

Mutationssuche im *ELOVL5*-Gen bei Ataxie-Patienten

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

vorgelegt von Eva Helene Reith
aus Gießen

Gießen 2017

Aus dem Institut für Humangenetik
Direktor: Prof. Dr. med. Ulrich Müller
der Justus-Liebig-Universität Gießen

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

Gutachter: Prof. Dr. Andreas Bräuninger

Tag der Disputation: 26.02.2018

Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Einführung in die Thematik.....	1
1.2	Ataxien.....	2
1.2.1	Sporadische Ataxien.....	2
1.2.1.1	Symptomatische Ataxien.....	2
1.2.1.2	Idiopathische Ataxien.....	3
1.2.2	Hereditäre Ataxien.....	3
1.2.2.1	Autosomal-rezessive Ataxien.....	4
1.2.2.2	X-chromosomale Ataxien.....	6
1.2.2.3	Mitochondriale Ataxien.....	7
1.2.2.4	Autosomal-dominante Ataxien.....	7
1.2.3	Spinocerebelläre Ataxien.....	8
1.2.3.1	Klinik der spinocerebellären Ataxien.....	8
1.2.3.2	Genetik der spinocerebellären Ataxien.....	10
1.2.4	Spinocerebelläre Ataxie Typ 38.....	14
1.2.4.1	Genetik der SCA 38.....	14
1.2.4.2	Bekannte SCA 38 auslösende Mutationen.....	15
1.2.4.3	Pathogenese der SCA 38.....	16
1.2.4.4	Klinische Merkmale der SCA 38.....	17
1.2.4.5	Untersuchungen zur Häufigkeit der SCA 38.....	18
1.3	Fragestellung.....	19
2	Material und Methoden.....	20
2.1	Material.....	20
2.2	DNA-Proben.....	24
2.3	Methoden.....	25
2.3.1	DNA-Extraktion aus Blut.....	25
2.3.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	26
2.3.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	28
2.3.4	Reinigung der PCR-Produkte.....	30
2.3.4.1	Reinigung mit dem <i>Straight-PCR-OLS Kit</i>	30
2.3.4.2	Reinigung mit Exo SAP.....	30
2.3.5	Sequenzierung.....	31
2.3.6	Auswertung der Sequenzdaten.....	33

3 Ergebnisse.....	34
3.1 Sequenzanalyse des <i>ELOVL5</i> -Gens	34
3.1.1 Exon 1	34
3.1.2 Exon 2	34
3.1.3 Exon 3	36
3.1.4 Exon 4	36
3.1.5 Exon 5	40
3.1.6 Exon 6	41
3.1.7 Exon 7	41
3.1.8 Exon 8	42
3.1.9 Exon 9	43
3.2 Übersichtstabelle der gefundenen Sequenzvarianten	47
3.3 Epikrise der Patientin 1017	48
4 Diskussion	50
4.1 Häufigkeit der SCA 38	50
4.2 Genetik der SCA 38	51
4.2.1 Bekannte Mutationen des <i>ELOVL5</i> -Gens	51
4.2.2 Neu identifizierte <i>ELOVL5</i> -Varianten in nicht-codierenden Genregionen	52
4.2.3 <i>ELOVL5</i> -Variante in der codierenden Sequenz, Patientin 1017	53
4.3 Pathophysiologie	54
4.4 Genotyp-Phänotyp-Beobachtungen	55
4.5 Empfehlung zur molekulargenetischen Testung	56
4.6 Ausblick	58
4.6.1 SCA-Diagnostik	58
4.6.2 SCA-Therapie	58
5 Zusammenfassung	61
5.1 Zusammenfassung	61
5.2 Summary	62
6 Abkürzungsverzeichnis	63
6.1 Buchstabencode für Aminosäuren	66
6.2 IUPAC Nomenklatur für Basen	67
7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	68
7.1 Abbildungsverzeichnis	68
7.2 Tabellenverzeichnis	70
8 Literaturverzeichnis	71
8.1 Publikationen	71

8.2 Internetseiten (zuletzt geprüft am 20.06.2017)	77
9 Anlage	78
9.1 Erklärung zur Dissertation	78
9.2 Danksagung.....	79

1 Einleitung

1.1 Einführung in die Thematik

Das Wort Ataxie kommt aus dem Griechischen und bedeutet *Unordnung*. In der Medizin beschreibt es eine Störung der Koordination von Bewegungsabläufen. Dazu gehören Störungen der Okulomotorik sowie Dysarthrie, Dysdiadochokinese, Intensionstremor und insbesondere Stand-, Gang- und Rumpfataxie (Pschyrembel und Arnold 2014).

Ataxien können verschiedene Ursachen haben, die in Kapitel 1.2 weiter differenziert werden. Beispielsweise sind cerebelläre Ataxien eine Gruppe neurologischer Erkrankungen mit Ataxie als Leitsymptom. Die Ataxie beruht hier auf einer Beeinträchtigung des Kleinhirns. Zusätzlich können andere Strukturen wie z.B. der Hirnstamm beteiligt sein. Dann spricht man von einer spinocerebellären Ataxie (SCA) (Manto und Marmolino 2009).

Bis heute sind mindestens 38 verschiedene Subtypen der spinocerebellären Ataxien bekannt. Diese zeichnen sich durch ein klinisch ähnliches Spektrum an Symptomen aus, haben jedoch verschiedene genetische Ursachen. Die Identifikation des ersten Genlocus (SCA1) gelang Yakura et al. im Jahr 1974. Die in dieser Arbeit thematisierte, 2014 erstmals beschriebene SCA 38 wird durch Mutationen im *ELOVL5*-Gen verursacht. Es codiert für eine Elongase, die an der Synthese von langkettigen Fettsäuren beteiligt ist (Di Gregorio et al. 2014).

1.2 Ataxien

Zusammengenommen haben Ataxien eine geschätzte Prävalenz von 15-20 / 100.000 (Berlit 2014; Smeets und Verbeek 2014).

Die klinischen Symptome der hereditären Ataxien beinhalten eine schlechte Bewegungskoordination und einen breitbasigen, unsicheren Gang. Häufig kommen auch eine schlechte Koordination der Extremitäten und der Sprache (Dysarthrie) sowie Augenbewegungsstörungen hinzu (Bird 2016).

Ursache sind Funktionsstörungen des Kleinhirns, seiner afferenten und efferenten Bahnsysteme und des Spinalkanals. Sie werden in sporadische und hereditäre Formen eingeteilt (Hacke 2016).¹

1.2.1 Sporadische Ataxien

Die sporadischen Ataxien werden weiter eingeteilt in symptomatische und idiopathische Ataxien.

1.2.1.1 Symptomatische Ataxien

Zu den symptomatischen Ataxien gehören alle Formen mit bekannter Ursache. Diese Ursachen können Intoxikationen (Alkoholabusus, Medikamente u.a. chemische Noxen), Hypothyreose, Vitamin E- und B12-Mangel, fokale Insulte oder Tumore der hinteren Schädelgrube, physikalische Ursachen (Hitzeschlag, Sepsis), immunvermittelte Erkrankungen (Multiple Sklerose, Miller-Fischer-Syndrom, paraneoplastische Kleinhirndegeneration oder gluteninduzierte Ataxie), infektiöse Erkrankungen (VZV, EBV) oder Prionenerkrankungen wie die Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung sein. Die häufigste Form einer toxisch induzierten Ataxie ist die alkoholinduzierte Kleinhirndegeneration. Auch eine lange Bettlägerigkeit oder psychogene Ursachen können zu ataktischen Bewegungsstörungen führen (Hufschmidt et al. 2009; Mattle und Mumenthaler 2011).

Die paraneoplastische cerebelläre Degeneration ist eine immunologisch vermittelte Degeneration des cerebellären Kortex. Sie steht im Zusammenhang mit einer extracerebellären Tumorerkrankung wie zum Beispiel einem kleinzelligen

¹ Als Grundlage für den folgenden Abschnitt über Ataxien diente das Kapitel 25 (S.626-641) aus: „Neurologie“ von Hacke (2016), wenn andere Literatur verwendet wurde, ist diese gesondert zitiert.

Bronchialkarzinom, einem Ovarial- oder Mammakarzinom oder auch einem Lymphom. Bei Verdacht auf eine paraneoplastische Genese sollte nach antineuronalen Antikörpern gesucht werden. Beim kleinzelligen Bronchialkarzinom werden häufig anti-Hu-Antikörper, bei den gynäkologischen Tumoren anti-Yo-Antikörper (Purkinjzell-Antikörper) und beim M. Hodgkin anti-Tr-Antikörper gefunden. Das Fehlen der Antikörper schließt ein paraneoplastisches Geschehen jedoch nicht aus. Histologisch ist ein Verlust der Purkinjzellen mit sekundärer Degeneration der unteren Olive zu sehen (Berlit 2014).

Die Möglichkeit einer symptomatischen Ataxieform sollte bei allen Patienten bedacht werden, da in diesem Fall eine spezifische Therapie in Frage kommen könnte (Bird 2016).

1.2.1.2 Idiopathische Ataxien

Erst nach Ausschluss der symptomatischen, als auch der später zu besprechenden hereditären Ataxien, sollte von einer idiopathischen Ataxie gesprochen werden. Ein Teil der idiopathischen Ataxien beruht sehr wahrscheinlich auf bisher noch unbekanntem genetischen Ursachen.

Zu den idiopathischen Ataxien gehört auch die cerebelläre Verlaufsform der Multisystematrophie (MSA-C). Sie beginnt meist um das 55. Lebensjahr. Bei der MSA-C dominiert die cerebelläre Symptomatik, bei der MSA-P steht eine Parkinsonsymptomatik im Vordergrund (Manto und Marmolino 2009).

1.2.2 Hereditäre Ataxien

Den hereditären Ataxien liegt ursächlich eine Veränderung auf DNA-Ebene zugrunde. Die Begriffe Sequenzvariante und SNP (single nucleotide polymorphism) werden in dieser Arbeit neutral für Veränderungen gegenüber der Wildtypsequenz verwendet. Nur wenn diese Veränderungen sehr selten und krankheitsverursachend sind, werden sie als Mutation bezeichnet (Hacke 2016).

Für Sequenzvarianten bzw. Mutationen können verschiedene Genveränderungen verantwortlich sein. Bei der SCA 38 spielen nach derzeitigem Kenntnisstand nur Punktmutationen eine Rolle. Diese betreffen ein einzelnes Nukleotid d.h. es kommt zu einer Basensubstitution oder auch Deletion oder Insertion einzelner Nukleotide. Basenaustausche, z.B. an der dritten Position eines Codons, müssen keine Konsequenz für die AS-Abfolge haben und werden daher als stille Mutationen bezeichnet. Missense-Mutationen sind spezielle Punktmutationen, in deren Folge im

Protein eine Aminosäure durch eine andere Aminosäure ersetzt wird. Zu diesem Mutationstyp gehören die beiden bisher bekannten SCA 38 verursachenden Genmutationen. Nonsense-Mutationen hingegen wandeln ein aminosäurecodierendes Triplet in der mRNA zu einem Stoppcodon um, das zum Abbruch der Translation führt. Außerdem gibt es Mutationen, die zu einer verstärkten oder neuen Funktion des Gens führen. Dieses Phänomen wird als „*gain-of-function*“ bezeichnet (Buselmaier 2007; Schaaf und Zschocke 2013).

Die Gruppe der hereditären Ataxien wird nach dem Vererbungsmodus eingeteilt in autosomal-rezessiv, X-chromosomal und mitochondrial vererbte Ataxien sowie autosomal-dominant vererbte Formen. Um die verschiedenen Formen zu differenzieren bedarf es einer genauen Anamnese (inklusive Familienanamnese), einer körperlichen und neurologischen Untersuchung auf typische klinische Symptome, einer Bildgebung neurologischer Strukturen sowie einer molekulargenetischen Testung (Bird 2016).

1.2.2.1 Autosomal-rezessive Ataxien

Bei den autosomal-rezessiven cerebellären Ataxien (ARCA) sind beide Allele von der krankheitsauslösenden Mutation betroffen. Eine Besonderheit, die darin begründet sein dürfte, ist der frühe Erkrankungsbeginn meist vor dem 20. Lebensjahr.

Mit einer Häufigkeit von 1 / 20.000 – 1 / 125.000 ist die **Friedreich-Ataxie** (FA) die häufigste Form der autosomal-rezessiven Ataxien. Genetisch liegt dieser Erkrankung zu 95 % eine homozygote GAA-Repeat-Expansion im ersten Intron des für Frataxin codierenden *FXN*-Gens auf Chromosom 9q13 zugrunde. Die restlichen 5 % beruhen auf einer Compound-Heterozygotie mit einer GAA-Repeat-Expansion auf dem einen Allel und einer Punktmutation auf dem anderen.

Innerhalb betroffener Familien kann die Länge der GAA-Expansion zunehmen und zu einem früheren und schwereren Krankheitsverlauf führen. Viele Trinukleotid-Expansions-Erkrankungen zeigen dieses Phänomen der Antizipation (Berlit 2014).

Leitsymptom der Friedreich-Ataxie ist eine progrediente Stand- und Gangataxie mit fehlenden Beineigenreflexen und ein Verlust der Hinterstrangsensibilität. Auch eine Dysarthrie sowie eine okuläre Beteiligung sind häufig. Außerdem kann ein Diabetes mellitus oder auch eine kardiale Beteiligung auftreten. Deformitäten des Bewegungsapparates, wie eine Skoliose oder den typischen „Friedreich-Fuß“, können bei mehr als der Hälfte der Patienten beobachtet werden (s. Abb. 1.1).



Abbildung 1.1: Originalfotographie eines Friedreich-Fußes, aufgenommen 1903 in Heidelberg (Hacke 2016)

Die Hohlfüße entstehen durch eine Muskelatrophie, beruhend auf der axonalen Neuropathie (Bender et al. 2015; Bird 2016).

Die Erkrankung beginnt in den Hinterwurzelganglien, geht auf die Hinterstränge, den spinocerebellären Trakt und die Pyramidenbahn über, und betrifft meist auch den cerebellären Kortex, den Nucleus dentatus und die Pedunculi cerebellares superiores. Pathophysiologisch spielt Frataxin eine wichtige Rolle im mitochondrialen Eisenstoffwechsel. Bei der FA kommt es zu Eisenablagerungen in den Mitochondrien, mit Beeinträchtigung der Atmungskette, vermehrtem oxidativem Stress und einer reduzierten ATP-Produktion. Die Diagnose wird molekulargenetisch gestellt und ist gesichert, wenn eine GAA-Expansion >66 vorliegt.

Differentialdiagnostisch ist auch eine **Vitamin-E-Mangel-Ataxie** in Betracht zu ziehen. Sie wird ebenfalls autosomal-rezessiv vererbt und durch eine Mutation im Alpha-Tocopherol-Transferprotein (TTPA; 8q13) ausgelöst, das an den Mechanismen des intrazellulären Vitamin-E-Transportes beteiligt ist. Die klinischen Zeichen sind sehr ähnlich zu denen der Friedreich-Ataxie. Kardiomyopathie und Diabetes mellitus kommen jedoch deutlich seltener vor (Manto und Marmolino 2009; Lamprakis et al. 2015; Bonello und Ray 2016).

Eine andere autosomal-rezessiv vererbte Ataxieform ist die **cerebrotendinöse Xanthomatose**, der eine Mutation des Sterol-27-Hydroxylase-Gens zugrunde liegt. Dies führt zu Ablagerungen von Cholesterol und Cholestanol unter anderem im Nervensystem. Daraus ergibt sich das klinische Bild, bestehend aus einer progredienten Ataxie, Pyramidenbahnzeichen, einer Polyneuropathie, kognitiven Defiziten, einer bilateralen Katarakt, Sehnenxanthomatose, chronischen Durchfällen und einer Tachylalie. Im Serum finden sich erhöhte Cholestanol-Werte. Der Erkrankungsbeginn liegt selten vor der 2.-3. Lebensdekade.

Bei den autosomal-rezessiv vererbten **Ataxien mit okulomotorischer Apraxie (AOA)** sind die betroffenen Patienten nicht fähig ihre Augenbewegungen zu koordinieren. Zu der Gruppe gehören die AOA1 (*APTX*-Gen), die AOA2 (*SETX*-Gen) und die AOA3 (*PIK3R5*-Gen). Zu den Symptomen gehören zudem Gehstörungen bedingt durch muskuläre Schwäche, Beeinträchtigungen der Koordination und eine sensomotorische axonale Polyneuropathie (Rudenskaia et al. 2012). Okulomotorische Apraxie ist auch typisch für das Louis-Bar-Syndrom (Ataxia teleangiectatica).

Die ebenfalls autosomal-rezessiv vererbte **Ataxia teleangiectatica (syn: Louis-Bar-Syndrom)** manifestiert sich bereits im Kindesalter. Die genetische Ursache ist eine Punktmutation im *ATM*-Gen, welches an der DNA-Reparatur beteiligt ist (Manto und Marmolino 2009). Sie führt zu einem Purkinje- und Körnerzellschwund im Kleinhirn. Klinisch zeigt sich eine cerebelläre Ataxie bereits im Kleinkindesalter (1.-3. Lebensjahr) beginnend mit verzögertem Gehenlernen. Außerdem kommt es zu choreatischen Störungen, einer leichten Polyneuropathie (9.-10. Lebensjahr), einer Blickapraxie und einer Verzögerung der geistigen Entwicklung. Bereits im 9.-10. Lebensjahr kann eine Demenz auftreten. Weiterhin sind Teleangiektasien an Konjunktiven und Körperbeugen ab dem 3.-5. Lebensjahr typisch. Mit dem Louis-Bar-Syndrom sind eine erhöhte Neoplasieanfälligkeit, vor allem Lymphome und Leukämien, sowie Immunschwäche mit Infektanfälligkeit assoziiert. Die Patienten versterben meist vor dem 20. Lebensjahr (Hufschmidt et al. 2009).

1.2.2.2 X-chromosomale Ataxien

Das **Fragile-X-Tremor-Ataxie-Syndrom (FXTAS)** ist die häufigste Form der X-chromosomal vererbten Ataxien. In der männlichen Bevölkerung liegt die Erkrankungshäufigkeit bei $1/3.000 - 1/8.000$. Typisch für diese langsam progrediente Ataxieform ist ein später Erkrankungsbeginn nach dem 55. Lebensjahr. Wie der Name impliziert, sind die Leitsymptome beim FXTAS Ataxie und Intentionstremor in Kombination mit orthostatischer Dysregulation und Polyneuropathie.

Das FXTAS wird durch Prämutationen im *FMR1*-Gen ausgelöst. Vollmutationen mit über 200 CGG-Repeats führen hingegen zum **Fragilen-X-Syndrom (FXS)**. Beim FXTAS liegt die Anzahl der CGG-Expansionen zwischen 55 und 200 CGGs.

Eine weitere X-chromosomal vererbte Ataxieform ist die **X-chromosomale sideroblastische Anämie und Ataxie** (X-linked sideroblastic anemia and ataxia XLSA-A). Sie ist charakterisiert durch eine früh einsetzende und nur langsam

progressive Ataxie, Dysmetrie und Dysdiadochokinese. Außerdem kann eine leichte Lernschwäche beobachtet werden. Die Anämie verläuft mild und asymptomatisch. Wegen des X-chromosomal-rezessiven Erbgangs zeigen weibliche Konduktorinnen eine normale neurologische Entwicklung. Die auslösende Mutation liegt im *ABC7*-Gen, das für ein Protein codiert, welches in den mitochondrialen Eisenstoffwechsel involviert ist. Da bei der Friedreich-Ataxie ebenfalls eine mitochondriale Eisenspeicherung auftritt, scheint zwischen diesen beiden Erkrankungen eine noch unbekanntes Gemeinsamkeit in der Pathogenese vorzuliegen (Jayadev und Bird 2013).

1.2.2.3 Mitochondriale Ataxien

Mitochondriale Ataxien gehören zu einer Gruppe von Erkrankungen mit Störungen des mitochondrialen Energiestoffwechsels, insbesondere der oxidativen Phosphorylierung. Die Atmungskette ist abhängig von zwei genetischen Systemen: der Kern- und der Mitochondrien-DNA. Mitochondriale Erkrankungen sind häufig mit begleitenden klinischen Symptomen wie Krämpfen, Schwäche, Diabetes mellitus, Kardiomyopathie oder Retinopathie assoziiert. Die wichtigsten mitochondrialen Erkrankungen, die mit cerebellären Defiziten einhergehen, sind: das **Kearns-Sayre-Syndrom**, **MELAS** (mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like-episodes), **MERRF** (myoklonus epilepsy with ragged-red fibres), das **May-White-Syndrom**, **MNGIE** (mitochondrial neurogastrointestinal encephalopathy), **NARP** (neuropathy, ataxia and retinitis pigmentosa) und das **Leigh-Syndrom** (Manto und Marmolino 2009; Jayadev und Bird 2013; Bird 2016).

1.2.2.4 Autosomal-dominante Ataxien

Bevor die molekulargenetischen Ursachen der autosomal-dominanten cerebellären Ataxien (ADCA) entdeckt wurden, verwendete man andere Bezeichnungen wie Marie's Ataxie, erbliche olivo-ponto-cerebelläre Atrophie, cerebro-oliväre Atrophie oder spinocerebelläre Degeneration (Bird 2016).

Zu den ADCAs gehören die **spinocerebellären Ataxien** (SCA), die in einem eigenen Kapitel ausführlicher besprochen werden, als auch die **episodischen Ataxien** (EA).

Die episodischen Ataxien sind charakterisiert durch anfallsartig auftretende Attacken oder Episoden von Gang-, Stand- und Extremitäten-Ataxie. Hinzukommen können andere neurologische Symptome wie Myokymie, Migräne, Krämpfe oder Chorea. Es gibt verschiedene Unterformen, die durch unterschiedliche Ionenkanaldefekte verursacht werden (Hufschmidt et al. 2009; Hersheson et al. 2012).

Die häufigsten Formen sind die EA 1 und EA 2. Bei der EA 1 betrifft die Mutation einen spannungsabhängigen Kaliumkanal, das *KCNA1*-Gen ist verändert. Bei der EA 2 ist das *CACNA1A*-Gen, das für eine Calciumkanal-Untereinheit codiert, von der Mutation betroffen. In dem gleichen Gen liegt die Mutation bei der SCA 6 und der familiären hemiplegischen Migräne Typ 1. Dass verschiedene Mutationen im gleichen Gen unterschiedliche klinische Syndrome verursachen können, wird als allelische Heterogenität bezeichnet (Paulson 2009; Klockgether und Paulson 2011; Hersheson et al. 2012).

