrscheinlich, dass das Protein dominant negativ wirkt, indem es mit dem Protein voller Länge um die Bindung an ein oder mehrere andere Proteine konkurriert (Bowie et al., 2018).

Die drei beschriebenen SCA11-Mutationen führen alle zu einem auf ca. 450 AS verkürzten Protein mit der Folge, dass der C-Terminus des Proteins fehlt (Houlden et al., 2007; Houlden et al., 2008, Last Update 2019).

Die von der dänischen Arbeitsgruppe um Lindquist detektierte Frameshift-Mutation c.1205_1207delinsA, p.(Thr402fs) führt zu einem verkürzten Protein von 402 AS. Es wird angenommen, dass auch diese Mutation zu einem Stoppcodon-vermittelten Abbau der mRNA führt (Lindquist et al., 2017).

Die Variante c.1665_1821del157 führt zu einem 601 AS langen Protein mit einem deutlich verkürztem C-Terminus. Die Variante c.1665_1821del157 des Transkriptes TTBK2-208 konnte von Edener und Kollegen mit ähnlicher Häufigkeit bei Gesunden und Ataxie-Patienten nachgewiesen werden (Edener et al., 2009b).

Der Verlust des C-Terminus scheint im Pathomechanismus der SCA11 eine Rolle zu spielen. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob das verkürzte, 601 AS lange Protein in den neuronalen Strukturen der Ataxie-Patienten wie auch in gesunden Probanden nachweisbar ist. Eine Expression des 601 AS umfassenden Proteins, z. B. im

Cerebellum von SCA-Patienten, könnte auf eine pathogene Funktion des trunkierten Proteins hinweisen.

Bei der im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen Variante c.1799G>C im *TTBK2*-Gen kommt es zu einem Austausch von Serin zu Threonin an Stelle 600 des Proteins (p.Ser600Thr). Diese Änderung im Vergleich zum Wildtyp befindet sich ebenfalls im C-Terminus. Diese Variante führt zu keinem Frameshift, die Länge des Proteins bleibt unbeeinflusst. Auswirkungen, die Punktmutationen in diesem Bereich haben, sind derzeit noch nicht beschrieben. Auch wenn die Vorhersageprogramme der Proteinfunktion der Genome Browser die Variante als wahrscheinlich benigne einschätzen, wären Untersuchungen zu Auswirkungen von Punktmutationen im C-terminalen Bereich interessant.

5.6. Empfehlungen zur molekulargenetischen Testung

„Eine molekulargenetische Diagnostik ist medizinisch indiziert, wenn sich aus dem Ergebnis ein diagnostischer Zugewinn beziehungsweise Konsequenzen ergeben. Die möglichen Konsequenzen müssen mit dem Patienten (bei Minderjährigen mit dessen Eltern) vor der Untersuchung besprochen werden. In vielen Fällen kann der Nachweis einer pathogenen Mutation eine klinische Verdachtsdiagnose bestätigen oder bei der differenzialdiagnostischen Abgrenzung eines Phänotyps helfen (…).
Voraussetzung einer rationalen molekulargenetischen Diagnostik ist deshalb immer eine klare Fragestellung auf der Basis einer fundierten klinischen Verdachtsdiagnose.“ (Aretz et al., 2006)

Bei der Spinocerebellären Ataxie handelt es sich um eine autosomal dominant vererbte Erkrankung. Eine molekulargenetische Testung kann bei entsprechender Familienanamnese und typischer Symptomatik sinnvoll sein.
Bei klinischem Verdacht auf eine SCA ist es sinnvoll, zuerst die häufigen SCA-Subtypen zu testen. Die fünf häufigsten Subtypen sind die SCA1, SCA2, SCA3, SCA6 und SCA7. Sie gelten als ursächlich für 60% der identifizierten SCAs in den USA und für 64% der ADCA in den Niederlanden (Van De Warrenburg et al., 2002; Paulson, 2009). Diesen Subtypen liegen CAG-Repeat-Expansionen im codierenden Bereich der Gene zugrunde. Gleiches gilt für SCA17, die ebenfalls eingangs mituntersucht werden sollte. Repeat-Expansionen können einfach und kostengünstig nachgewiesen werden (Németh et al., 2013).
Im Sinne einer Stufendiagnostik sollte bei negativem Testergebnis auf das Vorliegen weiterer SCA-Subtypen getestet werden. Die klinische Symptomatik des Patienten kann

nur in seltenen Fällen einen Hinweis auf einen SCA-Subtyp geben. Da es sich bei der SCA um ein sehr variables Krankheitsbild handelt, sind klinische Symptome nicht pathognomonisch. Die mögliche Symptomatik der verschiedenen SCA-Subtypen wird unter 1.3.3 Subtypen der SCA, Tabelle 2: SCA-Subtypen und Symptome aufgeführt.
Eine SCA11-Testung sollte in einer Anschlusstestung (Panel-Diagnostik) anderer seltener SCA-Loci integriert werden.