Die Ataxie-Episoden bei den episodischen Ataxien können Sekunden, bis hin zu einigen Tagen anhalten. Meist werden sie durch verschiedene Auslöser wie z.B. Anstrengung oder Stress getriggert (Bender et al. 2015).

1.2.3 Spinocerebelläre Ataxien

Auch die spinocerebellären Ataxien (SCA) gehören zur Gruppe der autosomal-dominant vererbten Heredoataxien. Sie beruhen auf einer Degeneration des Kleinhirns. Neben der Kleinhirnatrophie liegt meist auch eine Atrophie des Hirnstammes vor. Zusätzlich können Veränderungen des peripheren Nervensystems, der Basalganglien, sowie des Kortex vorkommen.

Die fortschreitende Identifikation von mittlerweile mindestens 38 SCA-Subtypen und einem Teil ihrer verursachenden Mutationen verdeutlicht die hohe Komplexität der veränderten molekularen Strukturen und der involvierten Stoffwechselwege (Matilla-Dueñas 2012).

1.2.3.1 Klinik der spinocerebellären Ataxien

Die Häufigkeit der spinocerebellären Ataxien liegt bei 5-7 / 100.000. Die Prävalenz der verschiedenen Subtypen variiert von Region zu Region aufgrund des Gründereffektes. Die Erkrankung beginnt meist zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr, es gibt aber auch Subtypen, bei denen ein Krankheitsbeginn in der Kindheit oder nach dem 60. Lebensjahr vorkommt. Meist liefert bereits die Familienanamnese Hinweise auf den autosomal-dominanten Erbgang. Die Klinik beinhaltet unterschiedlich stark ausgeprägte Gang-, Stand- und Extremitätenataxie sowie Dysarthrie. Eventuell kommen andere neurologische Symptome wie Tremor, Dystonie, Chorea, Myoklonus, Nystagmus oder auch Hirnnervenstörungen hinzu. Ebenso sind eine Demenz, Epilepsie oder Polyneuropathie mögliche Verlaufsformen. Außerdem kann es zu Störungen der Kognition kommen. Erstes Symptom ist in der Regel die Gang- oder Standunsicherheit. Die mittlere Lebenserwartung liegt bei ca. 55 Jahren, mit einem

Krankheitsverlauf über 21-25 Jahre. Die Prognose ist jedoch abhängig vom SCA-Subtyp sehr unterschiedlich und variiert zwischen normaler Lebenserwartung und einem fulminanten Krankheitsverlauf (Nolte und Müller 2006; Matilla-Dueñas 2006; Gleixner et al. 2009; Shakkottai und Fogel 2013; Di Gregorio et al. 2014; Bird 2016).

Bei der körperlich-neurologischen Untersuchung von Ataxie-Patienten werden die Kleinhirnfunktionen durch Untersuchung von Augenbewegungsstörungen, Nystagmusprüfung, Dysarthrie-Testung, Untersuchung auf Dysmetrie im Finger-Nase-Versuch bzw. Hacke-Schienbein-Versuch sowie Dysdiadochokinese getestet. Des Weiteren sollten Störungen des Vestibularorgans überprüft werden. Beispielsweise ein spontaner Nystagmus, Veränderungen der Sensorik, wie eine reduzierte Propriozeption, ein reduziertes Vibrationsempfinden oder ein pathologischer Romberg-Test. Außerdem kann eine Beeinträchtigung der Koordination der Muskelaktivität auffallen (Shakkottai und Fogel 2013).

Es wurden verschiedene Skalen entwickelt, um die Schwere der Ataxie sowie nicht-ataktischer Symptome zu messen und ihren natürlichen Verlauf zu definieren. Die am weitesten verbreitete ist die „Scale for the Assessment and Rating of Ataxie“ (SARA). Sie wird verwendet, um die Schwere der Ataxie anzugeben. Dies geschieht durch eine Zuordnung von Punkten von 0-40, wobei 0 für die Abwesenheit einer Ataxie steht und 40 den höchsten Schweregrad einer Ataxie beschreibt. Die Punktwerte werden über 8 Testitems ermittelt: Gang (0-8 Punkte), Stand (0-6 Punkte), Sitzen (0-4 Punkte), Sprachstörungen (0-6 Punkte), Finger-Folgen (0-4 Punkte), Nase-Finger-Test (0-4 Punkte), schnell wechselnde Handbewegungen (0-4 Punkte) und Hacke-Schienbein-Test (0-4 Punkte). Dadurch können zusätzlich neurologische Beurteilungsmethoden und der Erfolg therapeutischer Interventionen überprüft werden (Schmitz-Hubsch et al. 2006; Kim et al. 2011; Matilla-Dueñas 2012).

Eine Einteilung beruhend auf der klinischen Symptomatik ist die Klassifikation nach Harding von 1982. Sie teilte die ADCAs folgendermaßen ein:

- ADCAs mit Ophthalmoplegie, Optikusatrophie, Demenz, extrapyramidalen Störungen und Muskelatrophie
- ADCAs mit pigmentierter Retinopathie, Ophthalmoplegie und extrapyramidalen Störungen
- ADCAs mit reinem cerebellärem Syndrom (ohne okuläre oder extrapyramidale Störungen und ohne Demenz mit einem späten Krankheitsbeginn \geq 60 Jahre)
- ADCAs mit Myoklonien und Taubheit (Harding 1982)

Das klinische Bild lässt jedoch keine eindeutige Zuordnung der ursächlichen Mutation zu. Es gibt allerdings einige typische Symptome, die hinweisend sein können. Dazu gehören beispielsweise Ophthalmoplegie bei der SCA 1, 2 und 3, langsame Sakkaden und verminderte Reflexe bei der SCA 2, Parkinson-Symptome bei der SCA 2 und 3, und Spastiken bei der SCA 3. Eine periphere Neuropathie ist häufig bei der SCA 1, 2, 3, 4, 8, 18 und 25 zu beobachten. Für die SCA 6 ist eine reine cerebelläre Symptomatik typisch. Eine Retinopathie und langsame Sakkaden kommen bei der SCA 7 vor, eine skandierende Dysarthrie bei der SCA 8, Krämpfe bei SCA 10 und SCA 17, Handtremor bei der SCA 12 und SCA 17, mentale Retardierung bei der SCA 13 oder choreatische Dyskinesien und kognitive Beeinträchtigung bei der SCA 17. Bei der SCA 20 können Dysphonie und Kalkeinlagerungen in den Zähnen vorkommen. Typisch für die SCA 36 sind Motoneuronerkrankungen. Myoklonische Epilepsien und Demenz sprechen für eine DRPLA (Manto und Marmolino 2009; Matilla-Dueñas 2012; Kim und Cho 2015; Hacke 2016).

Außerdem berücksichtigt werden sollten ethnische und geographische Herkunft, da einige SCAs in spezifischen Populationen häufiger vorkommen wie zum Beispiel die SCA 3 in Brasilien und Portugal, die SCA 2 in Korea oder die DRPLA in Japan. Weltweit gesehen ist die SCA 3 am häufigsten und umfasst zusammen mit der SCA 1, 2, 6 und 7 50 % aller dominant-vererbten Ataxien. Bei den Formen mit spätem Symptombeginn nach dem 50. Lebensjahr sind die SCA 6 und das fragile X Tremor-Ataxie-Syndrom häufig (Shakkottai und Fogel 2013).

1.2.3.2 Genetik der spinocerebellären Ataxien

Aus den eben genannten Gründen ist die genetische Testung die wichtigste Methode für eine eindeutige Diagnostik. In Europa sind die am häufigsten vorkommenden Formen die SCA 1, 2, 3 und 6. Nachdem 1974 von Yakura et al. der erste Genlocus (SCA 1) identifiziert wurde, schlug Roger Rosenberg 1990 eine Klassifikation basierend auf dem Genotyp vor, die inzwischen auf die 38 bekannten SCA-Subtypen (zusammengestellt in Tab. 1.1) angewendet wird (Gleixner et al. 2009; Liang et al. 2016).

Die Genprodukte der betroffenen Gene haben unterschiedliche Funktionen. Zum Beispiel sind sie an der glutamatergen Signalübertragung, verschiedenen Ionenkanälen, der Tau-Regulation, mitochondrialen Funktionen und der RNA-Alteration beteiligt (Gleixner et al. 2009; Liang et al. 2016; Hacke 2016).

Die ADCAs können auch grob nach ihrem Mutationsmechanismus eingeteilt werden. Es gibt drei Gruppen: Die erste Kategorie beinhaltet die SCAs, die durch CAG-Repeat-Expansionsen in codierenden Genbereichen verursacht werden. Die SCAs der zweiten Kategorie werden durch Trinukleotid-Expansionsen in nicht-codierenden Genabschnitten ausgelöst. Die dritte Kategorie fasst alle SCAs zusammen, die durch spezifische Mutationen (Deletionen, Insertionen, Frameshift-Mutationen, Missense-Mutationen und Nonsense-Mutationen) bedingt sind (Whaley et al. 2011).

Die am häufigsten vorkommenden SCAs werden durch instabile CAG-Repeat-Expansionsen ausgelöst. Der als „normal“ bzw. „expandiert“ definierte Bereich variiert von Gen zu Gen (Riess et al. 2001).

SCA 1, 2, 3, 6, 7, 17 und DRPLA gehören zu dieser Gruppe. Die CAG-Expansion führt zu Polyglutamin im Genprodukt. Die Polyglutaminexpansion führt zu einer Anhäufung fehlgefalteter Proteine in den Neuronen, was wiederum den Zelltod zur Folge hat. Dies bezeichnet man als einen „(toxic) gain of function“ (Storey 2014).

Je länger die CAG-Expansion, desto früher beginnt die Erkrankung und der Verlauf ist schwerwiegender. Die Antizipation, die bereits bei der Friedreich-Ataxie unter 1.2.2.1 erwähnt wurde, findet innerhalb der Generationen aufgrund einer Längenzunahme der instabilen Repeats statt (Matilla-Dueñas 2006).

Wie die Schwere der Erkrankung mit der Länge der Trinukleotidexpansionsen zusammenhängt, kann man am Beispiel der SCA 3 sehen. Während normale SCA 3-Allele 12-44 CAG-Codons umfassen, zeigen Repeatexpansionsen zwischen 60 und 87 CAGs eine vollständige Penetranz. Die juvenile SCA 3 (Type I disease) betrifft etwa 13% der SCA 3 Patienten und ist durch einen Krankheitsbeginn in der Kindheit mit ausgeprägter Spastik, Rigor, Bradykinesie und oft geringgradiger Ataxie charakterisiert. Diese Form der Erkrankung ist mit längeren Repeatexpansionsen, in der Regel mehr als 77 CAG-Codons, assoziiert. Kurze Expansionsen im Bereich von 45 bis 60 CAG-Codons gehen mit einer reduzierten Penetranz, oder einem milden klinischen Erscheinungsbild einher, das nicht mit dem klassischen Krankheitsbild (>60 CAG-Codons) gleichzusetzen ist. Moderate CAG-Expansionsen führen häufig erst im Erwachsenenalter zu einer Ataxie mit peripherer Polyneuropathie (Lu et al. 2004; Costa Mdo und Paulson 2012; Paulson 2015; Gan et al. 2015).

Bei der SCA 8, 10, 12, 31 und 36 liegen die expandierten Bereiche außerhalb codierender Regionen (Introns) und werden deshalb bei der Proteinsynthese nicht translatiert. Als Krankheitsursache wird von einem „toxic gain of function“ auf RNA-

Ebene ausgegangen, der eine reduzierte Proteinbiosynthese zur Folge hat (Storey 2014; Hacke 2016).

Bei selteneren SCA-Formen sind Punktmutationen wie Missense-Mutationen, Frameshift-Mutationen sowie Deletionen oder Insertionen als Ursache bekannt. Die mutierten Gene dieser SCAs, zu denen auch die SCA 38 gehört, gehören nicht alle zu einem Stoffwechselweg. Das deutet darauf hin, dass eine Kleinhirn- und Hirnstammdegeneration durch Störungen in verschiedenen zellulären Wegen ausgelöst werden kann. Daher wird vor allem diese Kategorie der SCAs in den nächsten Jahren weiter wachsen (Paulson 2009). Die Pathophysiologie beruht hier auf einem „gain of novel function“, einer Haploinsuffizienz oder in der Unter- oder Übertranslation des relevanten Proteinproduktes (Storey 2014).

Für einige SCAs sind die krankheitsverursachenden Mutationen bisher nicht bekannt.

Benannt werden die spinocerebellären Ataxien in der Reihenfolge der Entdeckung des Genlocus, also nicht nach einem in der Sache begründeten systematischen Aspekt. Eine Auswirkung davon ist, dass die häufig vorkommenden Ataxien, die zuerst entdeckt wurden, am Anfang stehen. Daher verteilen sich über die Hälfte der ADCAs auf die SCA 1, 2, 3, 6, und 7 (Storey 2014; Kim und Cho 2015).

In der folgenden Tabelle 1.1 sind alle bisher bekannten SCA-Typen mit dem mutierten Gen bzw. Protein und dem Mutationsmechanismus zusammengefasst.

Tabelle 1.1: Genetik der spinocerebellären Ataxien

SCA-Subtyp	Gen	Lokalisation	Protein	Mutationsmechanismus
SCA 1	<i>ATXN1</i>	6p23	Ataxin-1	CAG-Expansion
SCA 2	<i>ATXN2</i>	12q24.1	Ataxin-2	CAG-Expansion
SCA 3 Machado-Joseph disease (MJD)	<i>ATXN3</i>	14q21	Ataxin-3 (MJD1)	CAG-Expansion
SCA 4	<i>SCA4</i>	16q22.1		unbekannt
SCA 5	<i>SPTBN2</i>	11q13	β-III-Spektrin	Punktmutation, inframe Deletion
SCA 6	<i>CACNA1A</i>	19p13	α 1A P/Q Calciumkanal Untereinheit	CAG-Expansion
SCA 7	<i>ATXN7</i>	3p21.1-p12	Ataxin-7	CAG-Expansion
SCA 8	<i>ATXN8/ATXN8OS</i>	13q21		CTG-Expansion, untranslatiert
SCA 9	nicht vergeben			
SCA 10	<i>ATXN10</i>	22q13.31	Ataxin-10	ATTCT-Expansion, untranslatiert
SCA 11	<i>TTBK2</i>	15q15.2	Tau-Tubulin-Kinase-2	Punktmutation, Frameshift-Mutation
SCA 12	<i>PPP2R2B</i>	5q32	Protein Phosphatase 2A	CAG-Expansion,

				untranslatiert
SCA 13	<i>KCNC3</i>	19q13.33	Spannungsabhängiger Kaliumkanal KCNC3	Punktmutation
SCA 14	<i>PRKCG</i>	19q13.4	Proteinkinase C γ	Punktmutation, inframe Deletion
SCA 15	<i>ITPR1</i>	3p26.1	Inositol 1,4,5-triphosphate Rezeptor 1	Punktmutation, Deletion
SCA 16	<i>ITPR1</i>	3p26.1	s. SCA 15	Punktmutation, Deletion
SCA 17	<i>TBP</i>	6q27	TATA Bindepotein	CAA/CAG-Expansion
SCA 18	unbekannt	7q22-q32		unbekannt
SCA 19	<i>KCND3</i>	1p21-q21	Spannungsabhängiger Kaliumkanal Kv4.3	Punktmutation, Deletion
SCA 20	unbekannt	11q12.2-11q12.3		260kB-Duplikation
SCA 21	<i>TMEM240</i>	1p36.33-p36.32		Punktmutation
SCA 22	<i>KCND3</i>	1p21-q21	s. SCA19	Punktmutation, Deletion
SCA 23	<i>PDYN</i>	20p13	Prodynorphin	Punktmutation, Deletion
SCA 24	nicht vergeben			
SCA 25	<i>SCA 25</i>	2p21-p13		unbekannt
SCA 26	<i>EEF2</i>	19p13.3		Punktmutation
SCA 27	<i>FGF14</i>	13q34	Fibroblasten Wachstumsfaktor 14	Punktmutation, Frameshift-Mutation
SCA 28	<i>AFG3L2</i>	18p11	katalytische Untereinheit der mitochondrialen AAA Protease	Punktmutation
SCA 29	<i>ITPR1</i>	3p26		unbekannt
SCA 30	unbekannt	4q34.3-q35.1		unbekannt
SCA 31	<i>BEAN1</i>	16q21		TGGAA-Expansion
SCA 32	unbekannt	7q32-q33		unbekannt
SCA 33	nicht vergeben			
SCA 34	<i>ELOVL4</i>	6p12.3-q16.2	Fettsäureelongase 4	Punktmutation
SCA 35	<i>TGM6</i>	20p13	Transglutaminase 6	Punktmutation
SCA 36	<i>NOP56</i>	20p13		GGCCTG-Expansion
SCA 37	unbekannt	1p32		unbekannt
SCA 38	<i>ELOVL5</i>	6p	Fettsäureelongase 5	Punktmutation
SCA 40	<i>CCDC88C</i>			
SCA 42	<i>CACNA1G</i>		CaV3.1	Punktmutation
DRPLA (dentatorubral pallidoluysian atrophy)	<i>ATN1</i>	12p13.31.30	Atrophin 1	polyQ-Expansion
ADCADN	<i>DNMT1</i>	19p13.2	DNA-Methyltransferase 1	Punktmutation
Hypomyelinating leukoencephalopathy	<i>TUBB4A</i>	19p13.3	Tubulin beta 4A	Punktmutation
GRID2-related spinocerebellar ataxia	<i>GRID2</i>			

Modifiziert nach (Hersheson et al. 2012), (Kim und Cho 2015), (Harenberg 2015) und (Bird 2015, 2016).

1.2.4 Spinocerebelläre Ataxie Typ 38

1.2.4.1 Genetik der SCA 38

Die spinocerebelläre Ataxie Typ 38 (SCA 38) wurde erstmals 2014 an einer italienischen Familie beschrieben. Sie wird durch Mutationen im *ELOVL5*-Gen verursacht, das für eine Elongase codiert, die an der Synthese von mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit einer Kettenlänge von über 20 Kohlenstoffatomen beteiligt ist. Das *ELOVL5*-Gen ist auf Chromosom 6 lokalisiert. Der Genlocus wurde der chromosomalen Region 6p12.1 zugeordnet (Di Gregorio et al. 2014).

„*Elongation of very long chain fatty acids protein 5*“, abgekürzt *ELOVL5*, ist eins von 7 Genen (*ELOVL1-7*), die für Elongasen codieren. *ELOVL1-7* verlängern dabei verschiedene Substrate. *ELOVL1* wurde 1996 erstmals entdeckt. Sein Genprodukt elongiert Fettsäuren, vorrangig C_{14:0} zu C_{16:0}. *ELOVL2* und 3 wurden später entdeckt. *ELOVL2* beispielsweise verlängert gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäuren bis zu einer Länge von 24 Kohlenstoffatomen, während *ELOVL3* essentiell für die Konversion von C_{24:0} zu C_{26:0} ist. *ELOVL4* und 6 tragen ebenfalls zur Produktion von gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren bei. Nur *ELOVL7* kann wie *ELOVL5* auch mehrfach ungesättigte Fettsäuren elongieren. Dabei hat *ELOVL7* eine hohe Affinität zu Fettsäuren mit einer Länge von 18 oder 20 Kohlenstoffatomen, während *ELOVL5* an der Produktion von Fettsäuren mit mehr als 20 Kohlenstoffatomen beteiligt ist (Leonard et al. 2000; <http://www.genecards.org>).

Die ELO-Familie ist durch drei Strukturen charakterisiert. Eine N-terminale Region mit zwei Transmembrandomänen, ein zentraler hydrophiler Loop und eine C-terminale Region, die 1-3 Transmembranregionen beinhaltet (<http://www.ebi.ac.uk>).

Das *ELOVL5*-Gen besteht aus 9 Exons, 8 davon sind codierend, und umfasst insgesamt einen Bereich von 81.781 bp. Es sind sieben unterschiedlich lange Transkripte bekannt, die durch alternatives Spleißen entstehen, vier davon sind proteincodierend. Die verschiedenen Transkriptvarianten sind in der unten stehenden Abbildung 1.2 zu sehen.



Abbildung 1.2: Die verschiedenen Transkriptvarianten des *ELOVL5*-Gens (<http://www.ensembl.org>)

Es ist bisher nicht bekannt in welchen Geweben, welche Transkriptvarianten vorkommen. Das längste Transkript umfasst 3081 bp und codiert für ein Protein von 326 Aminosäuren. Die anderen bekannten Proteinprodukte sind mit 262 (ELOVL5-207), 299 (ELOVL5-201) und 88 (ELOVL5-202) AS kürzer. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das längste Transkript (ENST00000370918.8 bzw. ELOVL5-203, Ensembl release 89, Mai 2017) untersucht.

In Abbildung 1.3 ist dargestellt, welche Exone für die Transmembrandomänen von ELOVL5 codieren und in welchen Bereichen SNPs und Varianten bereits bekannt sind.

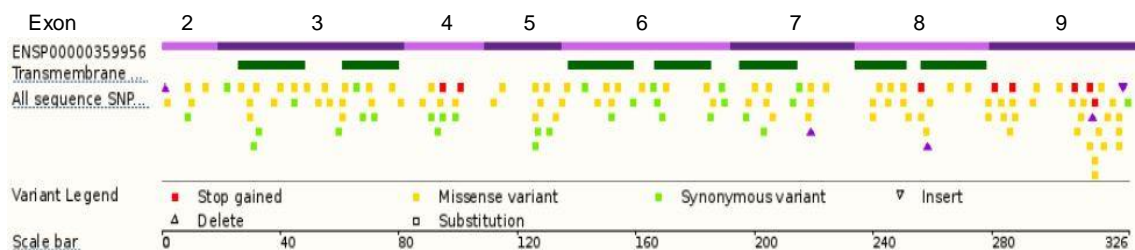


Abbildung 1.3: *ELOVL5*-Gen (<http://www.ensembl.org>)

1.2.4.2 Bekannte SCA 38 auslösende Mutationen

Di Gregorio et al. untersuchten zunächst das gesamte Genom einer von SCA betroffenen italienischen Familie. Dabei fanden sie eine Variante (c.689G>T;p.Gly230Val) in Exon 7 des *ELOVL5*-Gens. Hierdurch kommt es zu einem Austausch von Glycin durch Valin an Position 230 des Proteinproduktes. Auch bei zwei weiteren italienischen und einem französischen SCA-Patienten wurden Mutationen im *ELOVL5*-Gen gefunden. Bei dem französischen Ataxie-Patient zeigte sich eine andere Variante (c.214C>G;p.Leu72Val) in Exon 3, bei der es zu einem Aminosäureaustausch an Position 72 kommt. In diesem Fall wird Leucin durch Valin ersetzt.