Next-Generation-Sequencing (NGS) ist eine parallele Sequenzierungsmethode, die eine große Datenmenge mit erhöhter Genauigkeit, Geschwindigkeit und Durchsatz zu geringeren Kosten erzeugt. NGS ermöglicht es, Gentests mit drei Hauptansätzen durchzuführen: (a) Panel-Diagnostik, (b) Exomsequenzierung und (c) die Gesamtgenomsequenzierung (Galatolo et al., 2018).
Bei einer Panel-Diagnostik können mehrere Genorte untersucht werden, die für Differentialdiagnosen einer Krankheit in Frage kommen. Dies kann die Testung und Diagnosestellung eines SCA-Subtyps erleichtern (Sandford und Burmeister, 2014; Xue et al., 2015).
Erwachsene Ratsuchende, bei denen Familienangehörige an molekulargenetisch gesicherter SCA11 erkrankt sind, können sich einer prädiktiven Testung unterziehen. Etwa 95 % der an SCA11 erkrankten Patienten haben ein betroffenes Elternteil. Die Wahrscheinlichkeit an SCA11 zu erkrankt, wenn ein Elternteil betroffen ist, beträgt 50 % (Houlden et al., 2008, Last Update 2019).

„Jede Person hat nach dem Grundsatz der informationellen Selbstbestimmung das Recht, die eigene genetische Konstitution zu kennen, aber auch ein Recht auf Nichtwissen (Art. 1 GG in Verbindung mit Art. 2 GG)“ (Aretz et al., 2006).

Wichtig ist bei jeder molekulargenetischen Untersuchung zu respektieren, dass das Durchführen dieser eine individuelle Entscheidung ist und nur durchgeführt werden sollte, wenn der Ratsuchende diese nach sorgfältiger Aufklärung und Vorgesprächen wünscht. Sollte sich der Ratsuchende gegen eine Testung entscheiden, muss auch diese Entscheidung respektiert und befolgt werden.

Die an SCA11 erkrankten Patienten haben eine annähernd normale Lebenserwartung. Derzeit gibt es noch keine krankheitsspezifische Therapie, es werden aber verschiedene therapeutische Maßnahmen empfohlen. Dazu zählt Logopädie, um Dysarthrie und Schluckprobleme zu behandeln und um zu lernen, Aspirationen zu vermeiden sowie die

Artikulation zu verbessern. Weiterhin werden Ergotherapie, Physiotherapie und ophthalmologische Konsile empfohlen. Bei Patienten mit Neuropathie können Knöchel-Fuß-Orthesen hilfreich sein (Houlden et al., 2008, Last Update 2019; Jacobi et al., 2013).

5.7. Ausblick

5.7.1. SCA-Diagnostik

Bei der großen Gruppe der Spinocerebellären Ataxien handelt es sich um fortschreitende neurodegenerative Erkrankungen, charakterisiert durch Degeneration des Cerebellums, oft in Begleitung von degenerativen Veränderungen des Hirnstamms und weiterer Teile des ZNS (Paulson, 2009; Shakkottai und Fogel, 2013, Sullivan et al., 2019). Bei den SCAs handelt es sich um eine heterogene Gruppe von Erkrankungen mit einem komplexen Genotyp-Phänotyp-Spektrum. Zu den Kernsymptomen der SCAs zählen Gangataxie und -inkoordination, Nystagmus bzw. Sehstörungen und Dysarthrie. Weitere zusätzliche Symptome, wie z. B. Pyramidenbahnzeichen und kognitive Beeinträchtigung, sind möglich (Sullivan et al., 2019).

Bei einem ähnlichen Phänotyp der verschiedenen SCA-Subtypen können Mutationen in ganz unterschiedlichen Genen vorliegen, sodass die Diagnose letztendlich molekulargenetisch gestellt wird (Ashizawa et al., 2019).

Durch Fortschritte des NGS können weitere Einblicke in die molekularen Ursachen der SCAs gewonnen werden und die diagnostische Genauigkeit kann über die Sequenzierung von Exomen oder sogar Genomen verbessert werden. Dadurch kann der Erfolg der Molekulardiagnose bei Patienten gesteigert werden, bei denen derzeit kein Standard-Gentest durchgeführt wird (Sullivan et al., 2019).

Die Arbeitsgruppe um Galatoto hat in einer retrospektiven Analyse zur klinischen Anwendung von NGS bei SCAs festgestellt, dass die durchschnittliche Diagnoserate durch Panel-Diagnostik bei 17 % lag. Die geschätzte diagnostische Rate der Exom-Sequenzierung lag bei 36 % (Galatolo et al., 2018). Dies macht deutlich, dass die Diagnosestellung eines SCA-Subtyps trotz NGS weiterhin eine Herausforderung darstellt.