1.2.4.3 Pathogenese der SCA 38

ELOVL5 katalysiert den ersten geschwindigkeitsbegrenzenden Schritt der vier Schritte, die den Elongationszyklus für langkettige Fettsäuren bilden. Dieser an das endoplasmatische Retikulum (ER) gebundene enzymatische Prozess ermöglicht die zyklische Addition von je zwei Kohlenstoffatomen zu der Kette von langen und sehr langkettigen Fettsäuren. Das Enzym verlängert vor allem mehrfach ungesättigte Acyl-CoA, aber auch einfach ungesättigte und mehrfach ungesättigte VLCFAs verschiedener Kettenlänge. Sie sind in verschiedene biologische Prozesse involviert und dienen beispielsweise als Vorläufer von Membranlipiden und Lipid-Mediatoren (<http://www.uniprot.org>).

Wie in der nebenstehenden Abbildung 1.4 zu sehen ist, kommt *ELOVL5*-mRNA in verschiedenen humanen Geweben vor, ist aber in Gehirn und Lunge besonders stark exprimiert.

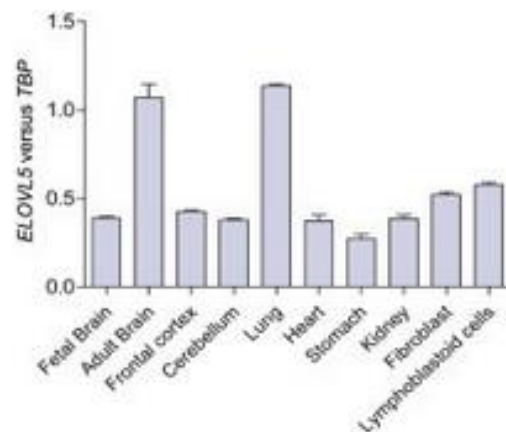


Abbildung 1.4: mRNA-Expression des *ELOVL5*-Gens in verschiedenen Geweben (Di Gregorio et al. 2014)

Immunhistochemisch wurde an Kontrollmäusen und menschlichem Hirngewebe eine hohe Konzentration an Arachidonsäure und Docosahexaensäure (DHA), den Stoffwechsel-Endprodukten von ELOVL5, in Purkinjezellen nachgewiesen. Mutationen in *ELOVL5* führen zu einem reduzierten Vorkommen an Arachidonsäure und DHA im Kleinhirn und bedingen durch eine reduzierte Fettsäure-Synthese die SCA 38 typische Pathophysiologie. Diese Annahme wird durch die Ergebnisse von Di Gregorio et al. unterstützt. Im Serum der untersuchten, betroffenen Patienten war die Konzentration beider Fettsäuren vermindert (Di Gregorio et al. 2014).

Das ZNS ist das Gewebe mit dem höchsten Fettgehalt. Docosahexaensäure ist die Hauptkomponente von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids PUFAs) in Retina und Hirngewebe (Leonard et al. 2000; Di Gregorio et al. 2014). Es hat sich gezeigt, dass ein verminderter DHA-Spiegel mit kognitiven Defiziten und dem Beginn von Alzheimer bei Erwachsenen assoziiert ist. Bei einer Vielzahl anderer neurologischer Erkrankungen, wie z.B. der erblichen spastischen Paraplegie, zeigt sich ebenfalls ein veränderter Lipidstoffwechsel. Dies verdeutlicht die Wichtigkeit der

Fettsäurehomöostase für das menschliche Hirngewebe (Leonard et al. 2000; Di Gregorio et al. 2014).

Normalerweise befindet sich die Elongase innerhalb der Zelle vorwiegend im ER. Diese Lokalisation ist plausibel, da die Synthese von langkettigen Fettsäuren dort stattfindet. Bei den von Di Gregorio et al. identifizierten Mutationen war sie jedoch eher im Golgi-Apparat lokalisiert. Der Golgi-Apparat spielt eine zentrale Rolle in sekretorischen Stoffwechselwegen und beim Proteintransport. So dient er als Qualitätskontrollsystem und sollte fehlgefaltete Proteine zurück zum ER senden. Möglicherweise entziehen sich die fehlgefalteten ELOVL5-Enzyme der Kontrolle durch das ER und akkumulieren im Golgi-Apparat. Folglich kommt es dort zu einer Aggregation der durch die Mutation fehlgefalteten Proteine (Ohno et al. 2010; Di Gregorio et al. 2014).

Für die Kausalität zwischen Mutationen in *ELOVL5* und Erkrankung spricht ebenfalls, dass jeweils hoch konservierte Aminosäuren betroffen sind. Zudem sprechen bioinformatische Berechnungen für diesen Zusammenhang (Di Gregorio et al. 2014).

1.2.4.4 Klinische Merkmale der SCA 38

Das klinische Bild der SCA 38 ist charakterisiert durch eine langsam progrediente Gangataxie begleitet von einem Nystagmus sowie durch einen eher späten Krankheitsbeginn im Erwachsenenalter. Wie viele der SCAs, denen eine konventionelle Mutation zugrunde liegt, zeigt sie phänotypisch eine reine Form der cerebellären Ataxie und eine langsamere Progression als Polyglutamin-Ataxien. In der Untersuchung von Di Gregorio et al. hatten alle betroffenen Patienten vergleichbare klinische Symptome. Anfänglich standen die stammbetonte Ataxie und Gangstörungen im Vordergrund, die sich etwa ab dem 40. Lebensjahr zeigten. Weitere Symptome waren ein Augenöffnungs-Nystagmus, Dysarthrie sowie Extremitätenataxie. Ebenfalls vorgekommen sind Diplopie sowie leichte bis mittelschwere axonale Neuropathie und leichte sensorische Störungen. Die Symptome waren sehr langsam progredient. Im Krankheitsverlauf war es den betroffenen Patienten bis ins Alter von 50 Jahren möglich zu gehen, später benötigten sie eine Gehhilfe.

In der strukturellen Bildgebung des Gehirns (MRI) zeigte sich eine Kleinhirnatrophie ohne Beteiligung des Hirnstamms. In den leichteren Krankheitsstadien war das MRI normal, aber FDG-PET Scans zeigten einen Hypometabolismus des Kleinhirns (Di Gregorio et al. 2014).

Anknüpfend an die Ergebnisse von Di Gregorio et al. (2014) veröffentlichen Borroni et al. (2016) in einem aktuellen Artikel die Untersuchungsergebnisse einer Studie mit 21 an SCA 38 erkrankten Patienten der 3 italienischen Familien mit der *ELOVL5*-Variante c.689G>T (p.Gly230Val).

Die Krankheit begann in der vierten Lebensdekade ohne Anzeichen für Antizipation oder geschlechtsspezifische Unterschiede. Die Betroffenen zeigten alle einen ähnlichen Phänotyp mit einer reinen Form der cerebellären Ataxie. Die Symptome waren Nystagmus (100 %) und eine langsam fortschreitende Gangataxie (95 %). Häufig waren außerdem Hohlfüße (82 %) und ein verminderter Geruchssinn (76 %). Diese beiden Symptome könnten für die Diagnosestellung besonders hilfreich sein, da Hohlfüße bisher für keine andere SCA beschrieben wurden und olfaktorische Defizite nur bei SCA 2, 3 und 7 bekannt sind. Seltener Symptome waren der Verlust des Gehörsinns und Angststörungen, die jeweils in 33 % der Fälle auftraten. Im weiteren Verlauf der Erkrankung kam es zu Kleinhirnsymptomen wie Extremitätenataxie, Dysarthrie, Dysphagie und Ophthalmoparesen gefolgt von Ophthalmoplegie in den späteren Stadien. Die Beteiligung des peripheren Nervensystems mit Verlust der Sensibilität trat in der letzten Krankheitsphase auf. Demenz, Epilepsie oder extrapyramidalmotorische Störungen sind nicht mit der SCA 38 assoziiert. Insgesamt ist die SCA 38, wie die meisten der SCAs, denen eine konventionelle Mutation zugrunde liegt, eine langsam fortschreitende Erkrankung mit einem eher milden Phänotyp. Signifikante Einschränkungen im Hinblick auf die Aktivitäten des täglichen Lebens traten erst 20 Jahre nach Krankheitsbeginn auf.

Die cerebrale Bildgebung zeigte eine milde Atrophie des Vermis, jedoch nicht des cerebralen Kortex, der weißen Substanz und des Hirnstamms (Borroni et al. 2016).

1.2.4.5 Untersuchungen zur Häufigkeit der SCA 38

Die Forschergruppe um Di Gregorio kam zu dem Schluss, dass SCA 38 eine eher seltene Form der autosomal dominant vererbten Ataxien ist. Unter europäischen Patienten schätzten sie die Häufigkeit auf unter 1 % (Di Gregorio et al. 2014).

Um die Häufigkeit der SCA 38 bei chinesischen Ataxie-Patienten einzuschätzen, haben Lui et al. die codierende Sequenz des *ELOVL5*-Gens von 346 SCA-Patienten untersucht. Sie fanden keine krankheitsassoziierte Mutation, was vermuten lässt, dass der Subtyp SCA 38 in China sehr selten ist (Liu et al. 2015).

1.3 Fragestellung

Die in dieser Arbeit dargestellte Untersuchung bezieht sich auf die Ergebnisse von Di Gregorio et al. und Lui et al. - und zwar im Hinblick darauf, dass die Häufigkeit der SCA 38 unter deutschen Ataxie-Patienten bisher noch nicht untersucht wurde und bisher auch nur zwei Mutationen bekannt sind. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit 48 vorselektionierte Ataxie-Patienten deutscher Herkunft auf Mutationen im *ELOVL5*-Gen untersucht. Ziel war es, sowohl nähere Informationen über die Häufigkeit der SCA 38 zu erhalten, als auch neue Varianten zu finden. Dies soll bei der Beurteilung helfen, ob eine genetische Testung auf diese Erkrankung, bei Patienten mit Ataxie-Symptomatik mit bisher ungeklärter Ursache, sinnvoll sein könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Tabelle 2.1: Geräte und Verbrauchsartikel

Gerät/ Verbrauchsartikel	Typ	Hersteller
Analysenwaage	Lab Style 5001	Mettler-Toledo, Ohio, USA
Eiszubereiter		Manitowoc
Elektrophorese-Kämme		Keutz, Reiskirchen
Elektrophorese-Kammer	Horizon 58	Life Technologies, Carlsbad, USA
Elutionsplatten	96 Well Multiply-PCR Plate	Sarstedt
	96 Well Cell Culture Cluster	Corning Incorporated
Eppendorf-Gefäße (Safe Lock Tubes)	0,5 ml und 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Filterplatten	Multi Screen Filter Plates	Millipore
	Unifilter 96 Wells, 800 µl	Whatman
Gelschlitten		Keutz, Reiskirchen
Heizblock	DRI-Block DB 3	Keutz, Reiskirchen
Mikrotiterplatten und Deckel	MultiScreen Filter Plates MAHVN4510	Merck, Darmstadt
Mikrowellenherd		LG
Multiply-µStripPro 8er Kette	0,2 ml	Sarstedt
Multiwell-Streifen		Eppendorf, Hamburg
Pipetten	100 µl, 200 µl, 1000 µl	Gilson, Middleton, USA
	0,5-10 µl	Eppendorf
Pipettenspitzen	ep TIPS (weiß, gelb, blau)	Eppendorf
Sequenziergerät	ABI-Sequencer 3130xl	Applied Biosystems
Spannungsquelle		Biometra, Göttingen
Thermocycler	PTC 200	Biozym Diagnostik GmbH, MJ Research
	TProfessional Basic	Biometra GmbH
UV-Illuminator	Macro Vue UV-25	Hoefer, Holliston, USA
Vortex	Reax 2000	Heidolph, Schwabach
Wasserbad		GFL, Burgwedel
Zentrifugen	Biofuge pico	Heraeus, Hanau
	Multifuge 3 L –R	Heraeus, Hanau

Tabelle 2.2: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Betain	Sigma – Aldrich, St. Louis, USA
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma – Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol 96%	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid 250 µl/ml	Sigma – Aldrich, St. Louis, USA
Formamid	Applied Biosystems, Warrington, UK
Genagarose L.E.	Inno-Train, Kronberg
Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 100 mM	Promega Madison, USA
10x PCR Puffer für Taq-Polymerase	Qiagen, Hilden
5x Puffer (Sequenzierpuffer)	Applied Biosystems
Sephadex G –50 Superfine	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Sucrose	Sigma –Aldrich, St. Louis, USA
Tris-HCl	Sigma –Aldrich, St. Louis, USA
Trisma-Base	Sigma –Aldrich, St. Louis, USA
Xylencyanol	Serva, Heidelberg

Tabelle 2.3: Puffer und Lösungen

Puffer / Lösung	Bestandteile / Herstellung
10x TBE (Tris-Borat-EDTA-Puffer)	270 g Tris 137,5 g Borsäure 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 H ₂ O ad 2500 ml pH auf 8,2 –8,4 einstellen
1x TBE (Tris-Borat-EDTA-Puffer)	200 ml 10xTBE 1800 ml H ₂ O
10x Ladepuffer für Elektrophorese	40 g Sucrose 10 ml 10xTBE 0,25 g Bromphenolblau 0,25 g Xylene Cyanol TBE ad 100 ml

Nukleotidmix	380 µl 10 mM Tris-HCl 5 µl dATP (100 mM) 5 µl dCTP (100 mM) 5 µl dGTP (100 mM) 5 µl dTTP (100 mM)
pUC/Dde I Größenstandard	890 bp, 540 bp, 426 bp, 409 bp, 240 bp, 166 bp (Auf den verwendeten Agarosegelen werden DNA-Fragmente mit 409 bp und 426 bp nicht vollständig aufgetrennt und sind somit als Doppelbande zu sehen.)

Tabelle 2.4: Enzyme

Enzym	Hersteller
Dde I	New England Biolabs, Ipswich, USA
Exo-SAP	USB/ Affymetrix, Cleveland, USA
Taq-Polymerase (5 units/µl)	Qiagen, Hilden

Tabelle 2.5: Kits

Kit	Hersteller
Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Austin, USA
QiAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden
Straight-PCR OLS Kit	OMNI Life Science, East Taunton, USA

Tabelle 2.6: Oligonukleotid-Primer

Oligonukleotid-Primer		Die Primer wurden von der Firma Sigma synthetisiert.
Exon 2	Ex2F	5'-ACCTAAGGAACTGAACTTAACC-3'
	Ex2R	5'-AGACTTCTCCAAATTCCTTG-3'
Exon 3	Ex3F	5'-GGAATTAAGAACATGAATACCAGG-3'
	Ex3R	5'-TGCTTGCCCAGTTGTCTCTAC-3'
Exon 4	Ex4F	5'-TTGTTAGAGTGTTACAGGTGGT-3'

	Ex4R	5'-AGTAGAGCTCAGCATAACAGAT-3'
Exon 5	Ex5F	5'-ACTCAAGTCATTAAGCTTTCC-3'
	Ex5R	5'-AAAATATCAACAGGGATTGC-3'
Exon 6	Ex6F	5'-CCATAGCTCCCAGCCACTG-3'
	Ex6R	5'-CCTCATCTCACCCAATCTGC-3'
Exon 7	Ex7F	5'-ATTGCTTGCTGTTGCAGTGTTTG-3'
	Ex7R	5'-TTCCCTAATCTACCCACTTCAAG-3'
Exon 8	Ex8F	5'-GGATAAGTATAGTGTATGTGTTGTG-3'
	Ex8R	5'-GGCTGCTCTTGTCATAGTGA-3'
Exon 9	Ex9F	5'-TGATTGAAACCAGTGACAAAAG-3'
	Ex9R	5'-TCTGTATACGTTTTCTAGGGGTT-3'

Tabelle 2.7: Software-Programme

Software-Programm	Hersteller
FinchTV	Geospiza
SeqScape Version 2.5	Applied Biosystems, Foster City, USA

Tabelle 2.8: Datenbanken und Online-Programme

Datenbanken und Online-Programme	Internetadresse
Ensembl Genome Browser	http://www.ensembl.org
Single Nucleotide Polymorphism-Database	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/project-/SNP

2.2 DNA-Proben

Für die Untersuchung des *ELOVL5*-Gens standen DNA-Proben des Instituts für Humangenetik der Universität Gießen zur Verfügung. Es wurden 48 Proben von Patienten ausgewählt, die alle die Klinik einer spinocerebellären Ataxie zeigen. Die Patienten sind deutscher Herkunft und die Familienanamnese sowie die typische Klinik sind hinweisend für eine autosomal dominant vererbte Ataxieform. Die bearbeiteten Proben waren im Vorfeld bereits auf diverse Ataxie-Loci getestet worden. SCA 1, SCA 2, SCA 3, SCA 6, SCA 7, SCA 13, SCA 14, SCA 17, SCA 23 und SCA 28 konnten als Krankheitsursache ausgeschlossen werden.

2.3 Methoden

2.3.1 DNA-Extraktion aus Blut

Die zur Amplifikation und anschließenden Sequenzierung benötigte Patienten-DNA kann aus EDTA-Blut gewonnen werden. Es gibt verschiedene Möglichkeiten der DNA-Extraktion aus Blut. Für die vorliegende Untersuchung wurde das *DNA Blood Mini Kit* der Firma Qiagen verwendet. Zur Anwendung des Kits hat der Hersteller folgende Vorgaben gemacht:

In einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß werden 20 µl Proteinase K mit 200 µl der Blutprobe und 200 µl Lysepuffer AL (Bestandteil des Kits) etwa 10 bis 15 Sekunden auf dem Vortex vermischt.

Der Ansatz wird danach für zehn Minuten bei 52 °C im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation werden 200 µl Ethanol absolut hinzugegeben und anschließend für 10 bis 15 Sekunden auf dem Vortex gemischt. Als nächstes wird das Gemisch auf einen Säulenfilter gegeben und eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation ist die DNA an die Fritte des Säulenfilters gebunden. Der Säulenfilter wird in ein neues Auffangröhrchen gesteckt. 500 µl Puffer AW 1 (Waschpuffer 1, Bestandteil des Kits) werden zugegeben, ein erneutes Zentrifugieren für eine Minute bei 8000 rpm sorgt dafür, dass Reste des Hämoglobins und weiterer Zellbestandteile entfernt werden. In einem zweiten Waschschrift werden 500 µl Puffer AW 2 (Waschpuffer 2, Bestandteil des Kits) zugegeben und drei Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Eluat im Auffangröhrchen wird abgegossen, die restliche Flüssigkeit am Rand des Säulenfilters mit der Pipette entfernt und noch einmal bei 13000 rpm für eine Minute zentrifugiert, um verbliebene Flüssigkeitsreste vom Filter zu entfernen.

Abschließend wird der Säulenfilter auf ein beschriftetes 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gesteckt und 200 µl Puffer AE (Elutionspuffer, Bestandteil des Kits) hinzugefügt. Es wird eine Minute lang bei 13000 rpm zentrifugiert, um die DNA aus der Fritte zu lösen. Nach der Zentrifugation befindet sich die DNA im Eluat und der Säulenfilter kann entsorgt werden.

Die extrahierte DNA hat eine Konzentration von ca. 25-30 µg/ml und sollte bei 4 °C gelagert werden.

Die 48 verwendeten DNA-Proben wurden nach diesem Verfahren extrahiert.

2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung spezifischer DNA-Abschnitte.²

Für die Amplifikation sind mehrere Schritte nötig:

Zunächst muss die doppelsträngige Template-DNA denaturiert werden. Dazu wird für 1-5 Minuten eine Temperatur von 95 °C benötigt (siehe Abb. 2.1 a).

Im zweiten Schritt können die Oligonukleotid-Primer an die nun einzelsträngig vorliegende DNA binden. Diesen Vorgang nennt man Annealing (siehe Abb. 2.1 b).

Dem Annealing folgt die Elongation, das heißt die Verlängerung der Oligonukleotid-Primer mit Hilfe einer Taq-DNA-Polymerase (siehe Abb. 2.1 c). Die Taq-Polymerase startet an einem intakten 3'-OH-Ende und verlängert den Primer um ca. 1000 bp / 60 s. Ihr Temperatur-optimum liegt bei 72 °C.

Damit ist der erste Zyklus abgeschlossen und der gewünschte DNA-Abschnitt liegt nun doppelt vor. Um eine exponentielle Vervielfältigung zu erreichen, müssen mehrere Zyklen (meist 25-30) durchgeführt werden. Für den ersten

Schritt der Denaturierung reichen hierbei ab dem 2. Zyklus 30 Sekunden bei einer Temperatur von 94 °C (siehe Abb. 2.1 d und e).

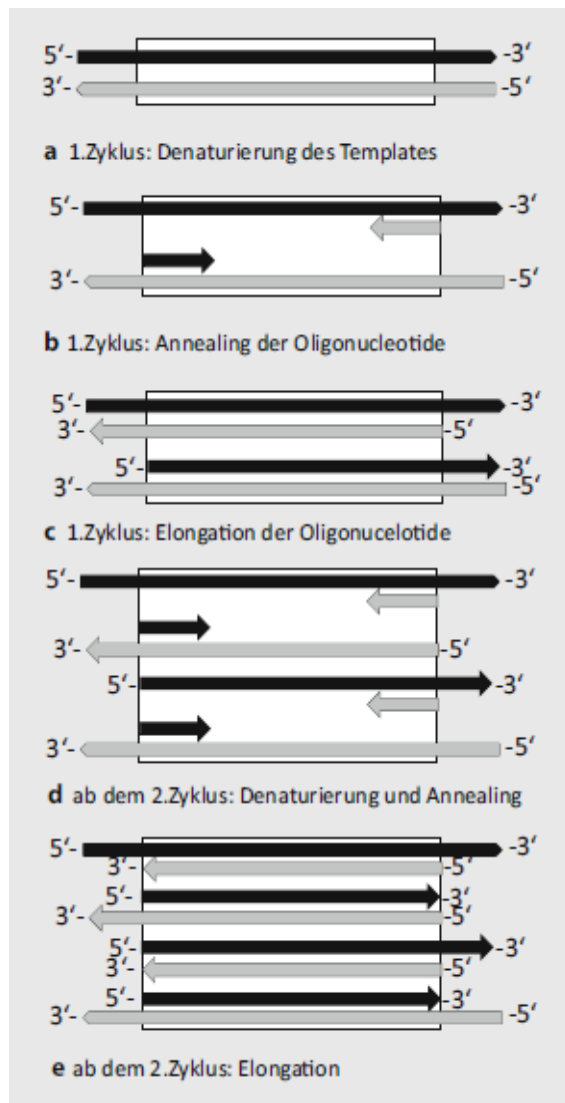


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der PCR nach (Müller und Prange 2016)

² Der gesamte folgende Abschnitt zu allgemeinen Prinzipien der PCR wurde aus Mülhardt 2013 sowie Müller und Prange 2016 zusammengefasst. Der Literaturverweis erfolgt nur einmal am Ende des Abschnitts.