5.7.2. Therapie der SCAs

Bei den SCAs handelt es sich um ein schweres, unaufhaltsam progredientes Krankheitsbild. Aktuell gibt es für die SCAs keine kausalen Therapieoptionen, lediglich symptomatische, z. B. durch Medikamente, Physiotherapie, Ergotherapie oder Logopädie (Jacobi et al., 2013; Ashizawa et al., 2019). Diese symptomatische Therapie ist für die Patienten wichtig und wirksam. Von Ilg und Kollegen konnte eine signifikante Verbesserung der motorischen Leistung nach Training nachgewiesen und eine Reduktion der Ataxie-Symptome in klinischen Scores beobachtet werden. Dies Ergebnisse konnten durch Nachuntersuchungen bestätigt werden (Ilg et al., 2009).
Weiterhin konnte durch Daten aus SCA-Tiermodellen gezeigt werden, dass Prävention

und ein Verzögern des Krankheitsausbruchs einfacher ist, als das Verlangsamen, Stoppen oder Umkehren des Krankheitsprozesses (Sullivan et al., 2019).

Bei einem sehr ähnlichen klinischen Bild der verschiedenen SCA-Subtypen liegen diesen sehr unterschiedliche Pathomechanismen zugrunde. Diese Tatsache muss bei der Entwicklung kausaler Therapieoptionen mitbedacht werden.
Für SCAs, die durch Punktmutationen verursacht werden, wie auch die SCA11, werden aktuell Therapiestrategien diskutiert, die durch das Stummschalten von Genen, durch das Überspringen des mutierten Exons durch RNAi, durch antisense Oligonucleotid-(ASO) Technologie oder durch das Eingreifen in bestimmte downstream pathways funktionieren sollen. Bei vielen SCAs, die durch Punktmutationen verursacht werden, liegen Mutationen in Ionenkanälen oder Proteinen zugrunde, die an Signaltransduktionswegen beteiligt sind. Dabei könnten pharmakologische Modifikationen der dysfunktionalen Proteine oder Ionenkanäle zu einer nachhaltigen symptomatischen Verbesserung führen (Ashizawa et al., 2019).
Diese neu aufkommenden Therapien, wie ASOs, bieten Ärzten und SCA-Patienten die Hoffnung auf eine wirksame Behandlung in naher Zukunft (Sullivan et al., 2019).

5.7.3. Herausforderung der SCA11

Bei der SCA11 kommt es durch Degeneration der Purkinjezellen im Cerebellum zur Kleinhirnatrophie. Wie bei vielen anderen Ataxien auch, ist bei SCA11 der Zusammenhang der Mutationen im *TTBK2*-Gen und dem Krankheitsbild bisher wenig erforscht (Liao et al., 2015; Bowie et al., 2018).

Es sind weitere Studien und Untersuchungen nötig, die den Pathomechanismus erklären und die Funktion oder Dysfunktion der TTBK2 im Cerebellum darlegen. Die drei Mutationen, die als ursächlich für eine SCA11 gelten, wurden in Exon 12 und 13 des Transkriptes TTBK2-201 beschrieben. Experimente mit transgenen Modellen durch Implementierung der pathogenen Mutationen in Exon 11-13 könnten helfen, die Konsequenzen der reduzierten TTBK2-Spiegel im Tiermodell zu untersuchen (Bauer et al., 2010).

Bei den drei beschriebenen Mutationen fehlt der C-Terminus der TTBK2, der bei der Interaktion des Proteins mit seinen Substraten eine Rolle spielt. Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Bowie weisen darauf hin, dass eine verkürzte TTBK2 nicht dazu in der Lage ist, die Ciliogenese zu vermitteln, auch wenn die Kinasedomäne des Proteins intakt ist (Bowie et al., 2018).

6. Zusammenfassung

Die Spinocerebelläre Ataxie 11 (SCA11) ist eine seltene neurodegenerative Erkrankung, die autosomal dominant vererbt wird. Punktmutationen bzw. kleine Deletionen im *TTBK2*-Gen sind ursächlich für die Pathogenese. Das Krankheitsbild ist gekennzeichnet durch eine langsam progressive cerebelläre Ataxie, Sakkaden und Nystagmus sowie in manchen Fällen durch Pyramidenbahnzeichen, Dysarthrie und Schluckbeschwerden (Giunti et al., 2012; Houlden et al., 2008, Last Update 2019).

Das *TTBK2*-Gen codiert für die Tau-Tubulin Kinase 2, die eine Rolle in der Phosphorylierung von Proteinen spielt, eine essentielle Kinase in der Initiation der Ciliogenese ist und in Prozesse cerebellärer Entwicklung und der Zellmigration involviert ist (Bowie et al., 2018). Aktuell sind drei Frameshift-Mutationen des *TTBK2*-Gens bekannt, die mit SCA11 assoziiert werden. Diese sind in Exon 12 und 13 lokalisiert (c.1329dupA, c.1287_1288delAG, c.1306_1307delGA) und führen zu verkürzten Proteinen mit der Folge eines Funktionsverlustes. Die weltweite Prävalenz von SCA11 ist selten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 30 Ataxie-Patienten auf Varianten im *TTBK2*-Gen untersucht. Häufig vorkommende SCA-Typen wurden durch Testung vorab ausgeschlossen. Die 17 codierenden Exons des zweitlängsten Transkriptes, TTBK2-208, wurden sequenziert. Dabei konnten insgesamt sechs verschiedene Varianten nachgewiesen werden.

In Exon 11 wurde eine 157 Bp Deletion (c.1665_1821del157) bei drei der 30 Patienten festgestellt, die durch einen vorzeitigen Translationsstopp zu einem auf 601 AS verkürzten Protein führt (p.555Qfs*46). Diese Deletion wurde von der Arbeitsgruppe um Edener ebenfalls nachgewiesen und als vermutlich benigne Variante eingestuft (Edener et al., 2009b). Dennoch sind weitere Untersuchungen notwendig, die die Expression von TTBK2-208 in neuronalem Gewebe bei Trägern dieser Variante mit Gesunden vergleichen, um Aussagen über Pathogenität treffen zu können.

Die seltene, aber bekannte Variante c.1799G>C (p.Ser600Thr) in Exon 11 konnte bei einem Patienten festgestellt werden. Bei der Testung der klinisch gesunden Familie, Mutter und Bruder, konnte dieselbe heterozygote Variante bei der Mutter nachgewiesen werden. Zuvor wurde bei dem Patienten bereits eine weitere Variante unklarer Signifikanz am SCA13-Locus (*KCND3*-Gen) nachgewiesen (Ley, 2018). Ein synergistischer Effekt der beiden Varianten als mögliche Ursache der Ataxie des Patienten ist nicht auszuschließen und sollte weiter untersucht werden.

7. Summary

Spinocerebellar ataxia 11 (SCA11) constitutes a rare neurodegenerative disease, which is autosomal dominant inherited. Point mutations or small deletions in the *TTBK2*-gene cause its pathogenesis. The disease is characterized by slowly progressing cerebellar ataxia, saccades, nystagmus, and occasionally by pyramidal signs, dysarthria, and dysphagia (Giunti et al., 2012; Houlden et al., 2008, Last Update 2019).

The *TTBK2*-gene encodes for Tau-Tubulin Kinase 2, which is involved in protein phosphorylation. Additionally TTBK2 is an essential kinase to initiate ciliogenesis, and it is involved in processes of cerebellar development and cell migration (Bowie et al., 2018). Up to now, three frameshift mutations in *TTBK2* have been associated with SCA11. These are located in exon 12 and 13 (c.1329dupA, c.1287_1288delAG, c.1306_1307delGA) and lead to shortened proteins with a loss of function. The worldwide prevalence of SCA11 is rare.

In this study, we examined 30 ataxia patients for variants in *TTBK2*. The majority of common SCA subtypes had been excluded previously. The 17 coding exons of the second longest transcript, TTBK2-208, were sequenced. Consequently, six different variants were detected.

In exon 11, a 157 bp deletion (c.1665_1821del157) was detected in three of the 30 patients, resulting in a shortened protein of 601 amino acids (p.555Qfs*46). This deletion was also detected by Edener and colleagues and classified as a benign variant (Edener et al., 2009b). Nevertheless, further studies need to compare the expression of TTBK2-208 in neuronal tissue in carriers of this variant with the healthy so that statements about the variant´s pathogenicity can be made.

The known but rare variant c.1799G> C (p.Ser600Thr) in exon 11 was found in one patient. When testing the patient´s clinically healthy family, mother and brother, the same heterozygous variant was detected in the mother. Previously, another variant of unclear significance at the SCA13 locus (KCND3-gene) had already been detected in the same patient (Ley, 2018). A synergistic effect of these two variants as a possible of the patient´s ataxia cannot be excluded and should be further investigated.