Nach Abschluss aller PCR-Zyklen folgt ein finaler Extensionsschritt, bei dem für 5-15 Minuten bei 72 °C noch nicht vollständig verlängerte Produkte fertiggestellt werden.

Für eine PCR werden also DNA, spezifische Primer, die den gewünschten DNA-Abschnitt flankieren, Nukleotide, Taq-Polymerase sowie ein Puffer benötigt.

Bei den Oligonukleotid-Primern ist es wichtig darauf zu achten, dass das Basenpaarverhältnis G/C und A/T annähernd gleich ist. Die Länge der Primer sollte zwischen 17-28 Basen liegen.

Die optimale Annealing-Temperatur hängt von den jeweiligen Primern ab. Bei zu hohen Temperaturen findet kein Annealing statt, somit entsteht auch kein PCR-Produkt. Bei zu niedrigen Temperaturen kommt es zu Fehlpaarungen, die wiederum unspezifische PCR-Produkte zur Folge haben. Der T_m-Wert der unterschiedlichen Primer gibt an, bei welcher Temperatur 50 % der Oligonukleotide gebunden sind. Die optimale Annealing-Temperatur liegt ca. 5 °C unterhalb der angegebenen T_m-Werte.

Die hitzestabile Taq-Polymerase wird aus dem Bakterienstamm *Thermus aquaticus* gewonnen. Sie ermöglicht eine automatisierte Amplifizierung, ohne dass zwischen den Zyklen neue Enzyme zur Elongation hinzugegeben werden müssen.

Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dNTPs) sind die Substrate, die die Taq-Polymerase für die Verlängerung der Oligonukleotid-Primer benötigt.

Die Nukleotide bilden Komplexe mit den im 10x Puffer enthaltenen Magnesium-Ionen, welche als Co-Faktor für die Taq-Polymerase dienen (Mülhardt 2013; Müller und Prange 2016).

Für das untersuchte *ELOVL5* Gen werden die PCRs nach folgenden Angaben durchgeführt:

Tabelle 2.9: Pipettierschema für den Mastermix für 5 DNA-Proben

PCR-Ansatz für Exon 2, 3, 6 (Mix für je 5 Proben)	PCR-Ansatz für Exon 4, 5, 7, 8, 9 (Mix für je 5 Proben)
20 µl 10x Puffer	20 µl 10x Puffer
40 µl Nukleotid-Mix	40 µl Nukleotid-Mix
20 µl Betain	3 µl F-Primer (50 pmol/µl)
3 µl F-Primer (50 pmol/µl)	3 µl R-Primer (50 pmol/µl)
3 µl R-Primer (50 pmol/µl)	2 µl Taq-Polymerase
2 µl Taq-Polymerase (5 units/µl)	132 µl H ₂ O
112 µl H ₂ O	

Es werden jeweils 40 µl des Mastermix mit 1 µl Patienten-DNA-Lösung in einen 0,2 ml 8er-Streifen gegeben. Die PCR-Ansätze werden im 8er-Streifen in den Thermocycler gestellt, in dem unter folgenden Bedingungen die PCR abläuft:

Tabelle 2.10: PCR-Bedingungen

Initiale Denaturierung	95 °C	3 min	} 35
Denaturierung	94 °C	30 s	
Annealing	52-59 °C	30 s	
Elongation	72 °C	40 s (Exon 9: 35 s)	
Finaler Extensionsschritt	72 °C	3 min	
Kühlen	15 °C	Pause	

Die Annealingtemperaturen für die verschiedenen Exons sind in Tabelle 2.11 aufgeführt.

Tabelle 2.11: Annealingtemperaturen

Exon	2	3	4	5	6	7	8	9
Annealingtemperatur [°C]	53	58	58	52	58	59	58	56

In Tabelle 2.12 sind die Größen der PCR-Produkte in Basenpaaren angegeben.

Tabelle 2.12: Größe der PCR-Produkte in Basenpaaren

Exon	2	3	4	5	6	7	8	9
Produktgröße [bp]	350	424	351	373	541	422	467	482

2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Vor der Reinigung der PCR-Produkte wird mit Hilfe der Agarose-Gel-Elektrophorese der Erfolg der PCR überprüft.

Agarosegele eignen sich für die Elektrophorese von Nukleinsäuren. Sie bewegen sich, aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen, im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Ihre Beweglichkeit hängt vorrangig von der Molekülgröße bzw. Moleküllänge ab. Kleinere Moleküle legen eine größere Wanderungstrecke zurück. Der Grund hierfür liegt in der Siebstruktur der Agarose, deren Poren den kleineren Fragmenten weniger Widerstand bieten. Die Agarose-Gelelektrophorese trennt dabei DNA-Fragmente mit einer Länge zwischen 0,5 und 25 kb. Zur Größenbestimmung muss stets ein geeigneter Größenstandard mit aufgetrennt werden (Jansohn und Rothhämel 2012; Mülhardt 2013; Punzet 2014).

Um die DNA-Fragmente später im Gel darzustellen, wird das Gel mit Ethidiumbromid (EtBr) gefärbt, welches mit der DNA interagiert und diese unter UV-Licht sichtbar macht. So können die PCR Produkte auf Molekülgröße, Reinheit (z.B. Primerreste) und DNA-Gehalt untersucht werden (Jansohn und Rothhämel 2012; Mülhardt 2013; Punzet 2014).

Für die vorliegende Arbeit wurden 1,5 % Agarosegele verwendet. Sie wurden mit 1x TBE angesetzt, welches auch als Elektrophoresepuffer diente. Dazu wurden 1,5 g Agarose abgewogen und in einem 250 ml Erlenmeyer-Kolben mit 100 ml 1x TBE angesetzt und in der Mikrowelle erhitzt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Weiterhin wurden zu je 100 ml Agaroselösung zwei Tropfen Ethidiumbromid zugegeben. Diese Lösung wurde in einen Gelschlitten gegossen und härtete ca. 30 Minuten aus. Anschließend wurde das feste Gel in die Elektrophoresekammer gelegt und mit 1x TBE bedeckt. In die Taschen, die durch die eingesetzten Gelkämme entstehen, wurden jeweils 3 µl der PCR-Produkte mit 7 µl 1:10 verdünntem Ladepuffer pipettiert. Der Ladepuffer enthält zwei Farbstoffe, um die Migration der DNA während der Elektrophorese abschätzen zu können und erhöht die Dichte, damit die DNA leichter in die Geltaschen absinkt. In die äußere Tasche wurden 5 µl Größenstandard (pUC/Ddel) pipettiert. Die Stromstärke während der etwa 20-minütigen Elektrophorese betrug zwischen 40 und 50 mA. Danach konnte das Gel unter UV-Licht ausgewertet und fotografiert werden. Als Beispiel für eine Gelauswertung dient die nachfolgende Abbildung 2.2.

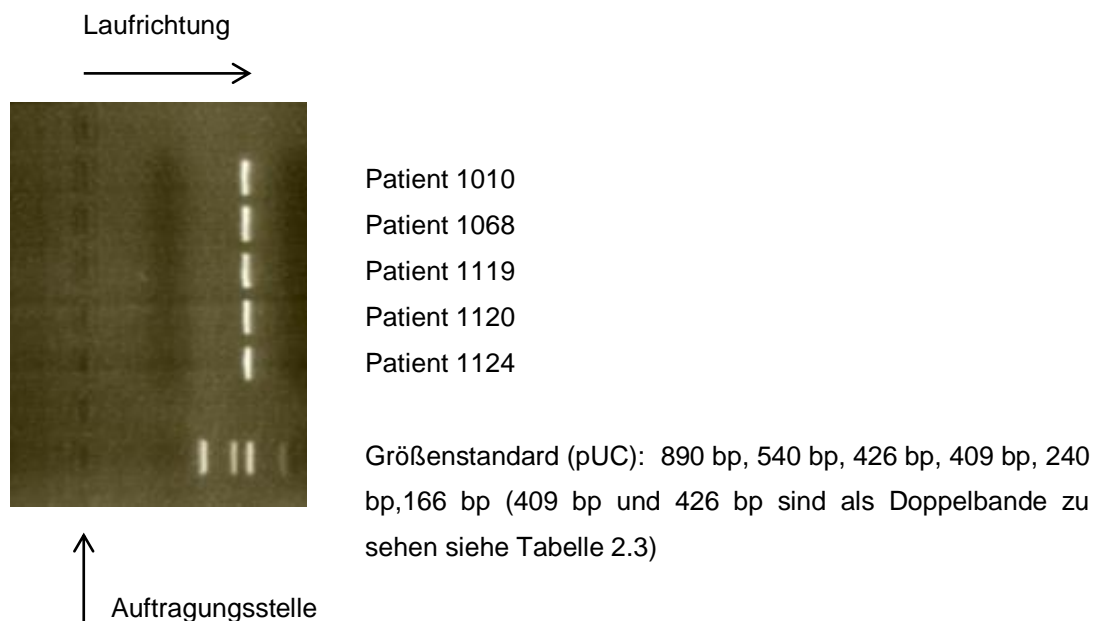


Abbildung 2.2: Beispiel-Foto einer Gelauswertung. 5 Patientenproben, Exon 3 und Größenstandard.

2.3.4 Reinigung der PCR-Produkte

Nach der erfolgreichen PCR und Kontrolle mittels Gelelektrophorese, musste das restliche PCR-Produkt von freien Nukleotiden und Primerresten gereinigt werden, damit es sequenziert werden konnte.

2.3.4.1 Reinigung mit dem *Straight-PCR-OLS Kit*

Dazu wurde das Reinigungskit *straightPCR-OLS-Kit* der Firma OMNI Life Science entsprechend den Angaben des Herstellers angewendet:

Die im Kit enthaltenen Spin Filter werden in ein Receiver Tube gesteckt und 500 µl Puffer BB (Bestandteil des Kits) hineingegeben. Die verbliebenen 37 µl PCR-Produkt werden hinzugegeben und durch dreimaliges Aufziehen mit der Pipette vermischt. Anschließend wird für 2 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die DNA ist nun an den Spin-Filter gebunden und das Filtrat kann zusammen mit dem Receiver Tube entsorgt werden. Die Spin-Filter werden in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt und geöffnet. Dann werden jeweils 30 µl Puffer EB (Bestandteil des Kits) auf die Filtermitte gegeben. (Bei einzelnen schwachen PCR-Banden wurde zum Teil mit nur 25 µl Puffer EB eluiert.) Der Filter wird so 1-5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, bevor 1 min bei 6.000 rpm zentrifugiert wird. Das gereinigte PCR-Produkt befindet sich nun in dem Eppendorf-Gefäß und wird bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Der Spin-Filter kann entsorgt werden.

2.3.4.2 Reinigung mit Exo SAP

Bei einigen Proben hat die Sequenzierung (siehe Kapitel 2.3.5) trotz Aufreinigung nicht funktioniert. Bei diesen Proben wurde zusätzlich eine Exo-SAP Reinigung vor erneuter Sequenzierung durchgeführt.

Hierfür wurde das *USB ExoSap-IT PCR Product Cleanup* Enzymgemisch der Firma Affymetrix, verwendet.

Exo-SAP besteht aus den Enzymen Exonuklease I (Exo) und Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP), die dafür sorgen, dass verbliebene überschüssige Primer und Nukleotide entfernt werden, sodass die Sequenzierung im Anschluss ungestört ablaufen kann.

Die Exonuklease I sorgt für den Verdau einzelsträngiger DNA-Primer und die Shrimp Alkaline Phosphatase hydrolysiert die verbliebenen dNTPs (Mülhardt 2013).

Es wurden die zur Sequenzierung benötigte DNA-Menge (meist 2 µl) und 0,5 µl ExoSap, sowie ad 5 µl (entsprechend 2,5 µl) H₂O vermischt und im PCR-Gerät für 15 min bei 37 °C inkubiert, um Primerreste und freie Nukleotide zu entfernen. Anschließend wurde 15 min bei 80 °C inkubiert, um die ExoSAP-Enzyme zu inaktivieren. Danach war das PCR-Produkt bereit für die Sequenzierung und konnte, wenn es nicht sofort verwendet wurde, bei -20 °C gelagert werden.

2.3.5 Sequenzierung

Die Sequenzierung dient der Bestimmung der Nukleotidabfolge in einer DNA-Sequenz (Sanger et al. 1977).

Für diese Arbeit wurde die Sequenziermethode nach Sanger, mit Hilfe eines automatischen Sequenziergerätes von Applied Biosystems, angewendet. Bei dieser Form der nicht-radioaktiven Sequenzierung wird die DNA mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert.³

Die Sequenziermethode nach Sanger wird auch Kettenabbruch- oder Didesoxynukleotidverfahren genannt. Es handelt sich um eine enzymatische Methode, bei der die DNA zunächst in ihre einzelsträngige Form gebracht wird. Diese Matrizen-DNA wird anschließend mit dem Sequenzierprimer (R- oder F-Primer) hybridisiert, von ihm ausgehend erfolgt die Synthese des komplementären Stranges.

Da bei der Sequenzierung nach Sanger nicht nur normale Desoxyribonukleotide, sondern auch Didesoxyribonukleotide (ddNTPs) eingesetzt werden, die aufgrund ihrer fehlenden OH-Gruppe zum Strangabbruch führen, entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Kettenlänge.

Die fluoreszenzmarkierten Didesoxyribonukleotide befinden sich folglich am Ende der unterschiedlich langen DNA-Stränge. Die vier Didesoxyribonukleotide ddATP, ddTTP, ddGTP und ddCTP werden unterschiedlich markiert und können während der Kapillarelektrophorese von einem Laser angeregt werden. Die detektierten Signale lassen computergestützt direkt auf die Sequenz schließen (Mülhardt 2013; Sanger et al. 1977; Jansohn und Rothhämel 2012).

Ein Beispiel für ein solches Elektropherogramm ist in Abbildung 2.3 zu sehen.

³ Der Abschnitt über die Grundlagen der Sequenzierung folgt den Darstellungen von Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. 1977; Jansohn und Rothhämel 2012 und Mülhardt 2013. Der Literaturverweis ist wieder nur einmal am Ende angegeben.

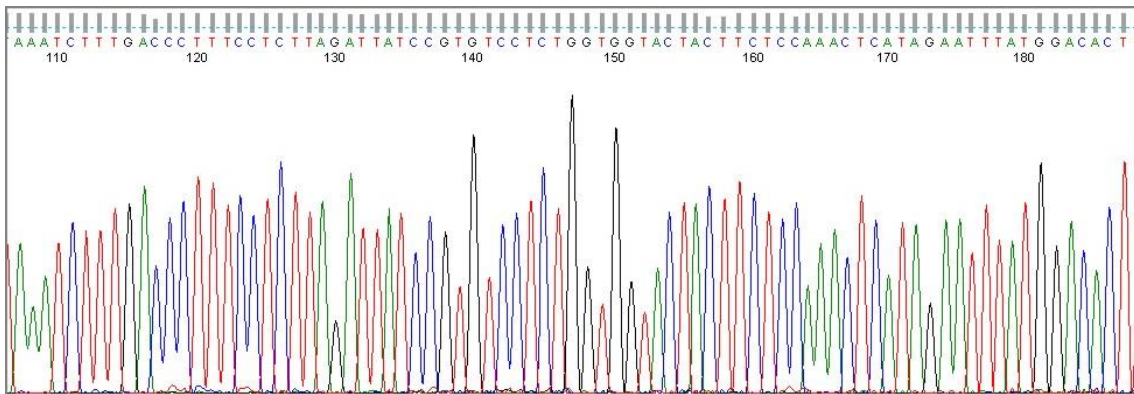


Abbildung 2.3: Beispielsequenz, Ausschnitt aus *ELOVL5* Exon 6; Patient 453

Da die Sequenzierungsreaktion am Einzelstrang stattfindet, wurde pro PCR-Fragment entweder ein Ansatz für den F-Primer oder den R-Primer pipettiert.

Tabelle 2.13: Für die Sequenzierungen verwendete F- und R-Primer

Primer mit Tris-HCl verdünnt auf 10 pmol/μl	Exon 2R	Exon 3R	Exon 4F	Exon 5F	Exon 6F	Exon 7R	Exon 8F	Exon 9R
------------------------------------------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------	------------

Welcher Primer für den Sequenzieransatz verwendet wurde, hing unter anderem von seinem CG-Gehalt ab. Dieser sollte am besten in etwa ausgeglichen sein (40-60 %) (Jansohn und Rothhämel 2012). Auch eine Poly-T-Sequenz kann die Spezifität des Primers beeinträchtigen und sollte daher vermieden werden (siehe Kapitel 3.1.7).

Jede Sequenzierungsreaktion wird in einem 15 μl Maßstab durchgeführt. Der Ansatz wird wie folgt in 0,2 ml 8er-Streifen pipettiert:

Tabelle 2.14: Bestandteile des Sequenzieransatzes

x μl H ₂ O
1 μl 5x Sequenzier-Puffer
1,5 μl Primer [10 pmol/μl]
x μl DNA-Fragment (PCR-Produkt <i>ELOVL5</i> -Exon)
2,5 μl ABI-Sequenziermix (enthält ddNTP)

Die Menge des DNA-Fragments variierte in der vorliegenden Untersuchung zwischen 1 und 3 μl, die H₂O-Menge wurde entsprechend angepasst, sodass das Gesamtvolumen von 15 μl konstant blieb.

Die Herstellung der für die Sequenzierung erforderlichen ddNTP-markierten DNA-Einzelstränge (Sequenzierreaktion) wurde im PCR Gerät unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Tabelle 2.15: Bedingungen der verschiedenen PCR-Schritte

Initiale Denaturierung	96 °C	1 min	} 25 Zyklen
Denaturierung	96 °C	10 s	
Annealing	52-59 °C	10 s	
Extension	60 °C	3 min	
Kühlen	15 °C	Pause	

Die Annealing Temperaturen wurden für jedes Exon entsprechend Tabelle 2.11 angepasst.

Im Anschluss wurden die Produkte der Sequenzierreaktionen gereinigt. Hierfür wurden 96 Well-Mikrotiterplatten mit einem speziellen Filter verwendet, der die Dye-Terminatoren entfernt und die Proben so für das Sequenzieren mittels Kapillarelektrophorese vorbereitet. Es wurden 300 µl gequollenes Sephadex G50 in jede benötigte Vertiefung pipettiert, danach wurde die Platte gewogen und eine weitere Platte als Gegengewicht austariert. Die beiden Platten wurden anschließend für 2 min bei 2100 rpm zentrifugiert. Das Eluat in den unteren Platten konnte entsorgt werden, dann wurde der Vorgang noch einmal mit zusätzlichen 200 µl gequollenem Sephadex wiederholt. Die Sephadex-Platte wurde auf eine Elutionsplatte gestellt, danach konnte pro Sephadex-Vertiefung eine Sequenzierreaktion aufgetragen werden. Die Platte wurde erneut mit einer Gegengewicht-Platte ausgewogen und 2 min bei 2100 rpm zentrifugiert. Die etwa 15 µl Eluat befanden sich nun in der Elutionsplatte und konnten in einen Multiwell-Streifen überführt werden. Zu jedem Sequenziereluat wurden 10 µl Formamid hinzugegeben, bevor die Proben im Sequenziergerät analysiert werden konnten.

2.3.6 Auswertung der Sequenzdaten

Die gereinigten ddNTP-markierten DNA-Einzelstränge wurden mit dem *ABI Sequencer 3130xl* der Firma Applied Biosystems analysiert. Um sich die Sequenzen anzusehen, wurde die Software *FinchTV*, die von Geospiza entwickelt wurde, verwendet. Das Programm *SeqScape 2.5* von Applied Biosystems ermöglicht den Vergleich der Patientenproben untereinander und mit einer Referenzsequenz (Tab. 2.7). Als Referenzsequenz wurde die Wildtyp-Sequenz der Online-Datenbank *Ensembl Genome Browser* verwendet (Tab. 2.8).

3 Ergebnisse

3.1 Sequenzanalyse des *ELOVL5*-Gens

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden 48 DNA-Proben von Patienten mit dem klinischen Bild einer spinocerebellären Ataxie untersucht.

Es wurden sowohl die codierenden Exons (2-9) des *ELOVL5*-Gens auf Chromosom 6, als auch ihre flankierenden intronischen Bereiche auf Varianten und Mutationen getestet. Sie wurden mit Hilfe der PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Referenzsequenzen wurden gängigen Genom-Servern, wie dem Ensembl Genome Browser (www.ensembl.org Stand Februar 2016) entnommen. So konnten Sequenzveränderungen im Vergleich zum Wildtyp identifiziert werden.

Von den vier, in Kapitel 1.2.4 abgebildeten, proteincodierenden Transkriptvarianten wurde die längste (ENST00000370918.8) untersucht, um alle Bereiche des Gens zu erfassen.

Wie in Kapitel 1.2.2 bereits erwähnt, werden die Begriffe Sequenzvariante und SNP (single nucleotide polymorphism) neutral für Veränderungen gegenüber der Wildtypsequenz verwendet. Nur wenn diese Veränderungen sehr selten und krankheitsverursachend sind, werden sie als Mutation bezeichnet (Hacke 2016).

Die Allelfrequenzen entsprechen den relativen Häufigkeiten eines Allels in einer bestimmten Population. Für den homozygoten Wildtyp (p^2) sowie den heterozygoten ($2pq$) und den homozygoten Genotyp (q^2) werden sie mit Hilfe des Hardy-Weinberg-Gesetzes $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ bzw. $p + q = 1$ ermittelt (Buselmaier und Tariverdian 2007).

Im Folgenden werden die im untersuchten Patientenkollektiv vorkommenden Sequenzvarianten entsprechend der Reihenfolge der Exons aufgeführt. Die Nomenklatur entspricht den HGVS-Richtlinien (<http://varnomen.hgvs.org/>). In Kapitel 3.2 werden alle identifizierten Varianten in einer tabellarischen Übersicht zusammengefasst.