8. Abkürzungsverzeichnis

8.1. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
A	Adenin
ADCA	autosomal dominante cerebelläre Ataxie
AOA	Ataxie mit okulomotorischer Apraxie
ARSACS	autosomal rezessive spastische Ataxie Typ Charlevoix-Saguenay
AS	Aminosäure
ASO	antisense Oligonucleotid
AT	Ataxie-Telangiektasie
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
cDNA	codierende DNA
CK	Casein-Kinase
cM	centimorgan
C/EBP	CAAT/ Enhancer-Binding-Protein
ddNTP	Didesoxynucleotide
DE	Deutschland
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotide
DRPLA	Dentatorubrale-Pallidoluysiale Atrophie
EA	Episodische Ataxien
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii
Exo	Exonuclease
F Primer	Vorwärts Primer
FRDA	Friedreich-Ataxie
G	Guanin
g	Gramm

ggf.	gegebenenfalls
H_2O	Wasser
HCl	Salzsäure
HGVS	Human Genome Variation Society
int	intern
IVS	Intervening sequence
l	Liter
mA	Milliampere
MAF	minor allele frequency
Mb	Megabase (1.000.000 Bp)
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
NCBI	National Center for Biotechnology Information, USA
NFT	Neurofibrilläre Bündel
OH	Hydroxyl
PCR	polymerase chain reaction; dt.: Polymerasekettenreation
pmol	Picomol
PNS	peripheren Nervensystems
R Primer	Rückwärts Primer
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
rs#	reference SNP cluster
s	Sekunden
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SCA	Spinocerebelläre Ataxie
SNP	single nucleotide polymorphism
SNV	single nucleotide variant
ss#	submitted SNP ID Nummer
T	Thymin
Taq	*Thermus aquaticus*
TBE	Tris-Borat-EDTA

Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TTBK	Tau-Tubulin Kinase
u. a.	unter anderem
UK	Vereinigtes Königreich
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UTR	untranslatierter Bereich
UV	ultraviolett
v. a.	vor allem
VRK	vaccinia-related Kinase
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
µl	Mikroliter

8.2. Buchstabencode Aminosäuren

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

9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

9.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: *TTBK2*-Gen und bekannte Transkriptvarianten

Abbildung 2: Darstellung der Domänen der Tau-Tubulin Kinase

Abbildung 3: Amplifikation einer bestimmten DNA-Sequenz mittels PCR

Abbildung 4: Analytisches Gel mit PCR-Produkten und Größenstandard pUC/DdeI

Abbildung 5: Ausschnitt eines exemplarischen Elektropherogramms der Sequenzierung des Exon 11 der DNA des Patienten 684

Abbildung 6: Ausschnitt der Sequenzanalyse des Exon 2 des *TTBK2*-Gens, c.-67G>A

Abbildung 7: Ausschnitt der Sequenzanalyse des Exon 2 des *TTBK2*-Gens, c.-37T>C

Abbildung 8: Ausschnitt der Sequenzanalyse des Exon 11 des *TTBK2*-Gens, c.1665_1821del157, vorderer Bruchpunkt

Abbildung 9: Ausschnitt der Sequenzanalyse des Exon 11 des *TTBK2*-Gens, c.1665_1821del157, hinterer Bruchpunkt

Abbildung 10: Ausschnitt der Sequenzanalyse des Exon 11 des *TTBK2*-Gens, c.1799G>C

Abbildung 11: Stammbaum der Familie 1119

Abbildung 12: Ausschnitt der Sequenzanalyse des Exon 11 des *TTBK2*-Gens, c.1799G>C

Abbildung 13: Ausschnitt der Sequenzanalyse des Intron 11-12 und Exon 12 des *TTBK2*-Gens, c.2019-52G>A

Abbildung 14: Ausschnitt der Sequenzanalyse des Exon 18 des *TTBK2*-Gens, c.4635A>G

9.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: SCA-Loci mit zugehöriger chromosomaler Lokalisation, Gen- und Proteinbezeichnung

Tabelle 2: SCA-Subtypen und Symptome

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien

Tabelle 4: Enzyme und Enzymgemische

Tabelle 5: Primer zur Amplifikation der Exons des *TTBK2*-Gens

Tabelle 6: Verwendete Kits

Tabelle 7: Geräte

Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien

Tabelle 9: Computerprogramme

Tabelle 10: Annealing-Temperaturen für die jeweiligen Exons

Tabelle 11: Genotyp-Frequenz rs16957250

Tabelle 12: Genotyp-Frequenz rs6493068

Tabelle 13: Genotyp-Frequenz rs16957168

Tabelle 14: Übersicht gefundener Varianten im *TTBK2*-Gen

10. Literaturverzeichnis

10.1. Publikationen

Abramowicz A, Gos M (2018) Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation. Journal of Applied Genetics. doi.org/10.1007/s13353-018-0444-7

Akbar U, Ashizawa P (2015) Ataxia. Neurologic clinics 33(1) 225-248

Auton A, Abecasis GR, et al (2015) A global reference for human genetic variation. Nature 526:68-74

Aretz S, Propping P, Nöthen MM (2006) Zertifizierte medizinische Fortbildung: Indikationen zur molekulargenetischen Diagnostik bei erblichen Krankheiten. Deutsches Ärzteblatt 103 (9) A-550/ B-473/ C-453

Ashizawa T, Öz G, Paulson HL (2019) Spinocerebellar ataxias: prospects and challenges for the development. Nat Rev Neurol 14(10): 590-605 doi:10.1038/s41582-018-0051-6.

Bauer P, Stevanin G, Beetz C, et al (2010) Spinocerebellar ataxia type 11 (SCA11) is an uncommon cause of dominant ataxia among French and German kindreds. Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry;81(11):1229–32.

Beaudin M, Klein CJ, Rouleau GA, Dupré N (2017) Systematic review of autosomal recessive ataxias and proposal for a classification. Cerebellum & Ataxias 4:1–12. doi: 10.1186/s40673-017-0061-y

Bird TD (1998, Last Revision 2019) Hereditary Ataxia Overview. GeneReviews [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2019.

Bouskila M, Esoof N, Gay L, Fang EH, Deak M, et al (2011) TTBK2 kinase substrate specificity and the impact of spinocerebellar-ataxia-causing mutations on expression, activity, localization and development. The Biochemical journal; 437(1):157–167. doi:10.1042/BJ20110276.

Bowie E, Norris R, Anderson K V., Goetz SC (2018) Spinocerebellar ataxia type 11-associated alleles of Ttbk2 dominantly interfere with ciliogenesis and cilium stability. PLoS Genet. 14

Deng Y, Fu J, Zhong Y, Zhang M, Qi X (2019) First finding of familial spinal cerebellar Ataxia11 in China: clinical, imaging and genetic features. Neurol Sci. doi.org/10.1007/s10072-019-04052-6

Edener U, Kurth I, Meiner A, et al (2009a) Missense exchanges in the TTBK2 gene

mutated in SCA11. J Neurol 256:1856–1859. doi: 10.1007/s00415-009-5209-0

Edener U, Kurth I, Meiner A, et al (2009b) Missense mutations in the SCA11 gene TTBK2. Medizinische Genetik 1. 131-132

Fredrick K, Ibba M (2010) How the sequence of a gene can tune its translation. Cell 141(2):227–229. doi: 10.1016/

Galatolo D, Tessa A, Filla A, Santorelli FM (2018) Clinical application of next generation sequencing in hereditary spinocerebellar ataxia: increasing the diagnostic yield and broadening the ataxia-spasticity spectrum. A retrospective analysis. Neurogenetics 19:1–8. doi: 10.1007/s10048-017-0532-6

Gey MH (2015) Instrumentelle Analytik und Bioanalytik 3. Auflage. Springer Verlag: 209- 211, 234- 235

Giunti P, Houlden H, Gardner-Thorpe C, et al (2012) Spinocerebellar ataxia type 11, Elsevier B.V. Handbook of Clinical Neurology, Vol. 103 (3rd series). Chapter 33, 521-534

Greenfield JG (1954) The Spino-cerebellar Degenerations. Oxford: Blackwell. Proc R Soc, 47(2):150-152

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 drew family of Walworth`. Brain 105:1-28

Heinrich PC, Müller M, Graeve L (2014) Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9., vollständig überarbeitete Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. S115, 561, 660-669

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

Hornig NC, De Beaufort C, Denzer F, et al (2016) A recurrent germline mutation in the 5'UTR of the androgen receptor causes complete androgen insensitivity by activating aberrant uORF translation. PLoS One 11:1–15. doi: 10.1371/journal.pone.0154158

Houlden H, Johnson J, Gardner-Thorpe C, et al (2007) Mutations in TTBK2, encoding a kinase implicated in tau phosphorylation, segregate with spinocerebellar ataxia type 11. Nat Genet 39:1434–1436. doi: 10.1038/ng.2007.43

Houlden H, Chen Z, Puzriakova A (2008, Last Update 2019) Spinocerebellar Ataxia 11. GeneReviews, Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2019.

Ikezu S, Ikezu T (2014) Tau-tubulin kinase. Front Mol Neurosci 7:1–10. doi: 10.3389/fnmol.2014.00033

Ilg W, Synofzik M, Brötz D, et al (2009) Intensive coordinative training improves motor performance in degenerative cerebellar disease. Neurology 73:1823–1830

Jacobi H, Minnerop M, Klockgether T (2013) Genetik der spinozerebellären Ataxien. Nervenarzt 84:137–142. doi: 10.1007/s00115-012-3637-z

Jansohn M, Rothhämel S (2012) Gentechnische Methoden, 5. Auflage. Spektrum-Verlag, Heidelberg. 589-617

Jayadev S, Bird TD (2013) Hereditary ataxias: Overview. Genet Med 15:673–683. doi: 10.1038/gim.2013.28

Karki R, Pandya D, Elston RC, Ferlini C (2015) Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics. BMC Med Genomics 8:1–7. doi: 10.1186/s12920-015-0115-z

Klockgether T (2008): The clinical diagnosis of autosomal dominant spinocerebellar ataxias. Cerebellum 7(2): 101-5.