3.1.1 Exon 1

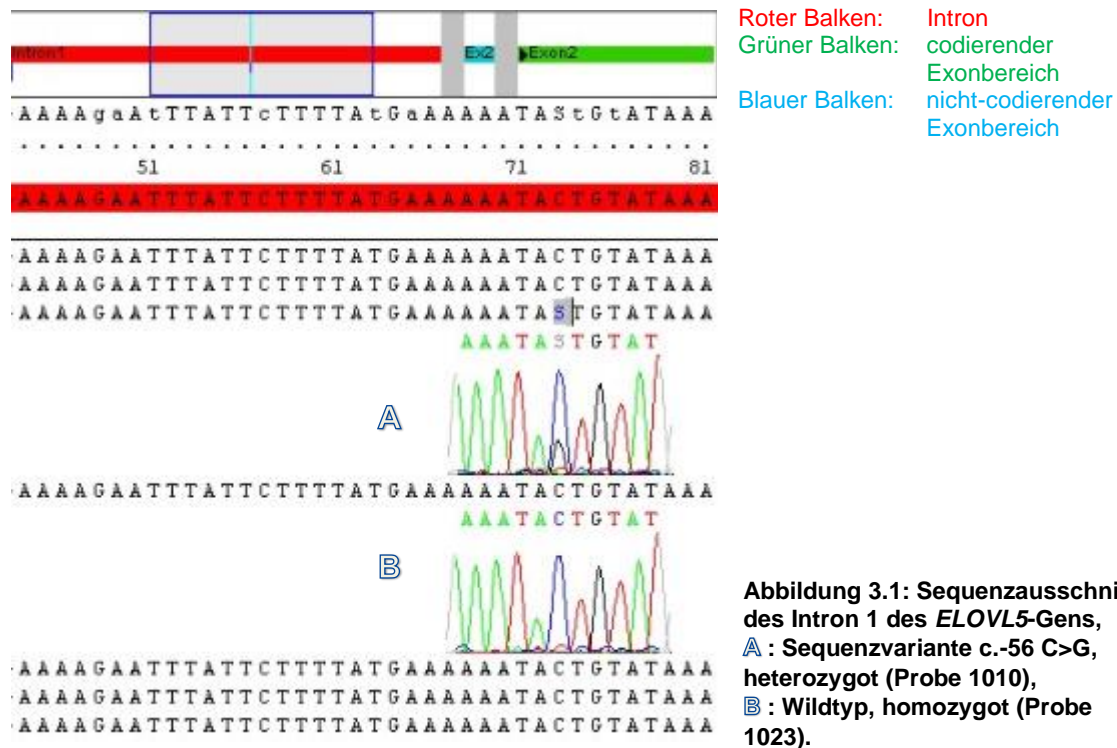
Exon 1 ist nicht proteincodierend und wurde daher nicht untersucht.

3.1.2 Exon 2

Bei der Sequenzanalyse von Exon 2 wurden zwei Varianten gefunden.

c.-56 C>G: Diese bisher unbekannte Variante liegt in Intron 1. Sie wurde bei Patient 1010 in der heterozygoten Form gefunden.

Wie auf dem Sequenzausschnitt zu sehen, erreicht der heterozygote Basenaustausch von Cytosin durch Guanin nur etwa ein Drittel der Amplitudenhöhe (s. Abb. 3.1). Da die restlichen Sequenzen jedoch keine Verunreinigungen oder Unregelmäßigkeiten in diesem Bereich zeigten, ist bei diesem Patienten von einem somatischen Mosaik auszugehen.



c.58+57 C>A: Die im Patientenkollektiv häufiger vorkommende Variante liegt im Intron 2, 57 Basen hinter dem Ende von Exon 2, und führt zu einem Austausch von Cytosin durch Adenin.

Sie liegt bei den Patienten 551, 636, 669, 673, 749, 797, 821, 892, 948, 968, 970, 975, 980, 983, 996, 1002, 1006, 1008, 1017, 1023, 1084, 1086, 1087, 1113, 1115, 1120, 1124 (27 Proben) in heterozygoter Form vor. Bei den Patientenproben 642, 654, 723, 904, 1010, und 1119 (6 Proben) wurde die Variante in homozygoter Form gefunden. Die anderen 15 Proben entsprachen der Wildtyp-Sequenz.

Ein Beispiel aus den Sequenzanalysen für die homozygote und die heterozygote Variante sowie für die Wildtyp-Sequenz ist in der nachfolgenden Abbildung zu sehen.

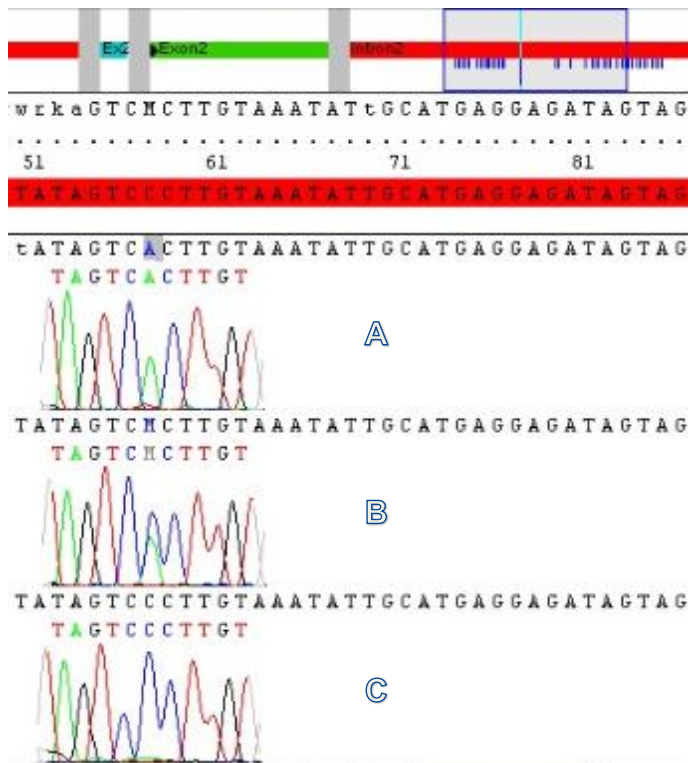


Abbildung 3.2: Sequenzausschnitt aus Intron 2 des *ELOVL5*-Gens, **A** : Sequenzvariante c.58+57 C>A, homozygot (Probe 642), **B** : Sequenzvariante c.58+57 C>A, heterozygot (Probe 749), **C** : Wildtyp, homozygot (Probe 431).

In der Bevölkerung wird für diesen SNP mit der *rs-Nummer* 3736732 eine MAF (minor allele frequency) für das seltenere Allel A von A=0,41 angegeben. Im untersuchten Patientenkollektiv beträgt die Allelfrequenz A=0,6875.

3.1.3 Exon 3

Bei der Sequenzanalyse von Exon 3 wurden weder in den exonischen noch in den angrenzenden intronischen Bereichen Sequenzvarianten gefunden.

3.1.4 Exon 4

c.304C>T: In Exon 4 wurde bei Patient 1017 eine seltene exonische Variante (MAF <0,01) mit der *rs-Nummer* 150583340 gefunden (s. Kapitel 3.3). Der Basenaustausch C>T befindet sich an Position 58 im Exon und führt zum Stoppcodon TAG. Zur Bestätigung wurde die Sequenzierung wiederholt. Beide Ergebnisse sind übereinstimmend und in der folgenden Abbildung 3.3 dargestellt.

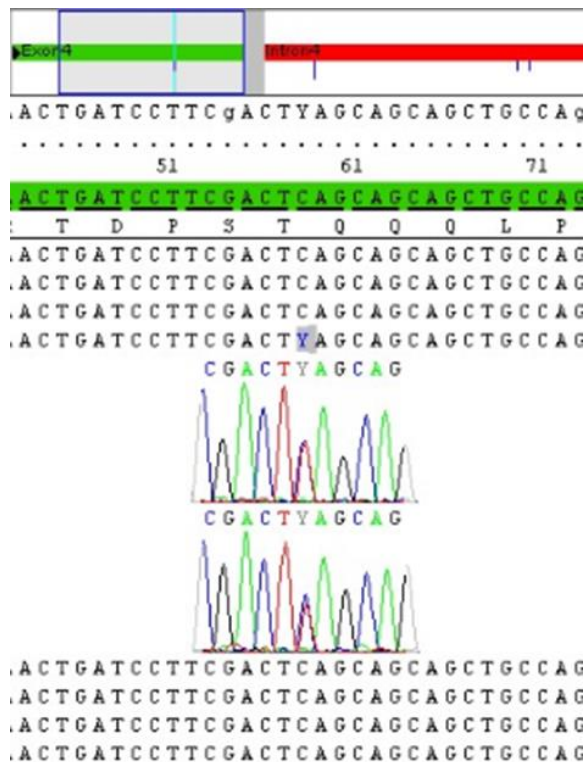


Abbildung 3.3: Ausschnitt aus der Sequenz des Exon 4 des *ELOVL5*-Gens, Sequenzvariante c.304 C>T, heterozygot (Probe 1017), oberer Sequenzausschnitt: eigene Sequenz, unterer Sequenzausschnitt: Kommerzielle Bestätigungssequenzierung

Die gezeigte Veränderung ersetzt die Aminosäure Glutamin an Position 102 des translatierten Proteins durch ein Stoppcodon. Dadurch kommt es zu einem Abbruch der Proteinsynthese mit möglichen Auswirkungen auf die mit dem fehlerhaften Protein assoziierten Stoffwechselwege. Eine genaue Erörterung, ob es sich bei der gefundenen Variante möglicherweise um eine SCA 38 verursachende Mutation handelt, folgt in Kapitel 4.2.3.

Bei der Analyse des PCR-Produktes, das Exon 4 umfasst, wurden außerdem 4 intronische Varianten gefunden. Zwei davon traten ausschließlich gekoppelt auf.

c.247-18 T>C: Die Variante im Intron 3 mit der *rs-Nummer* 6907982 und einer MAF von 0,38, trat zusammen mit der folgenden im Intron 4 liegenden Variante auf.

c.327+18 C>T: Diese Variante hat die *rs-Nummer* 6458913 und eine MAF von 0,40. Die beiden Varianten kamen bei den Patienten 551, 636, 684, 723, 788, 797, 892, 904, 970, 975, 983, 996, 1002, 1008, 1084, 1086, 1087, 1113 und 1115 (19 Proben) in der heterozygoten Form vor, während sie bei den Patienten 642, 654, 1010 und 1119 (4 Proben) jeweils homozygot vorlagen.

Damit haben sie für das jeweils seltenere Allel C (Intron 3) bzw. T (Intron 4) eine Frequenz von 0,48. Die anderen 25 Proben entsprachen in diesem Genabschnitt der Wildtyp-Sequenz.

In der nachfolgenden Abbildung 3.4 sind die SNPs in Intron 3 und 4 nebeneinander zu sehen.

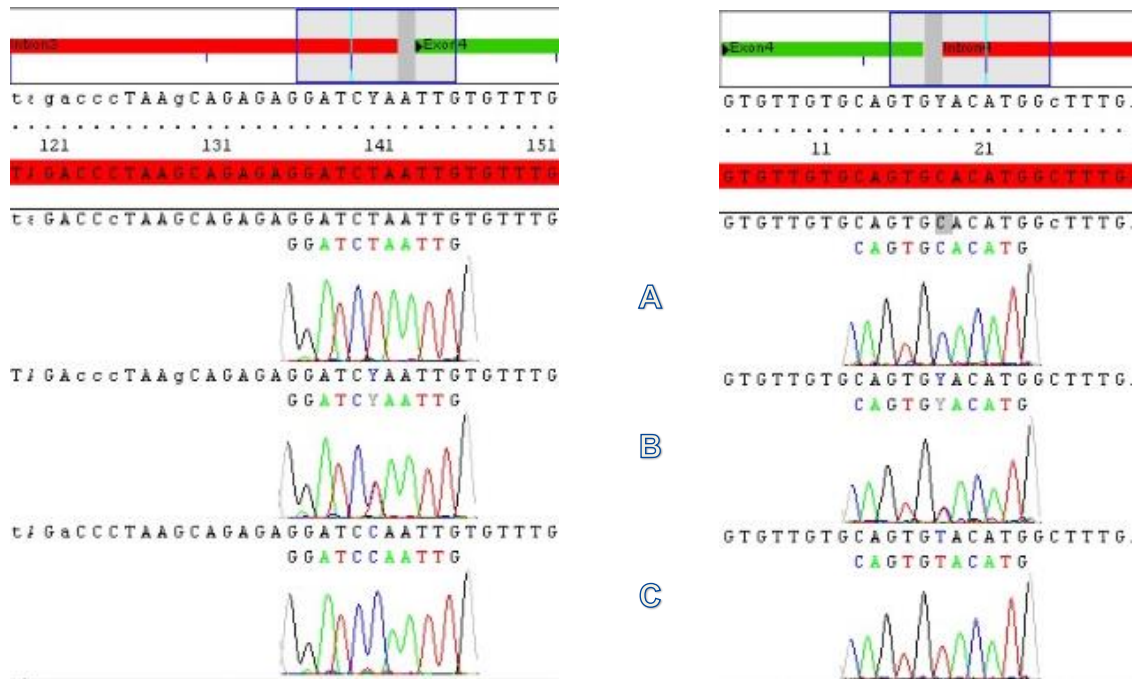


Abbildung 3.4: Sequenzausschnitte der gekoppelt auftretenden Varianten c.247-18 T>C (Intron 3) und c.327+18 C>T (Intron 4) des *ELOVL5*-Gens,
A: Wildtyp, homozygot (Probe 1006),
B: heterozygot für beide Sequenzvarianten (Probe 1008),
C: homozygot für beide Sequenzvarianten (Probe 1010).

c.327+94 C>A: Ein weiterer SNP des Intron 4 wurde bei der Sequenzierung der Probe 788 gefunden. Sie liegt in der heterozygoten Form vor (Genotyp: C/A). Ihre *rs*-Nummer lautet: 566561572, ihre MAF ist nicht bekannt. Der Patient zeigt auch die beiden oben genannten intronischen Varianten (s. Abb. 3.5).

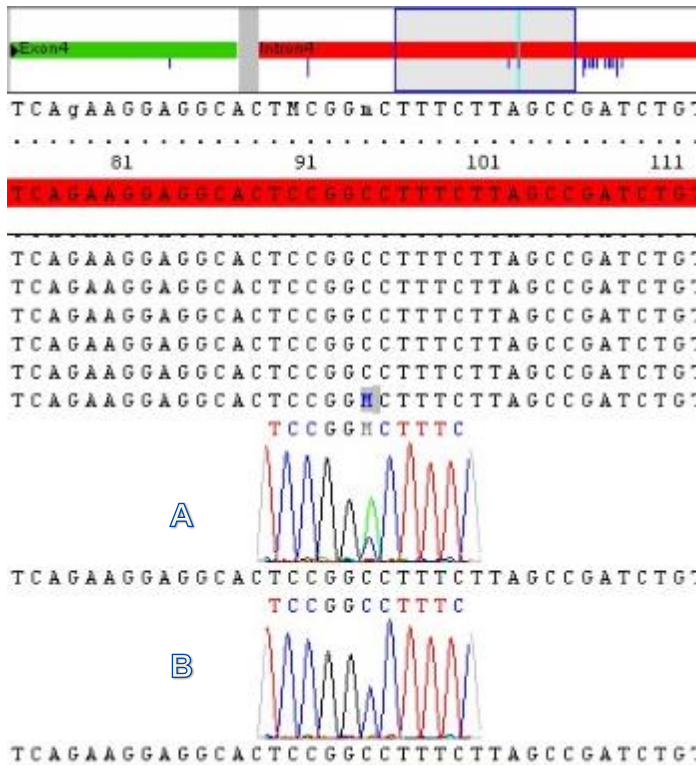


Abbildung 3.5: Sequenzausschnitt aus Intron 4 des *ELOVL5*-Gens, **A**: Sequenzvariante c.327+94 C>A, heterozygot (Probe 788), **B**: Wildtypsequenz, homozygot (Probe 797).

c.327+90 C>A: Eine bisher unbekannte Variante des Intron 4 wurde in der Probe 904 gefunden. Sie liegt bei dem Patienten in der heterozygoten Form vor und befindet sich nur 4 Basen vor der oben genannten Variante (s. Abb. 3.6).

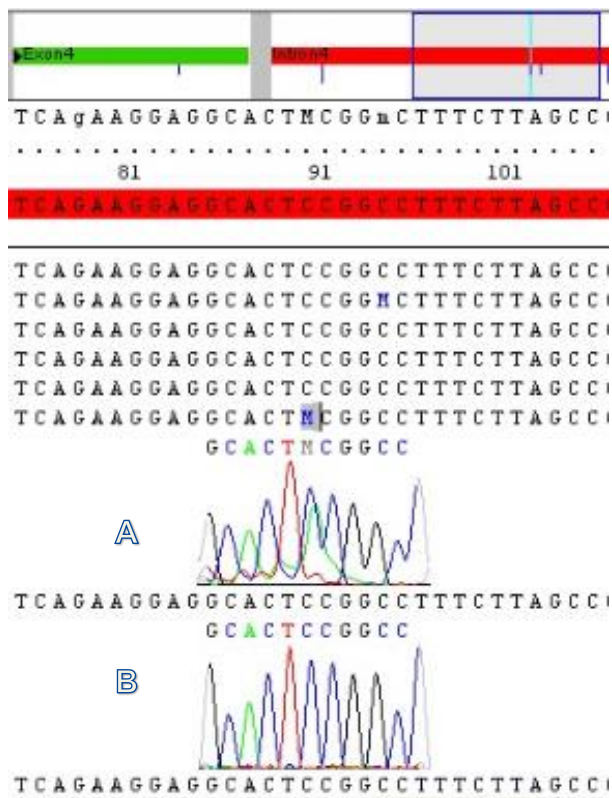


Abbildung 3.6: Sequenzausschnitt des Intron 4 des *ELOVL5*-Gens, **A**: heterozygote Variante c.327+90 C>A (Probe 904), **B**: Wildtyp, homozygot (Probe 431).

3.1.5 Exon 5

Auch in Exon 5 sind zwei Varianten aufgetreten. Beide liegen im Intron 5.

c.405+49 A>T: Der SNP mit der *rs*-Nummer 2294864 und einer MAF von 0,4 wurde in den Proben 551, 636, 669, 673, 788, 797, 821, 968, 975, 996, 1002, 1006, 1008, 1017, 1023, 1084, 1086, 1087, 1113, 1119, 1120 und 1124 (22 Proben) in der heterozygoten Form gefunden. Bei den Patienten 904, 983, 1010 und 1115 (4 Proben) liegt die homozygote Form der Variante vor. Damit liegt die Allelfrequenz im untersuchten Patientenkollektiv bei $T=0,54$. Der gefundene Basenaustausch A>T liegt 49 Basen hinter dem Ende des Exon 5 (s. Abb. 3.7). Die restlichen 22 Proben zeigten keine Sequenzveränderungen.

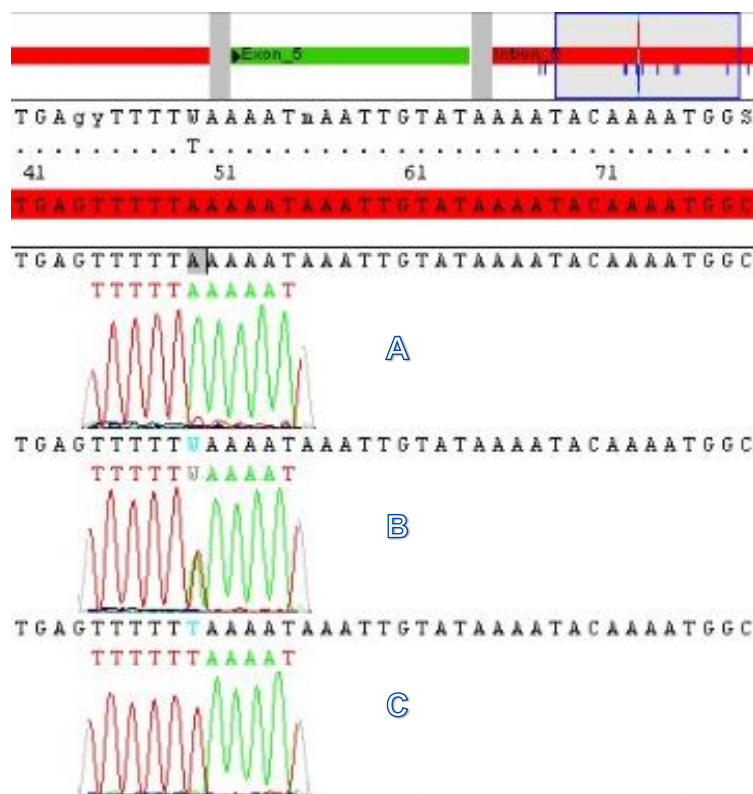


Abbildung 3.7:
Sequenzausschnitt aus Intron
5 des *ELOVL5*-Gens ,
A: Wildtyp-Sequenz,
homozygot (Probe 597),
B: Variante c.405+49 A>T,
heterozygot (Probe 636),
C: Variante c.405+49 A>T,
homozygot (Probe 642).

c.405+109 T>G: Die zweite Variante im Intron 5, die im Patientenkollektiv vorkam, ist bisher noch nicht bekannt und befindet sich 109 Basen hinter dem Ende des fünften Exons. Sie liegt bei den Patienten 975 und 1002 in der heterozygoten Form vor (s. Abb. 3.8).