Klockgether T (2010) Sporadic ataxia with adult onset: classification and diagnostic criteria. Lancet Neurol 9:94–104. doi: 10.1016/S1474-4422(09)70305-9

Klockgether T, Paulson H (2011) Milestones in Ataxia. Mov Disord 26:1134–1141. doi: 10.1002/mds.23559

Klockgether T (2012): Ataxien des Erwachsenenalters. In: Diener HD, Weimar C (2012): Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Herausgegeben von der Komission „Leitlinien“ der Deutschen Gesellschaft für Neurologie. Thieme Verlag, Stuttgart.

Le Ber I, Moreira MC, Rivaud-Péchoux S, et al (2003) Cerebellar ataxia with oculomotor apraxia type 1: Clinical and genetic studies. Brain 126:2761–2772. doi: 10.1093/brain/awg283

Leppek K, Das R, Barna M (2018) Functional 5′ UTR mRNA structures in eukaryotic translation regulation and how to find them. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 19:158–174

Ley LT (2018) Häufigkeit der Spinocerebellären Ataxie Typ 13 (SCA13) bei Ataxie-Patienten: Screening auf Mutationen im KCNC3-Gen unter besonderer Berücksichtigung des Exons 1. Inauguraldissertation aus dem Institut für Humangenetik unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. Dagmar Nolte, des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig- Universität Gießen

Liao J-C, Yang TT, Kuo C-T, et al (2015) TTBK2: A Tau Protein Kinase beyond Tau

Phosphorylation. Biomed Res. Int. 2015:1–10

Lindquist SG, Møller LB, Dali CI, et al (2017) A Novel TTBK2 De Novo Mutation in a Danish Family with Early-Onset Spinocerebellar Ataxia. Cerebellum 16:268–271. doi: 10.1007/s12311-016-0786-9

Lorenz TC (2012) Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. J Vis Exp. 63. e3998. doi: 10.3791/3998

Maston GA, Evans SK, Green MR (2006): Transcriptional regulatory elements in the human genome. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 7:29-59.

Matilla-Dueñas A. (2006): Molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxias. Brain 129 (6):1357–1370. doi:10.1093/brain/awl081

Nachbauer W, Eigentler A, Boesch S (2015) Acquired ataxias: the clinical spectrum, diagnosis and management. J Neurol 262:1385–1393. doi: 10.1007/s00415-015-7685-8

Németh AH, Kwasniewska AC, Lise S, et al (2013) Next generation sequencing for molecular diagnosis of neurological disorders using ataxias as a model. Brain 136:3106–3118. doi: 10.1093/brain/awt236

Nolte D, Müller U (2006) Punktmutationen und Deletionen bei spinozerebellären Ataxien. Neuroforum 4, 260-265

Palau F, Espinós C (2006) Uner Tan Syndrome. Orphanet J Rare Dis 1:47. doi: 10.1186/1750-1172-1-47

Paulson HL (2009) The Spinocerebellar Ataxias. J. Neuroophthalmol. 29(3):227-237. doi:10.1097/WNO0b013e3181b416de

Papadimitriou S, Gazzo A, Versbraegen N, et al (2019) Predicting disease-causing variant combinations. Proc Natl Acad Sci U S A 116:11878–11887. doi: 10.1073/pnas.1815601116

Pfeffer G, Blakely EL, Alston CL, et al (2012) Adult-onset spinocerebellar ataxia syndromes due to MTATP6 mutations. J Neurol Neurosurg Psychiatry 83:883–886. doi: 10.1136/jnnp-2012-302568

Plotkin JB, Kudla G (2011) Synonymous but not the same. Natl Rev Genet 12:32–42. doi: 10.1038/nrg2899.Synonymous

Ramji DP, Foka P (2002) CCAAT/enhancer-binding proteins: Structure, function and regulation. Biochem J 365:561–575. doi: 10.1042/BJ20020508

Richards S, Aziz N , Bale S, et al (2015) Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the

American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology Sue. Genet Med 17:405–424. doi: 10.1038/gim.2015.30.Standards

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, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, et al (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239: 487-491.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, et al (1985) Enzymatic amplification of β-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia. Science, New Series, Vol. 230, No 4732: 1350-1354.

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

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America; 74(12):5463–5467. doi:10.1073/pnas.74.12.5463

Schaaf J, Zschocke CP (2018) Basiswissen Humangenetik. 3., überarbeitete und erweiterte Auflage. Springer Medizin Verlag, Heidelberg. S 11-20, 50-55

Schöls L, Bauer P, Schmidt T, et al (2004) Autosomal dominant cerebellar ataxias: Clinical features, genetics, and pathogenesis. Lancet Neurology 3:291-304. doi: 10.1016/S1474-4422(04)00814-2

Scacheri C, Scacheri P (2015) Mutations in the non-coding genome. Curr Opin Pediatr. 27(6): 659-664. doi:10.1097/MOP. 0000000000000283.

Shakkottai VG, Fogel BL (2013) Autosomal Dominant Spinocerebellar Ataxia. Neurol Clin 31(4). doi:10.1016/j.ncl.2013.04.006

Sherry ST (2001) dbSNP: the NCBI database of genetic variation. Nucleic Acids Res 29:308–311. doi: 10.1093/nar/29.1.308

Storey E (2014) Genetic cerebellar ataxias. Semin Neurol 34:280–292. doi: 10.1055/s-0034-1386766

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

Sun YM, Lu C, Wu ZY (2016) Spinocerebellar ataxia: relationship between phenotype and genotype – a review. Clin Genet 90:305–314. doi: 10.1111/cge.12808

Van De Warrenburg BPC, Sinke RJ, Verschuuren-Bemelmans CC, et al (2002)

Spinocerebellar ataxias in the Netherlands: Prevalence and age at onset variance analysis. Neurology 58:702–708. doi: 10.1212/WNL.58.5.702

Worth PF, Giunti P, Gardner-Thorpe C, Dixon PH (1999) Autosomal Dominant Cerebellar Ataxia Type III: Linkage in a Large British Family to a 7.6-cM Region on Chromosome 15q14-21.4. Am. J. Hum. Genet. 65:420-426

Xu Q, Li X, Wang J, et al (2010) Spinocerebellar ataxia type 11 in the Chinese Han population. Neurol Sci 31:107–109. doi: 10.1007/s10072-009-0129-4

Xue Y, Ankala A, Wilcox WR, Hegde MR (2015) Solving the molecular diagnostic testing conundrum for Mendelian disorders in the era of next-generation sequencing: Single-gene, gene panel, or exome/genome sequencing. Genet Med 17:444–451. doi: 10.1038/gim.2014.122

10.2. **Internetseiten** (zuletzt geprüft am 27.12.2019)

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1138/

https://www.omim.org/

http://varnomen.hgvs.org/bg-material/glossary/

http://www.sequenceontology.org/browser/current_release/term/SO:0001483

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1757/

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000128881;r=15:42738734-42920809;t=ENST00000622375

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000128881;r=15:42744352-42920809;t=ENST00000622375

https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Exons?db=core;g=ENSG00000128881;r=15:42738734-42920809;t=ENST00000622375

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/

http://www.ensembl.org/index.html

http://varnomen.hgvs.org/

https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Education_AboutRareDiseases.php?lng=EN

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000128881;r=15:42738734-42920809;t=ENST00000622375

https://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=9606

https://www.proteinatlas.org/ENSG00000128881-TTBK2/tissue#gene_information

https://www.uniprot.org/uniprot/Q8IWY7

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Mappings?db=core;r=15:42800686-42801686;v=rs550845568;vdb=variation;vf=454895952#ENST00000622375_454895952_G_tablePanel

11. Kongressbeiträge

Wesentliche Teile der Arbeit wurden 2019 als Poster auf dem Science Day in Gießen präsentiert:

Ortmann LJ, Stanek S, Nolte D (2019) Identification of a likely pathogenic variant in *TTBK2* associated with ataxia

12. Erklärung zur Dissertation

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

_____ _____

Ort, Datum Unterschrift

13. Danksagung

Ich möchte mich bei Herren Prof. Dr. med. Ulrich Müller für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit bedanken sowie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Materialien.

Einen besonders großen Dank möchte ich an Frau Prof. Dr. rer. nat. Dagmar Nolte für die Vergabe des Themas, die hervorragende Betreuung und Unterstützung sowie für die hilfreichen Kommentare und Anmerkungen zu dieser Arbeit aussprechen. Nicht nur fachlich durfte ich viel von Ihnen lernen, auch die freundliche und menschliche Art, die stets im 6. OG der Humangenetik anzutreffen war, werde ich positiv in Erinnerung halten.

Bei den Mitarbeiterinnen des humangenetischen Labors, Frau Sylvia Stank und Frau Pia Winter, möchte ich mich für die Einarbeitung sowie die vielen Tipps und Ratschläge bedanken.

Bei meiner Familie und meinen guten Freunden möchte ich mich für das Interesse, die Unterstützung und Anmerkungen zu dieser Arbeit bedanken. Ein großer Dank geht an die geduldigen KorrekturleserInnen.

14. Lebenslauf

Der Inhalt wurde aus Datenschutzgründen gelöscht