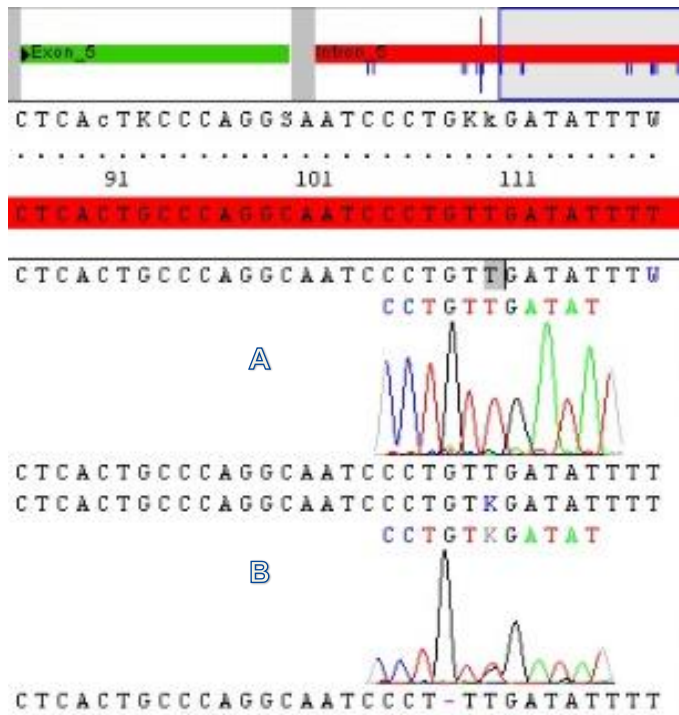


Abbildung 3.8: Sequenzausschnitt aus Intron 5 des *ELOVL5*-Gens, A: Wildtyp-Sequenz, homozygot (Probe 983), B: Sequenzvariante c.405+109 T>G, heterozygot (Probe 1002).

3.1.6 Exon 6

In Exon 6 und seinen angrenzenden intronischen Bereichen wurden keine Sequenzvarianten gefunden.

3.1.7 Exon 7

Auch in Exon 7 wurden keine Varianten gefunden. In einigen Sequenzierungen fällt im Intron 6 jedoch ein Poly-T-Bereich auf (s. Abb. 3.9). Je länger dieser ist, desto häufiger kommt es bei Sequenzierungen mit dem F-Primer zu Verschiebungen des Leserahmens. Deshalb wurde für Exon 7 zur Sequenzierung der R-Primer verwendet.

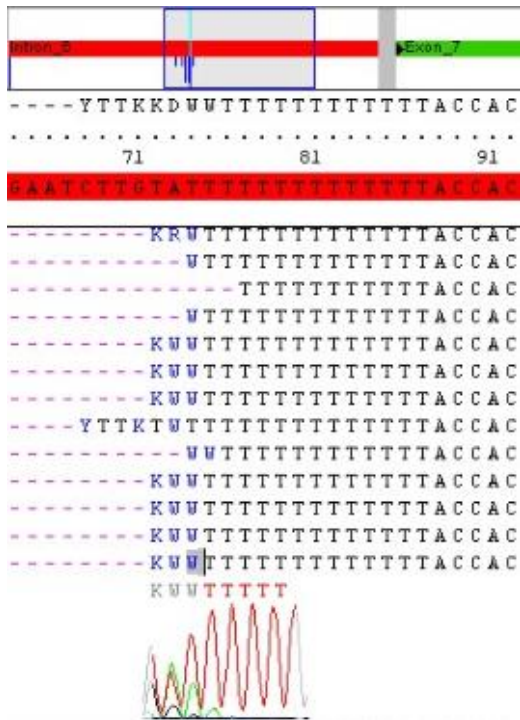


Abbildung 3.9: Poly-T-Bereich in Intron 6 des *ELOVL5*-Gens (Probe 968).

3.1.8 Exon 8

Für Exon 8 wurde im untersuchten Patientenkollektiv eine intronische Variante im angrenzenden Intron 7 gefunden.

c.703-12C>T: Bei Patient 642 wurde der seltene SNP mit der *rs*-Nummer 115953222 und einer MAF<0,01 gefunden. Sie liegt, wie unten zu sehen, in der heterozygoten Form vor (s. Abb. 3.10).

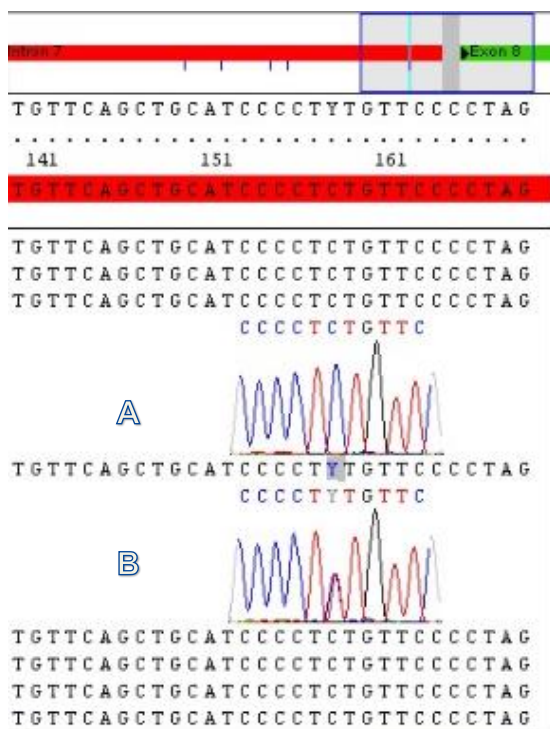


Abbildung 3.10: Sequenzausschnitt Intron 7 des *ELOVL5*-Gens,
A : Wildtyp, homozygot (Probe 636),
B : Sequenzvariante c.703-12C>T, heterozygot (Probe 642).

3.1.9 Exon 9

Im Exon 9 und seinen angrenzenden intronischen Bereichen wurden insgesamt 4 Sequenzvarianten gefunden.

Sehr häufig kam die Frameshift-Variante **c.838-37_838-36insCTGT** vor, wie in der Übersicht zu sehen ist (s. Abb. 3.11).

Layer_2 ROIs	Intron 8					Ex9 coding	Ex9 noncoding
Summary	CTAKAAAAGHWRWMTGtCTGTGgTCATTTGGTTcTCATcTKCCcTTaCaCaTTTTaG						
NT Variants						
Index	126	136	142	152	162	172	
Reference	CTATAAAGAAAACtGT---GGTCATTTGGTTCTCATCTGCCcTTACACATTTTAg						
Reference-AA	-----MARWCTGT---GGTCATTTGGTTCTCATCTGCCcTTACACATTTTAg						
▶ 788_1	-----WRWCTGT---GGTCATTTGGTTCTCATCTGCCcTTACACATTTTAg						
▶ 797_1	-----WRWCTGT---GGTCATTTGGTTCTCATCTGCCcTTACACATTTTAg						
▶ 892_1	-----WRWCTGT---GGTCATTTGGTTCTCATCTGCCcTTACACATTTTAg						
▶ 894_1	CTATAAAGAAAACtGt---GgTCATTTGGTTcTCATcTGCCcTTACACATTTTAg						
▶ 904_1	CTATAAAGAAAACtGTCTGTGGTCATTTGGTTCTCATCTGCCcTTACACATTTTAg						
▶ 912_1	CTATAAAGAAAACtGT---GGTCATTTGGTTCTCATCTGCCcTTACACATTTTAg						
▶ 930_1	CTATAAAGAAAACtGT---GGTCATTTGGTTCTCATCTGCCcTTACACATTTTAg						
▶ 948_1	-----WRWCTGT---GGTCATTTGGTTCTCATCTGCCcTTACACATTTTAg						
▶ 968_1	-----WRWCTGT---GGTCATTTGGTTCTCATCTGCCcTTACACATTTTAg						
▶ 431_1	CTATAAAGAAAACtGT---GGTCATTTGGTTCTCATCTGCCcTTACACATTTTAg						
▶ 453_1	CTATAAAGAAAACtGT---GGTCATTTGGTTCTCATCTGCCcTTACACATTTTAg						
▶ 551_1	-----WRWCTGT---GGTCATTTGGTTCTCATCTGCCcTTACACATTTTAg						
▶ 553_1	CTATAAAGAAAACtGT---GGTCATTTGGTTCTCATCTGCCcTTACACATTTTAg						
▶ 597_1	CTATAAAGAAAACtGT---GGTCATTTGGTTCTCATCTGCCcTTACACATTTTAg						
▶ 636_1	-----WRWCTGT---GGTCATTTGGTTCTCATCTGCCcTTACACATTTTAg						
▶ 642_1	CTATAAAGAAAACtGTCTGTGGTCATTTGGTTCTCATCTGCCcTTACACATTTTAg						
▶ 654_1	CTATAAAGAAAACtGTCTGTGGTCATTTGGTTCTCATCTGCCcTTACACATTTTAg						
▶ 723_1	CTATAAAGAAAACtGTCTGTGGTCATTTGGTTCTCATCTGCCcTTACACATTTTAg						
▶ 684_1	---AAAGHWRtCTGT---GGTCATTTGGTTCTCATCTGCCcTTACACATTTTAg						

Abbildung 3.11: Überblick über einen Sequenzausschnitt des Intron 8 des *ELOVL5*-Gens, Variante **c.838-37_838-36insCTGT** (Proben: 904, 642, 654 und 723).

33 der 48 untersuchten Patienten zeigten entweder die heterozygote oder homozygote Form der Variante. Dies entspricht einer Häufigkeit von 0,6875.

Heterozygot waren die Patienten: 551, 669, 673, 684, 749, 788, 797, 821, 892, 948, 968, 970, 975, 980, 996, 1002, 1006, 1008, 1017, 1023, 1084, 1087, 1113, 1115, 1120 und 1124. Homozygot waren die Patienten: 642, 654, 723, 904, 983, 1010 und 1119.

In der Bevölkerung hat die Variante mit der *rs*-Nummer 3830806 eine MAF von 0,4.

Im unten abgebildeten Sequenzausschnitt ist sowohl eine homozygote als auch eine heterozygote Form der Variante zu sehen (s. Abb. 3.12).

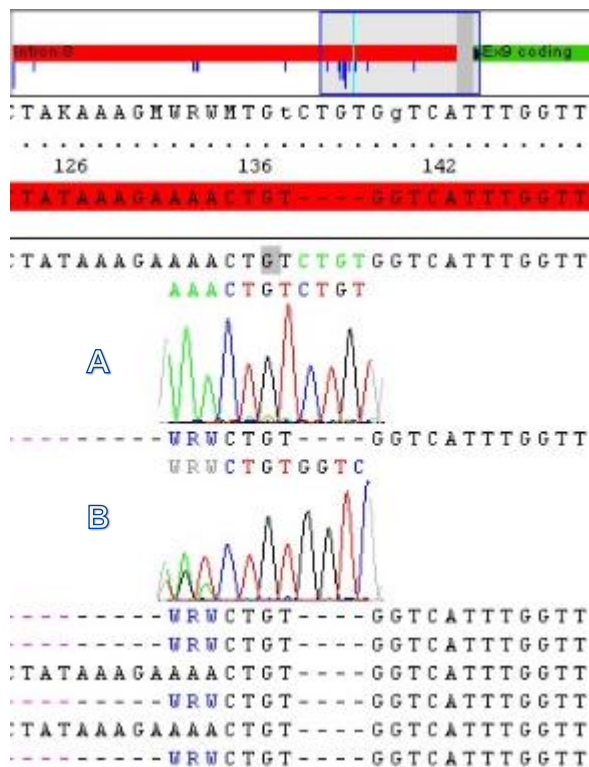


Abbildung 3.12: Sequenzausschnitt aus Intron 8 des *ELOVL5*-Gens, **A: Variante c.838-37_838-36insCTGT, homozygot (Probe 1119), **B:** Variante c.838-37_838-36insCTGT, heterozygot (Probe 1120).**

Eine weitere Variante in Intron 8 mit der *rs*-Nummer 70980834 ist die Insertions- bzw. Frameshift-Variante **c.838-97_838-96insAAAAG**.

In der heterozygoten Form wurde sie bei den Patienten mit den Probennummern 723 und 983 gefunden. Homozygot trat sie bei den Patienten mit den Nummern 642, 654, 904, 1010 und 1119 auf. In der Bevölkerung hat sie eine MAF von 0,49, im untersuchten Patientenkollektiv trat sie nur mit einer Häufigkeit von 0,15 auf.

In der Abbildung unten ist wieder je ein Sequenzausschnitt für die homozygote als auch für die heterozygote Form der Variante zu sehen (s. Abb. 3.13).

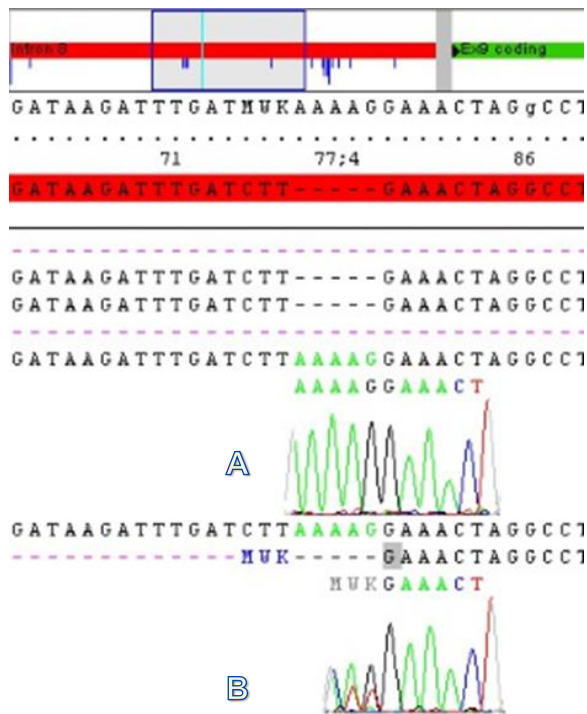


Abbildung 3.13: Sequenzausschnitt Intron 8 des *ELOVL5*-Gens,
A: Variante c.838-97_838-96insAAAAG, homozygot (Probe 642),
B: Variante c.838-97_838-96insAAAAG, heterozygot (Probe 723).

c.942 G>T p.Leu314Leu: Die im Patientenkollektiv vorkommende Variante des Exon 9 trägt die *rs*-Nummer 41273878 und hat eine MAF von 0,01. Bei den untersuchten Proben trat viermal die heterozygote Form der Variante auf, und zwar bei den Patienten 821, 968, 1006 und 1017 (s. Abb. 3.14). Das entspricht einer Allelfrequenz von $T=0,08$.

Durch den Basenaustausch G>T wird das Triplet CTG zu CTT verändert. Beide Triplets codieren für die Aminosäure Leucin, sodass es nicht zu einer Änderung der Aminosäuresequenz kommt (p.Leu314Leu). Dieser Nukleotidaustausch ohne Veränderung der Aminosäuresequenz wird „Same-sense-Mutation“ oder stille Mutation genannt (Buselmaier und Tariverdian 2007).

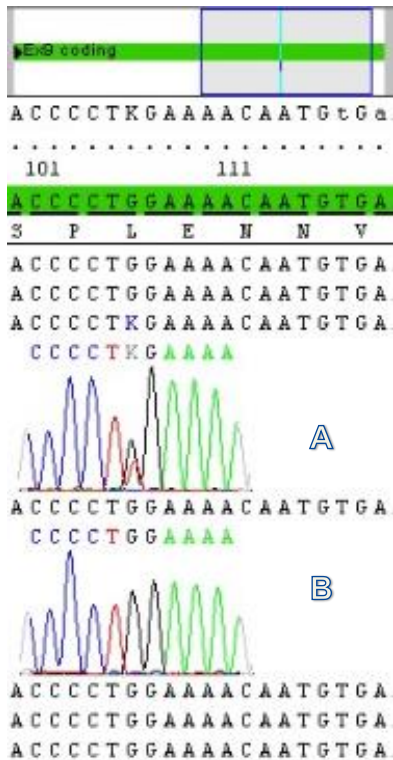


Abbildung 3.14: Sequenzausschnitt aus dem codierenden Teil des Exon 9 des *ELOVL5*-Gens,
 A : Variante c.942 G>T p.Leu314Leu, heterozygot (Probe 968),
 B : Wildtyp, homozygot (Probe 431).

c.*77 A>G: Des Weiteren wurde eine bisher nicht bekannte Variante im nicht-codierenden Abschnitt des Exon 9 gefunden. Sie lag bei den Proben 723 und 749 in der heterozygoten Form vor (s. Abb. 3.15).

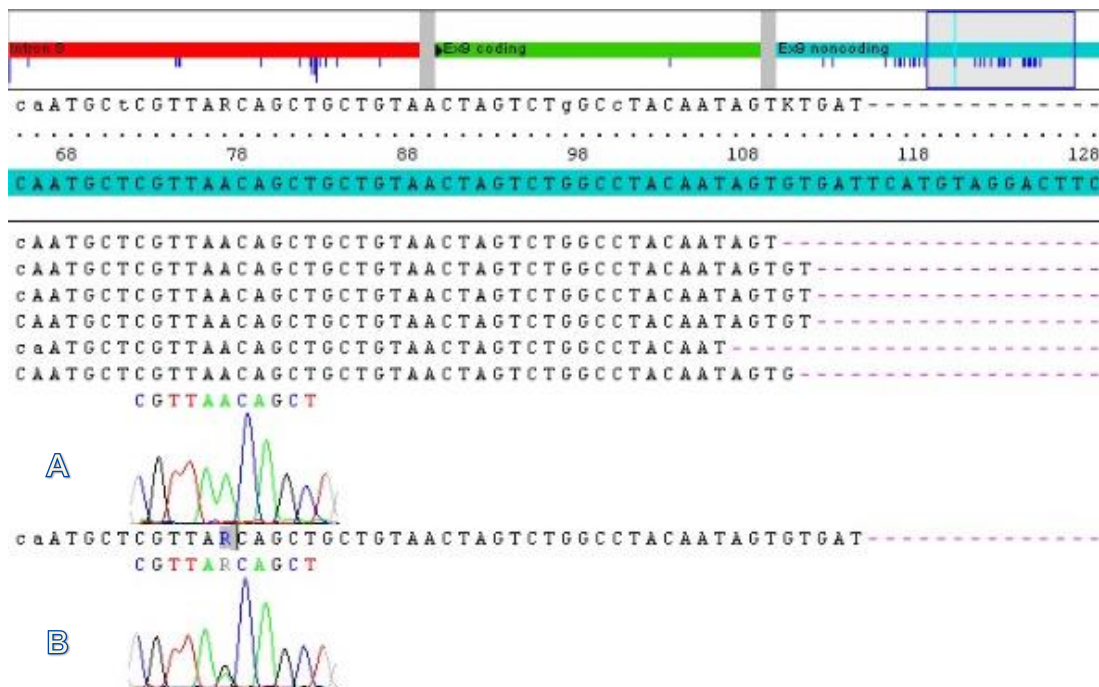


Abbildung 3.15: Sequenzausschnitt des nicht-codierenden Abschnitts von Exon 9 des *ELOVL5*-Gens,
 A: Wildtyp, homozygot (Probe 654),
 B: Sequenzvariante c.*77 A>G, heterozygot (Probe 723).

3.2 Übersichtstabelle der gefundenen Sequenzvarianten

Die in dieser Arbeit nachgewiesenen Sequenzvarianten sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

Tabelle 3.1: Liste aller gefundenen Sequenzvarianten

Lokalisation	Bezeichnung	Aminosäuren- austausch	rs-Nummer	MAF	MAF
				Bevölkerung	Patientenkollektiv
Intron 1	c.-56 C>G		unbekannt		G=0,02
Intron 2	c.58+57 C>A		rs3736732	A=0,41	A=0,69
Intron 3	c.247-18 T>C		rs6907982	C=0,38	C=0,48
Exon 4	c.304 C>T	p.Gln102*	rs3736732	T<0,01	T=0,02
Intron 4	c.327+18 C>T		rs6458913	T=0,40	T=0,48
Intron 4	c.327+90 C>A		unbekannt		A=0,02
Intron 4	c.327+94 C>A		rs566561572	A<0,01	A=0,02
Intron 5	c.405+49 A>T		rs2294864	T=0,40	T=0,54
Intron 5	c.405+109 T>G		unbekannt		G=0,04
Intron 7	c.703-12 C>T		rs115953222	T<0,01	T=0,02
Intron 8	c.838-37_838- 36insCTGT		rs3830806	MAF=0,40	MAF=0,69
Intron 8	c.838-97_838- 96insAAAAG		rs70980834	MAF=0,49	MAF=0,15
Exon 9	c.942 G>T	p.Leu314Leu	rs41273878	T=0,01	T=0,08
Exon 9 (noncoding)	c.*77 A>G		rs41273876	G=0,01	G=0,04

Alle Varianten beziehen sich auf das Transkript ENST00000370918.8.

3.3 Epikrise der Patientin 1017

Die DNA-Probe mit der Nummer 1017 (s. Kapitel 3.1.4) stammt von einer Patientin, die sich 2012 erstmalig in einer Spezialambulanz für Ataxie-Patienten vorstellte. Die Patientin ist 1967 geboren, war also zum damaligen Zeitpunkt 45 Jahre alt. Zuletzt stellte sie sich im Januar 2013 ambulant vor, woraus sich zusammenfassend die folgende Anamnese ergibt: Die Patientin leidet an einem seit 4 Jahren schleichend progredienten cerebellär-ataktischen Syndrom, welches ihr insbesondere in Form einer Gangstörung aufgefallen war. Sie berichtet, bereits seit ca. zwei bis drei Jahren an einer Gleichgewichtsstörung zu leiden. Vor allem beim Duschen könne sie nicht mehr die Augen schließen, sonst falle sie um. In dunklen Räumen bemerke sie eine verstärkte Unsicherheit. Sie müsse sich dabei immer an Gegenständen festhalten. Das Fahrradfahren sei ihr auch nicht mehr möglich. Beim Gehen und vor allem beim Autofahren falle ihr ein Linksdrall auf. Letzte Woche sei sie deshalb von der Polizei angehalten worden, da sie dachten, sie sei betrunken. Zu Stürzen komme es gelegentlich auch. Der letzte Sturz ereignete sich vor 1-2 Wochen. Im Alltag bemerke sie zusätzlich, dass ihr Gegenstände aus der linken Hand fallen. Bei Aufregung beginne sie zu zittern. Zusätzliche habe sie gelegentlich einen Drehschwindel, der willkürlich kontrolliert werden könne. Beim Schreiben bemerke sie keine Schwierigkeiten.

Die Familienanamnese liefert keine krankheitsrelevanten Indizien. Die Mutter verstarb im Alter von 53 Jahren an einem Hirntumor, eine Obduktion habe jedoch keinen Hinweis auf eine zusätzliche degenerative Erkrankung des Hirns ergeben. Vater sowie die Geschwister (Bruder und Schwester) seien gesund.

Ein cMRT vom 13.02.2012 ergab einen Normalbefund ohne Hinweise auf eine Kleinhirnatrophie. Ein HWS-MRT vom 21.05.2012 ergab eine relative Spinalkanalstenose von C4-C7 mit lateralem Bandscheibenprolaps C5/6 und C6/7 links. Zusätzlich erfolgten elektrophysiologische Untersuchungen, welche außer nicht erhärtlichen N. Suralis beidseits Normalbefunde ergaben.

Aktuell nimmt die Patientin keine Medikamente ein. Sie raucht ein Päckchen Zigaretten pro Tag (kumulativ ca. 25py), trinkt gelegentlich Alkohol und nimmt keine Drogen. Als Vorerkrankung ist ein Zustand nach Schulteroperation links 1999 bekannt.

Die Diagnostik auf SCA 1, 2, 3, 6, 7, 13, 14, 17, 23 und 28 sowie Friedreich-Ataxie und die mitochondriale MTATP6-Ataxie waren sämtlich ohne erklärenden Befund und konnten als Krankheitsursache ausgeschlossen werden.

Der klinische Aufnahmebefund im Januar 2013 gibt an, dass die Patientin wach und allseits orientiert ist. Sie zeigt keinen Meningismus. Auffallend sind eine sakkadierte Blickfolge und ein horizontaler Blickrichtungsnystagmus (BRN). Der vestibulo-okkuläre Reflex (VOR) supprimiert unvollständig. Der Glabella-Reflex habituiert nicht. Es besteht eine diskrete Dysarthrie. Der Arm-Halteversuch (AHV) und Bein-Halteversuch (BHV) sind beidseits unauffällig, ohne Absinken. Finger-Nase-Versuch (FNV) und Knie-Hacke-Versuch (KHV) sind metrisch, der KHV ist auf beiden Seiten leicht ataktisch. Muskeigenreflexe (MER) der oberen Extremitäten sind symmetrisch und formal gesteigert bei verbreiterten Reflexzonen. An den unteren Extremitäten sind die MER seitengleich und lebhaft. Das Babinski-Zeichen ist negativ. Die Ästhesie ist intakt. Ebenso ist die grobe Kraft allseits voll erhalten. Den Stand, Gang, Zehen- und Hackengang bewältigt die Patientin sicher, der Seiltänzerengang ist leicht unsicher, aber möglich. Der Tandem-Stand ist möglich. Der Romberg-Versuch verläuft negativ.

Im Scale for the Assessment and Rating of Ataxia (SARA) (s. Kapitel 1.2.3.1) erreicht die Patientin einen Wert von 4 Punkten, wobei 0 Punkte bedeuten, dass keine Ataxie besteht und 40 Punkte die schwerste Form einer Ataxie beschreiben.

Die Frage, ob die bei dieser Patientin gefundene seltene Variante in Exon 4 des *ELOVL5*-Gens krankheitsauslösend ist, wird in Kapitel 4.2.3 diskutiert.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden 48 vorselektionierte Ataxie-Patienten auf Mutationen im *ELOVL5*-Gen getestet. Zuvor waren bei den Patienten die Loci SCA 1, SCA 2, SCA 3, SCA 6, SCA 7, SCA 13, SCA 14, SCA 17, SCA 23 und SCA 28 ausgeschlossen worden. Da es bei seltenen Erkrankungen in kleinen Patientenkollektiven unwahrscheinlich ist, Mutationen aufzuspüren, wurden hier Patienten ausgewählt, über die hinweisende klinische Informationen vorliegen - beispielsweise zum Erbgang, mit mehreren Betroffenen in der Familie oder über eine typische Symptomatik.

4.1 Häufigkeit der SCA 38

Die spinocerebellären Ataxien sind mit einer Häufigkeit von 5-7 / 100.000 eine eher seltene genetische Erkrankung (Di Gregorio et al. 2014; Bird 2016). Durch Repeat-Expansionen verursachte Ataxien sind weltweit am häufigsten vertreten, davon ist die SCA 3 die häufigste Form, gefolgt von SCA 1, 2, 6 und 7. Die Prävalenzen der SCA-Subtypen können jedoch regional aufgrund des Gründereffektes variieren (Kim und Cho 2015; Bird 2016). In Deutschland sind zusätzlich die selteneren Subtypen SCA 5, 14, 15 / 16, 17 und 28 klinisch relevant (Jacobi et al. 2013). In den letzten Jahren wurden viele weitere Ataxie-Loci beschrieben, bei denen Punktmutationen oder kleine Deletionen als krankheitsverursachend identifiziert worden sind. Zu diesen gehört auch die SCA 38, bei der Mutationen im *ELOVL5*-Gen vorliegen. Dennoch verbleibt ein großer Teil der Ataxie-Patienten, die bisher nicht korrekt diagnostiziert werden können. Das liegt daran, dass einige der Krankheitsloci noch nicht identifiziert worden sind. Auch epidemiologische Daten lassen vermuten, dass SCAs häufiger vorkommen könnten als bisher angenommen (Klockgether und Paulson 2011; Matilla-Dueñas 2012).

Für die SCA 38 sind bisher nur zwei verschiedene Punktmutationen beschrieben worden. Die Erstbeschreiber um Di Gregorio schätzten die Prävalenz der SCA 38, nach Untersuchung von 456 europäischen Ataxie-Patienten, auf unter 1 % (Di Gregorio et al. 2014). Wie oben erläutert, wurden im Rahmen dieser Arbeit 48 SCA-Patienten auf Mutationen im *ELOVL5*-Gen getestet. Bei einer Patientin fand sich eine seltene Variante in Exon 4 (Kapitel 3.1.4), die möglicherweise krankheitsauslösend ist. Dies entspricht einer Häufigkeit von ca. 2 %. Dieser Wert ist höher als die angegebenen 1 % der italienischen Gruppe (Di Gregorio et al. 2014). Auch Liu und Kollegen, die 346 Ataxiepatienten auf Mutationen im *ELOVL5*-Gen untersuchten ohne eine mutationsverdächtige Variante zu finden, schätzten die Häufigkeit der SCA 38

niedriger, als im Hinblick auf die vorliegende Untersuchung anzunehmen ist (Liu et al. 2015). Die variierenden Angaben der Häufigkeiten erklären sich wahrscheinlich durch regionale Unterschiede und Einflüsse durch die verschiedenen ethnischen Zugehörigkeiten.

Nach bisherigem Kenntnisstand ist daher noch nicht geklärt, ob Mutationen im *ELOVL5*-Gen für deutsche Ataxie-Patienten relevant sein könnten und bei der molekulargenetischen Untersuchung berücksichtigt werden sollten. Im Hinblick auf das in dieser Arbeit untersuchte kleine Patientenkollektiv und die Seltenheit der Erkrankung ist es schwierig, Angaben über die Häufigkeit der SCA 38 in der deutschen Allgemeinbevölkerung zu machen. Das Auffinden der neuen Variante zeigt jedoch, dass SCA 38 nach Ausschluss häufigerer SCA-Subtypen für eine erweiterte Diagnostik in Betracht gezogen werden sollte.

4.2 Genetik der SCA 38

Das Kleinhirn und seine Verbindungen sind sehr empfindliche Bereiche für genetische Läsionen (Paulson 2009). Für die SCA 38 sind Mutationen im *ELOVL5*-Gen verantwortlich (Di Gregorio et al. 2014). Das Gen umfasst ca. 81,8 kb und ist in der cytogenetischen Region 6p12.1 lokalisiert. Es codiert für eine Elongase, die in den Fettsäure-Stoffwechsel involviert ist (Ohno et al. 2010). Es gibt sieben verschiedene Transkriptvarianten von denen vier proteincodierend sind. Untersucht wurde die längste Transkriptvariante (ENST00000370918.8), die als einzige Exon 4 enthält (s. Abb. 1.2 S.15).

Eine Schwierigkeit bei der Beurteilung gefundener Sequenzvarianten ist die Frage, ob es sich um echte, d.h. krankheitsauslösende Mutationen handelt oder ob benigne Polymorphismen vorliegen.

4.2.1 Bekannte Mutationen des *ELOVL5*-Gens

Bisher sind für die SCA 38 zwei verschiedene Missense-Mutationen bekannt. Im Transkript (ENST00000304434.10) sind die Mutationen in Exon 3 und Exon 7 des *ELOVL5*-Gens lokalisiert. Es handelt sich dabei um eine C zu G Transversion (c.214C>G; p.Leu72Val) und um eine G zu T Transversion (c.689G>T; p.Gly230Val) (Di Gregorio et al. 2014). In dieser Transkriptvariante liegen beide Mutationen innerhalb von Transmembrandomänen. Außerdem betreffen die beiden bereits beschriebenen *ELOVL5*-Mutationen hoch konservierte AS (s. Abb. 4.1). Es ist daher anzunehmen, dass sie eine wichtige Rolle für die Struktur und Funktion des Proteins spielen. Die Ergebnisse bioinformatischer Programme, die Modelle der veränderten

Proteinstruktur erstellen, sprechen zusätzlich für eine Schädigung des Proteins und damit für eine Kausalität zwischen Mutation und Krankheit (Di Gregorio et al. 2014).

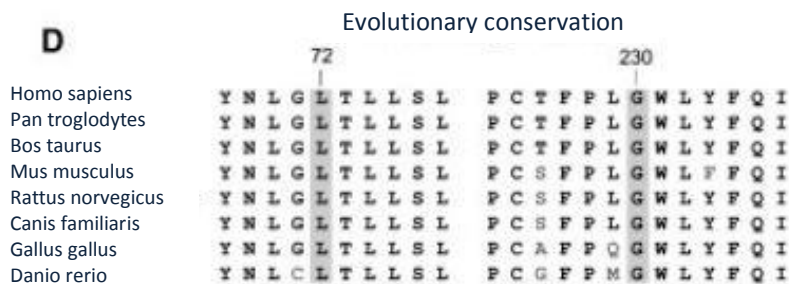


Abbildung 4.1: Evolutionäre Konservierung der von den bekannten Mutationen betroffenen Aminosäuren (Di Gregorio et al. 2014)

4.2.2 Neu identifizierte *ELOVL5*-Varianten in nicht-codierenden Genregionen

Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit wurden insgesamt 14 Varianten im *ELOVL5*-Gen nachgewiesen, darunter waren vier bisher unbekannte Varianten. Bei den vier bisher unbekanntem Varianten handelt es sich jeweils um Punktmutationen, das heißt den Austausch einer einzelnen Base. Drei davon sind intronische Varianten, eine liegt im nicht-codierenden Abschnitt des Exon 9 bzw. im Übergang zur 3'UTR-Region.

Auch wenn Mutationen in nicht-codierenden Bereichen liegen, können sie zu Veränderungen in Menge und Beschaffenheit des Genproduktes führen. Wie in Kapitel 1.2.3.2 bereits erwähnt, liegen die expandierten Bereiche bei der SCA 8, 10, 12, 31 und 36 außerhalb codierender Regionen und werden deshalb bei der Proteinsynthese nicht translatiert. Als Krankheitsursache wird von einem „toxic gain of function“ auf RNA-Ebene ausgegangen, der eine reduzierte Proteinbiosynthese zur Folge hat (Storey 2014; Hacke 2016). Auch bei anderen genetischen Erkrankungen, wie beispielsweise der Cystischen Fibrose führen Mutationen in nicht-codierenden Genabschnitten zu einer veränderten Proteinbiosynthese. Es wurden verschiedene Varianten im *CFTR*-Gen gefunden, die zu alternativem Splicing führen, sodass auf mRNA-Ebene Exons fehlen oder ein neues Exon eingebaut wird (Hull et al. 1993; Costantino et al. 2010).

Bei den drei neu identifizierten intronischen *ELOVL5*-Varianten lagen die Veränderungen jedoch nicht im Bereich der Splice-Stellen. Daher wird es sich bei diesen nicht-codierenden Varianten am wahrscheinlichsten um benigne Polymorphismen handeln.

Neun der zehn bereits bekannten Varianten waren der Datenbank ensembl.org zufolge nicht verdächtig für eine krankheitsauslösende Mutation.

4.2.3 *ELOVL5*-Variante in der codierenden Sequenz, Patientin 1017

Eine Variante, die in der codierenden Sequenz lokalisiert ist, wurde bei einer der untersuchten Patienten-DNAs in Exon 4 identifiziert. Es handelt sich um eine C zu T Transition an cDNA-Position 304 (c.304C>T; p.Gln102*). Der Basenaustausch führt zu einem Austausch von Glutamin durch ein Terminationscodon, welches zum Abbruch der Translation führt. Diese Variante ist bereits beschrieben (rs150583340), aber mit einer MAF von $T < 0,01$ als sehr selten vorkommend.

Während die beiden bekannten Mutationen (c.214C>G; p.Leu72Val) und (c.689G>T; p.Gly230Val), die eine SCA 38 auslösen, durch einen Austausch einer Aminosäure in Form einer Missense-Mutation im Bereich einer Transmembrandomäne zu einer veränderten Struktur des Proteins führen, führt das neu generierte Stoppcodon in Exon 4 zu einem Abbruch der Translation und damit in jedem Fall zu einer gestörten Funktion der Elongase bzw. zu einem „loss of function“. Daher war es nicht notwendig, die Struktur des mutierten Proteins mit Hilfe bioinformatischer Programme zu untersuchen.

Trotz des neu generierten Stoppcodons ist bei der gefundenen Variante nicht eindeutig zu sagen, ob sie krankheitsauslösend ist oder nicht. Grund hierfür sind die vier unterschiedlichen proteincodierenden Transkriptvarianten des *ELOVL5*-Gens. Bisher ist nicht bekannt, in welchen Geweben die jeweiligen Transkriptvarianten verstärkt exprimiert sind. Exon 4 ist nur im längsten (ENST00000370918.8) der vier proteincodierenden Transkriptvarianten vorhanden. Das bedeutet, dass die gefundene Variante die klinischen Symptome der Patientin nur erklärt, wenn die untersuchte Transkriptvariante auch im Kleinhirn exprimiert wird. Di Gregorio und Kollegen haben in ihren Experimenten eine andere Transkriptvariante untersucht, die das Exon 4 nicht enthält.

Das bei SCA 28 mutierte *AFG3L2*-Gen wird in humanen Purkinjezellen des Kleinhirns stark exprimiert (Di Bella et al. 2010). Für *ELOVL5* gibt es Daten, die eine hohe *ELOVL5*-Expression im Fettgewebe, Brustgewebe, Nebenniere und Prostata belegen. Auch in Lunge, Gehirn und Hodengewebe wird *ELOVL5*-RNA exprimiert, allerdings etwas schwächer (<http://genome-euro.ucsc.edu>). Es gibt jedoch bisher keine gezielten Untersuchungen um welche Transkriptvarianten es sich in den unterschiedlichen Geweben handelt. Die Expression der verschiedenen *ELOVL5*-Transkripte im Kleinhirn müsste weiter untersucht werden.

4.3 Pathophysiologie

Wie in Kapitel 1.2.4.2 beschrieben, sind Arachidonsäure und Docosahexaensäure (DHA) zwei der Endprodukte von *ELOVL5*. In Purkinjezellen wurde eine hohe Konzentration an Arachidonsäure und DHA nachgewiesen. Mutationen in *ELOVL5* führen zu einem reduzierten Vorkommen von Arachidonsäure und DHA im Kleinhirn und bedingen durch eine reduzierte Fettsäure-Synthese die für SCA 38 typische Pathophysiologie. So wurde in der von Di Gregorio und Kollegen durchgeführten Untersuchung festgestellt, dass die Konzentration beider Fettsäuren im Serum betroffener Patienten vermindert war (Di Gregorio et al. 2014). Durch die fehlende Rückkopplung der Endprodukte sind die fehlerhaften Transkripte vermehrt nachweisbar (Shikama et al. 2015). Leider stand keine neue Blutprobe der Patientin 1017 zur Verfügung, um die Fettsäure-Spiegel zu bestimmen. Durch das Stoppcodon wäre in diesem Fall von einem Fehlen oder zumindest einer Reduzierung des Transkriptes auszugehen. Über „nonsense-mediated-decay“ kommt es zu einem Abbau der aberranten mRNA. Somit ist von einer reduzierten Enzymkonzentration bedingt durch nur ein funktionelles *ELOVL5*-Allel auszugehen.

Wie in Kapitel 1.2.4.3 erwähnt, ist die Elongase normalerweise im ER lokalisiert. Die von Di Gregorio identifizierten Mutationen führen zu einer Fehllokalisierung der Elongase in den Golgi-Apparat. Da es sich bei der neuen Variante (Pat. 1017) jedoch nicht um eine Missense Mutation, sondern um eine Nonsense-Mutation handelt, entsteht die Elongase erst gar nicht in vergleichbarer Menge. Der pathogene Mechanismus scheint hier ein anderer als bei den bereits bekannten Mutationen zu sein, woraus sich womöglich auch Unterschiede im Phänotyp ergeben könnten (s. 4.4).

Neben SCA 38 (*ELOVL5*) wurden auch bei SCA 34 (*ELOVL4*) Mutationen in einem Elongase-codierenden Gen beschrieben (Di Gregorio et al. 2014; Borroni et al. 2016). *ELOVL4* Mutationen sind nicht nur mit der SCA 34 assoziiert, sondern auch mit der Erythrokeratoderma variabilis (EKV), Makuladegeneration, Ichthyosen, der spastischen Paraplegie und Defekten der Hirnentwicklung (Cadieux-Dion et al. 2014). Die unterschiedlichen Phänotypen, die durch verschiedene *ELOVL4* Mutationen ausgelöst werden können, weisen auf einen Entstehungsmechanismus bedingt durch die veränderte Fettsäuresynthese hin (Agbaga 2016). Darüber hinaus ist bekannt, dass Störungen der Fettsäure-Synthese auch Augenerkrankungen, entzündliche Erkrankungen, Diabetes u.a. verursachen können (Leonard et al. 2000).

Umgekehrt zeigen viele der anderen SCAs, die nicht mit einer veränderten Fettsäuresynthese assoziiert sind, klinische und pathologische Merkmale wie

Gleichgewichts- und Koordinationsverlust und sind durch Purkinjezell-Degeneration charakterisiert (Koeppen 2005). Die Überlappungen der Phänotypen deuten darauf hin, dass der selektiven cerebellären Neurodegeneration ein gemeinsamer pathologischer Weg zugrunde liegt (Manto und Marmolino 2009; Matilla-Dueñas 2012; Smeets und Verbeek 2014). Lim und Kollegen haben mehrere Interaktionen zwischen den verschiedenen ataxieverursachenden Proteinen gefunden. Sie deckten gemeinsame zelluläre Wege auf, die zu Purkinjezell-dysfunktion und -degeneration führen könnten. Auf diesem Weg könnten auch mögliche Genloci für SCAs gefunden werden, deren Defekte bisher nicht identifiziert wurden (Lim et al. 2006).

4.4 Genotyp-Phänotyp-Beobachtungen

Der Phänotyp der SCA 38 ist charakterisiert durch eine reine Form der Kleinhirn-Ataxie. Initiale Symptome sind eine stammbetonte Ataxie und eine Gangstörung. Sie treten um das 40. Lebensjahr auf. Der Erkrankungsverlauf ist langsam progredient. Die betroffenen Patienten sind bis zu einem Alter von etwa 50 Jahren in der Lage zu gehen, später benötigen sie einen Gehstock. Ein Nystagmus liegt bei allen bisher diagnostizierten SCA 38 Patienten vor. Weitere mögliche Symptome sind Hohlfüße, die jedoch nur bei Patienten mit der Mutation c.689G>T in Exon 7 diagnostiziert werden konnten. Olfaktorische Defizite, Dysarthrie, Extremitätenataxie, Ophthalmoparesen mit Diplopie, axonale Neuropathie und sensorische Störungen wurden ebenfalls beschrieben. Auch arterielle Hypertension und Typ 2 Diabetes sind im Patientenkollektiv vorgekommen (Di Gregorio et al. 2014; Borroni et al. 2016).

Von der Patientin 1017 ist bekannt, dass sie sich im Alter von 45 Jahren erstmalig beim Neurologen vorstellte, wobei erste Krankheitssymptome bereits im Alter von 42 Jahren auftraten. Der Erkrankungsverlauf war langsam progredient. Erste Krankheitssymptome waren eine vorherrschende Gangstörung und Gleichgewichtsstörung. Vergleicht man den Krankheitsverlauf der Patientin mit dem von anderen SCA 38-Patienten, so ergeben sich Übereinstimmungen bei dem Erkrankungsbeginn um das 40. Lebensjahr sowie dem schleichend progredienten Prozess. Eine Gangstörung als initiales Symptom und ein Nystagmus, der in allen bisher beschriebenen Fällen der SCA 38 aufgetreten ist, fand sich ebenfalls bei Patientin 1017. Diese Symptome gehören jedoch zur klassischen Trias spinocerebellärer Ataxien und kommen auch bei den anderen Subtypen vor. Symptome wie Hohlfüße oder olfaktorische Defizite sind im Untersuchungsbericht der Patientin nicht beschrieben. Bedingt durch die klinischen Symptome der Patientin gelingt keine eindeutige Zuordnung zum Krankheitsbild einer SCA 38, umgekehrt

lassen sich die beschriebenen Symptome mit einer SCA 38 vereinbaren. Abweichungen des Phänotyps bei Patientin 1017 lassen sich außerdem durch den veränderten Pathomechanismus (s. 4.3) erklären. Es ist bereits bekannt, dass es aufgrund der klinisch-neurologischen Untersuchung bis auf wenige Ausnahmen unmöglich ist, vom Phänotyp eines Ataxie-Patienten auf den Locus zu schließen (Bird 2016).

In der Untersuchung von Di Gregorio und Kollegen zeigten alle betroffenen Patienten, mit den Mutationen (c.689G>T und c.214C>G) einen ähnlichen Phänotyp. Auch die von Borroni und Kollegen untersuchten Patienten, die alle die Mutation c.689G>T aufwiesen, zeigten ähnliche Symptome. Eventuell sind die bei den Patienten mit der Mutation c.689G>T aufgefallenen Hohlfüße und olfaktorischen Defizite ein Hinweis auf einen Unterschied im Phänotyp bei bestehenden unterschiedlichen Genotypen. Insgesamt können jedoch bisher keine spezifischen Genotyp-Phänotyp-Beobachtungen gemacht werden.

4.5 Empfehlung zur molekulargenetischen Testung

Die Genetik spielt eine signifikante Rolle in der Ätiologie der Ataxien. Daher sind eine detaillierte Familienanamnese, eine Erhebung eines Stammbaums und die Ableitung des Erbganges immer erforderlich.

Zur Durchführung genetischer Diagnostik, auch für bisher nicht therapierbare Erkrankungen, gibt es einige bedeutende Gründe, die Hacke wie folgt zusammenfasst:

„Neben der unmittelbaren Bedeutung für die Diagnosestellung kommt der genetischen Diagnostik auch eine Rolle in der humangenetischen Beratung zu (z.B. Frage nach dem Wiederholungsrisiko im Rahmen der Familienplanung). Genetische Befunde können ferner eine Einschätzung des typischen Verlaufs und der Prognose von Erkrankungen ermöglichen und so das Krankheitsmanagement beeinflussen. [...] Eine molekulargenetisch gesicherte Diagnose kann umfangreiche, wiederholte und zum Teil invasive Diagnostik unnötig machen und damit die diagnostische Belastung der betroffenen Patienten verringern. Nicht zu unterschätzen ist oft auch die psychologische Entlastung, die sich durch eine konkret benennbare Diagnose ergibt, gerade im Falle seltener Erkrankungen.“ (Hacke 2016, S. 945).

Wenn ein autosomal-dominanter Erbgang aufgrund der Familienanamnese vermutet werden kann, sollte bei der molekulargenetischen SCA-Testung mit den häufig vorkommenden Repeat-Expansionsloci wie SCA 1, 2, 3, 6, 7, und 17 begonnen

werden, da sie 50-60 % der dominant-vererbten Ataxieformen umfassen und mit hoher Spezifität erfasst werden können. Sollte die Untersuchung nicht zu einer Diagnose führen, können im nächsten Schritt die weniger häufig vorkommenden Repeat-Expansionsloci wie SCA 8, 10 und 12, sowie ein Screening auf große Deletionen (SCA 15/16) erfolgen. Damit werden bereits ca. 75% der auftretenden SCA-Erkrankungen abgedeckt. Sollte auch nach dieser erweiterten Diagnostik keine Mutation identifiziert worden sein, so bieten sich Tests auf die in Deutschland selteneren Subtypen wie SCA 5, 14, 15, 17 und 28 an. Da diese durch Punktmutationen verursacht werden, ist der Arbeits- und Kostenaufwand deutlich höher. Daher werden die Einzelgen-Testungen, zu denen auch *ELOVL5* (SCA 38) gehören sollte, zunehmend durch neue DNA-Sequenzier-Technologien und den Einsatz von Genpaneelen verdrängt. Aktuelle, kommerziell zugängliche genetische Testpaneele beinhalten die häufigsten (SCA 1, 2, 3, 6 und 7) und einige weniger häufige (SCA 5, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 17) SCAs. Für diese Paneele wird das Next-Generation-Sequencing (NGS) genutzt, in dem wiederum Polyglutamin-Verlängerungen nicht gut dargestellt werden können. Während ein positiver Gentest für eine spezifische SCA die Diagnose etabliert, schließt ein komplett „negatives“ SCA-Gentest-Paneel keine hereditäre Ataxie aus. Daher ist die alleinige Verwendung von Paneelen zur SCA-Diagnostik nicht sinnvoll (Paulson 2009; Bird 2016).

Genetische Diagnostik gefährdeter, asymptomatischer erwachsener Verwandter von Index-Patienten, die von autosomal-dominanter cerebellärer Ataxie betroffen sind, ist in erster Linie sinnvoll, wenn die krankheitsauslösende Mutation bei dem Index-Patienten bereits identifiziert wurde und somit eine gezielte Kontrolle bei Angehörigen ermöglicht. Eine prädiktive Testung ist nicht dafür geeignet, das Alter bei Krankheitsbeginn, die Schwere der Erkrankung, die Symptome oder den Verlauf vorherzusagen.

Eine genetische Untersuchung asymptomatischer Kinder ist nicht angemessen. Die Vorhersage einer Erkrankung, die erst im Erwachsenenalter ausbricht und für die es keine Behandlungsmöglichkeiten gibt, hat keinen Nutzen. Die wesentlichen Argumente, die gegen eine Gen-Testung vor dem 18. Lebensjahr sprechen, sind: Erstens die Verhinderung der eigenen Entscheidung, ob das Kind eine Vorhersage möchte, zweitens die mögliche Stigmatisierung innerhalb der Familie oder anderen sozialen Umgebungen und drittens die folgenschweren Auswirkungen auf Bildungsweg und Berufskarriere. Im Gegensatz dazu profitieren Kinder, die bereits symptomatisch sind, meist von einer spezifischen Diagnose (Matilla-Dueñas 2012).

4.6 Ausblick

4.6.1 SCA-Diagnostik

Die Entdeckung von verschiedenen SCA-Genen und die daraus folgende Möglichkeit prädiktiver Testung erlaubt die Etablierung einer genetischen Diagnose Jahre bevor die Ataxiesymptome auftreten. Im präklinischen Stadium spinocerebellärer Ataxien sind bereits detektierbare Veränderungen im zentralen und peripheren Nervensystem zu sehen, die in einer gründlichen klinischen Untersuchung durch subtile Anomalitäten auffallen. Diese Veränderungen können für eine lange Zeit kompensiert werden. Die Erfassung dieses Erkrankungsstadiums ist von besonderer Bedeutung, da so der optimale Zeitpunkt für therapeutische Interventionen ermittelt werden könnte (Maas et al. 2015).

Neue DNA-Sequenzierungstechnologien ermöglichen es, das gesamte oder große Zielbereiche des Genoms in kurzer Zeit und bezahlbar zu untersuchen (Sailer und Houlden 2012). Es wäre also denkbar, künftig das Exom von Ataxie-Patienten zu analysieren, wenn die Analyse der häufigen Trinukleotid-Loci nicht zielführend war. So könnten nicht nur Mutationen in seltenen Ataxie-Genen aufgespürt werden, sondern auch neue Ataxie-Loci identifiziert werden. Es gilt jedoch auch hier die ethischen Probleme genetischer Diagnostik zu bedenken. Beispielsweise finden sich Zufallsbefunde bei Exomsequenzierungen deutlich häufiger als bei konventionellen Einzelgen-Sequenzierungen.

4.6.2 SCA-Therapie

Wie andere Kleinhirnerkrankungen sind SCAs neurologische Erkrankungen, für die bisher keine effektiven und selektiven pharmakologischen Behandlungen verfügbar sind. Mit wenigen Ausnahmen, wie der Vitamin-E-Mangel-Ataxie, gibt es keine heilende Therapie und die Behandlung ist primär symptomatisch.

Dennoch gibt es einige positive Effekte auf ataktische und nicht-ataktische Symptome durch therapeutische Interventionen. Einige SCAs zeigen klinische Merkmale wie Dystonie, Parkinsonismus, Spastik, Harndrang, Schlafstörungen, Erschöpfung und Depression, die gut auf eine symptomatische medizinische Behandlung ansprechen. Die Behandlung der klinischen Kernmerkmale der Ataxie ist überwiegend rehabilitativ. Der Nutzen einer guten Physiotherapie übersteigt derzeit jede medikamentöse Therapie.

Eine vielversprechende Strategie für die Entwicklung von Therapien ist die Auswahl eines geeigneten Medikamentenziels, basierend auf dem Verständnis der molekularen

Mechanismen, die zu Ataxie führen. Diese Herangehensweise wird durch die Kenntnis der Gen-Mutationen, die häufige hereditäre Ataxien verursachen, erleichtert. Aufgrund der zentralen Rolle der Proteinaggregation in der Pathogenese vieler SCAs, könnte die Suche nach Anti-Aggregation eine Therapieoption für alle Polyglutamin-Erkrankungen sein.

Trinukleotidexpansionen führen zu einer veränderten RNA-Struktur, die wiederum Störungen der Proteinfunktionen zur Folge hat. Dieser „toxic-gain-of-function“ auf RNA-Ebene ist auch ein Erklärungsansatz für die Pathogenität von Repeats in nicht-codierenden Genabschnitten (Galka-Marciniak et al. 2012). Saunders und Kollegen erläutern, dass die Proteinaggregation auch durch die flankierenden Sequenzen der Polyglutaminbereiche beeinflusst wird (Saunders und Bottomley 2009). Richard eröffnet eine Möglichkeit der Gen-Therapie, die unter anderem für die Polyglutamin-Ataxien in Frage kommen könnte. Hoch spezifische Endonukleasen könnten die Trinukleotid-Expansionen auf nicht pathologische Länge verkürzen (Richard 2015).

Eine Möglichkeit der gezielten Genmodifikation durch RNA-Interferenz oder Antisense-Oligonukleotide, die mutierte Gene abschalten können, ist zwar präzise, aber schwierig umzusetzen (Bushart et al. 2016). So postulieren auch Bushart und Kollegen, dass die Behandlung spinocerebellärer Ataxien auf gemeinsamen Mechanismen der Krankheiten basieren sollte. Die Gemeinsamkeiten der neuronalen Dysfunktion wie gestörte Proteinhomöostase, RNA-Toxizität, veränderte synaptische Signale, abweichendes intrazelluläres Calcium und veränderte Erregbarkeit der Purkinjezellmembranen sollten Ziel der Therapie sein (Bushart et al. 2016).

Wie erwähnt sind die frühen Phasen der Neurodegeneration durch neuronale Dysfunktion charakterisiert, während ein gestörter neuronaler Zellmetabolismus sowie der Zelltod erst später im Krankheitsverlauf auftreten. Eine frühe Beeinflussung der neuronalen Dysfunktion könnte daher nicht nur zeitweise die Symptome verbessern, sondern auch einen längerfristig krankheitsmodifizierenden Effekt haben. Fortschritte der Diagnostik in präsymptomatischen Stadien werden den Nutzen der Therapie steigern.

Eine alternative Herangehensweise sind Behandlungen, die darauf abzielen, die gestörte neuronale Aktivität im Kleinhirn zu normalisieren und dabei einen symptomatischen, antiataktischen Effekt auszuüben. Diese Behandlungsweise hat den Vorteil, dass sie nicht auf eine einzelne Ataxie-Erkrankung limitiert ist, sondern für eine größere Gruppe von Ataxien von Nutzen sein könnte, die gemeinsame Mechanismen

wie Purkinjezell-Dysfunktion teilen (Klockgether und Paulson 2011; do Carmo Costa und Paulson 2013; Bushart et al. 2016).

Die Möglichkeit der gezielten Genmodifikation als Therapieoption besteht nur für Ataxien, deren spezifische Mutationen bekannt sind, wie im Fall der SCA 38. Hier könnten Inhibitoren für bestimmte ELOVLs für das Gewinnen weiterer Erkenntnisse oder sogar für die Behandlung verschiedener Pathologien, an denen VLCFAs beteiligt sind, nützlich sein (Ohno et al. 2010).

5 Zusammenfassung

5.1 Zusammenfassung

Die Spinocerebelläre Ataxie 38 (SCA 38) gehört zu den autosomal-dominant vererbten neurodegenerativen Erkrankungen. Krankheitsursache sind Mutationen im *ELOVL5*-Gen, das für eine Fettsäure-Elongase codiert. Ein Funktionsausfall dieser Elongase führt zu einer verminderten Produktion bestimmter Fettsäuren, die wichtig für die Gehirnfunktion sind. Eine Störung dieser Fettsäurehomöostase hat neuronale Degeneration (v.a. der Purkinjezellen) zur Folge.

Leitsymptom der SCA 38 ist eine langsam progrediente Gangataxie begleitet von einem Nystagmus. Zusätzlich zu den Leitsymptomen können weitere klinische Merkmale wie Hohlfüße, olfaktorische Defizite, Dysarthrie, Dysphagie oder Ophthalmoparesen auftreten. Das Auftreten der ersten Symptome beginnt etwa um das 40. Lebensjahr.

Bisher sind zwei verschiedene Missense-Mutationen bekannt, die eine SCA 38 verursachen. Eine befindet sich in Exon 3 (c.214C>G), die andere in Exon 7 (c.689G>T) des *ELOVL5*-Gens (Transkriptvariante: ENST00000304434.10). Beide Mutationen liegen im Bereich von Transmembran-Domänen und verändern so an einer wichtigen Stelle die Struktur des Proteinproduktes.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 48 vorselektionierte Ataxie-Patienten deutscher Herkunft auf Mutationen im *ELOVL5*-Gen untersucht. Zum Nachweis von Sequenzveränderungen wurden die acht codierenden Exons, sowie die angrenzenden intronischen Bereiche des *ELOVL5*-Gens mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert.

Insgesamt wurden 14 verschiedene Sequenzvarianten nachgewiesen. Darunter konnte eine seltene Variante (c.304C>T; p.Q102*) in Exon 4 des *ELOVL5*-Gens (Transkriptvariante: ENST00000370918.8) identifiziert werden, die möglicherweise krankheitsverursachend wirkt. Für einen pathogenen Effekt spricht die Generierung eines Stoppcodons, das zu einem Abbruch der Translation führt. Alternativ könnte ein Abbau der mRNA mit dem artefiziellen Stoppcodon über „nonsense-mediated-decay“ zu einem Mangel an aktiver Fettsäure-Elongase führen. Da vom *ELOVL5*-Gen jedoch mehrere funktionelle Transkripte gebildet werden, die nicht alle das Exon 4 enthalten, ist eine finale Aussage zur Bedeutung der neuen Variante schwierig. Dennoch belegt die gefundene Variante, dass *ELOVL5*-Mutationen als Krankheitsursache bei

deutschen Ataxie-Patienten in Betracht kommen. Daher sollte eine Testung auf SCA 38 im Rahmen einer Stufendiagnostik angeboten werden.

5.2 Summary

Spinocerebellar ataxia 38 (SCA 38) belongs to the hereditary autosomal-dominant neurodegenerative disorders. It is caused by mutations in the *ELOVL5*-gene, which is coding for a fatty acid elongase. A loss of function of this elongase leads to a reduced production of certain fatty acids which are important for the brainfunction. A disturbance of this fatty acid homeostasis results in neuronal degeneration (esp. of the purkinje cells).

The cardinal symptom of SCA 38 is a slowly progressive gait ataxia accompanied by a nystagmus. In addition to the guiding symptoms, further clinical attributes such as high arch feet, olfactory deficits, dysarthria, dysphagia or ophthalmoparesis can occur. The appearance of the first symptoms begins around the age of 40.

To date, two different missense mutations are known that cause SCA 38. One is found in exon 3 (c.214C>G), the other one in exon 7 (c.689G>T) of the *ELOVL5*-gene (transcript variant: ENST00000304434.10). Both mutations are located in the region of transmembrane domains and thus alter the structure of the protein product at an important point.

In this study, 48 preselected ataxia patients of German origin were examined for mutations in the *ELOVL5*-gene. For the detection of sequence variants, the eight coding exons as well as the adjoining intronic regions of the *ELOVL5*-gene were amplified by PCR and then sequenced.

A total of 14 different sequence variants were detected. Among them, a rare variant (c.304C>T; p.Q102*) was identified in exon 4 of the *ELOVL5*-gene (transcript variant: ENST00000370918.8), which could possibly cause disease. The generation of a stopcodon leads to a termination of the translation, which may be indicative for a pathogenic effect. Alternatively, degradation of the mRNA comprising the artificial stopcodon via nonsense-mediated-decay could lead to a deficiency of active fatty acid elongase. As the *ELOVL5*-gene enables the formation of several functional transcripts, not all of which contain exon 4, a final statement on the significance of the new variant is difficult. Nevertheless, the found variant demonstrates that *ELOVL5* mutations have to be considered as a potential cause of disease in German ataxia patients. Therefore, an SCA 38 test should be offered within the stage diagnosis.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADCA	autosomal-dominante cerebelläre Ataxien
AHS	Arm-Halteversuch
AOA	Ataxien mit okulomotorischer Apraxie
ARCA	autosomal-rezessive cerebelläre Ataxien
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BHV	Bein-Halteversuch
bp	Basenpaare
BRN	Blickrichtungsnystagmus
°C	Grad Celsius
cDNA	codierende DNA
cMRT	craniale Magnetresonanztomographie
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleotide
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DHA	Docosahexaensäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
DRPLA	dentatorubral pallidolysian atrophy
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EA	episodische Ataxien
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKV	Erythrokeratoderma variabilis
ELOVL5	elongation of very long chain fatty acids protein 5

ER	endoplasmatisches Retikulum
FA	Friedreich-Ataxie
FDG-PET	Fluordeoxyglukose-Positronenemissionstomographie
FNV	Finger-Nase-Versuch
F-Primer	forward-Primer
FXS	Fragiles-X-Syndrom
FXTAS	Fragiles-X-Tremor-Ataxie-Syndrom
H ₂ O	Wasser
HWS-MRT	Halswirbelsäulen-Magnetresonanztomographie
kb	kilobasen
KHV	Knie-Hacke-Versuch
M.	Morbus
mA	Milliampere
MAF	minor allele frequency
MELAS	mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like-episodes
MER	Muskeleigenreflexe
MERRF	myoklonus epilepsy with ragged-red fibres
µg	Mikrogramm
min	Minute
MJD	Machado-Joseph disease (=SCA 3)
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimolar
MNGIE	mitochondrial neurogastrointestinal encephalopathy
MRI	Magnetic Resonance Imaging
mRNA	messenger-RNA
MSA	Multisystematrophie
N.	Nervus
NARP	neuropathy, ataxia and retinitis pigmentosa

Ncl.	Nucleus
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
pmol	picomol
PUFA	poly unsaturated fatty acid
py	pack years
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
R-Primer	reverse-Primer
s	Sekunde
s.	siehe
SARA	Scale for the Assessment and Rating of Ataxia
SCA	spinocerebelläre Ataxie
SNP	single nucleotide polymorphism
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
UTR	untranslatierte Region
UV	ultra violett
VLCFA	very long chain fatty acid
VOR	vestibulo-okkulärer-Reflex
VZV	Varizella-Zoster Virus
ZNS	zentrales Nervensystem
*	Terminationscodon

6.1 Buchstabencode für Aminosäuren

<i>Aminosäure:</i>	<i>Dreibuchstabencode:</i>	<i>Einbuchstabencode:</i>
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

6.2 IUPAC Nomenklatur für Basen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T (oder U)	Thymin (oder Uracil)
R	A oder G
Y	C oder T
S	G oder C
W	A oder T
K	G oder T
M	A oder C
B	C oder G oder T
D	A oder G oder T
H	A oder C oder T
V	A oder C oder G
N	beliebige Base
. oder -	Leerstelle

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Originalfotographie eines Friedreich-Fußes, aufgenommen 1903 in Heidelberg (Hacke 2016, S.639).....	5
Abbildung 1.2: Die verschiedenen Transkriptvarianten des <i>ELOVL5</i> -Gens (http://www.ensembl.org).....	15
Abbildung 1.3: <i>ELOVL5</i> -Gen (http://www.ensembl.org).....	15
Abbildung 1.4: mRNA-Expression des <i>ELOVL5</i> -Gens in verschiedenen Geweben (Di Gregorio et al. 2014).....	16
Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der PCR nach (Müller und Prange 2016)...	26
Abbildung 2.2: Beispiel-Foto einer Gelauswertung. 5 Patientenproben, Exon 3 und Größenstandard.....	29
Abbildung 2.3: Beispielsequenz, Ausschnitt aus <i>ELOVL5</i> Exon 6; Patient 453.....	32
Abbildung 3.1: Sequenzausschnitt des Intron 1 des <i>ELOVL5</i> -Gens, A : Sequenzvariante c.-56 C>G, heterozygot (Probe 1010), B : Wildtyp, homozygot (Probe 1023).....	35
Abbildung 3.2: Sequenzausschnitt aus Intron 2 des <i>ELOVL5</i> -Gens, A : Sequenzvariante c.58+57 C>A, homozygot (Probe 642), B : Sequenzvariante c.58+57 C>A, heterozygot (Probe 749), C : Wildtyp, homozygot (Probe 431).....	36
Abbildung 3.3: Ausschnitt aus der Sequenz des Exon 4 des <i>ELOVL5</i> -Gens, Sequenzvariante c.304 C>T, heterozygot (Probe 1017), oberer Sequenzausschnitt: eigene Sequenz, unterer Sequenzausschnitt: Kommerzielle Bestätigungssequenzierung.....	37
Abbildung 3.4: Sequenzausschnitte der gekoppelt auftretenden Varianten c.247-18 T>C (Intron 3) und c.327+18 C>T (Intron 4) des <i>ELOVL5</i> -Gens, A : Wildtyp, homozygot (Probe 1006), B : heterozygot für beide Sequenzvarianten (Probe 1008), C : homozygot für beide Sequenzvarianten (Probe 1010).....	38

Abbildung 3.5: Sequenzausschnitt aus Intron 4 des <i>ELOVL5</i> -Gens, A : Sequenzvariante c. 327+94 C>A, heterozygot (Probe 788), B : Wildtypsequenz, homozygot (Probe 797).....	39
Abbildung 3.6: Sequenzausschnitt des Intron 4 des <i>ELOVL5</i> -Gens, A : heterozygote Variante c.327+90 C>A (Probe 904), B : Wildtyp, homozygot (Probe 431).....	39
Abbildung 3.7: Sequenzausschnitt aus Intron 5 des <i>ELOVL5</i> -Gens , A : Wildtyp-Sequenz, homozygot (Probe 597), B : Variante c.405+49 A>T, heterozygot (Probe 636), C : Variante c.405+49 A>T, homozygot (Probe 642).....	40
Abbildung 3.8:Sequenzausschnitt aus Intron 5 des <i>ELOVL5</i> -Gens, A : Wildtyp-Sequenz, homozygot (Probe 983), B : Sequenzvariante c.405+109 T>G, heterozygot (Probe 1002).....	41
Abbildung 3.9: Poly-T-Bereich in Intron 6 des <i>ELOVL5</i> -Gens (Probe 968).....	42
Abbildung 3.10: Sequenzausschnitt Intron 7 des <i>ELOVL5</i> -Gens, A : Wildtyp, homozygot (Probe 636), B : Sequenzvariante c.703-12C>T, heterozygot (Probe 642).....	42
Abbildung 3.11: Überblick über einen Sequenzausschnitt des Intron 8 des <i>ELOVL5</i> -Gens, Variante c.838-37_838-36insCTGT (Proben: 904, 642, 654 und 723).....	43
Abbildung 3.12: Sequenzausschnitt aus Intron 8 des <i>ELOVL5</i> -Gens, A : Variante c.838-37_838-36insCTGT, homozygot (Probe 1119), B : Variante c.838-37_838-36insCTGT, heterozygot (Probe 1120).....	44
Abbildung 3.13: Sequenzausschnitt Intron 8 des <i>ELOVL5</i> -Gens, A : Variante c.838-97_838-96insAAAAG, homozygot (Probe 642), B : Variante c.838-97_838-96insAAAAG, heterozygot (Probe 723).....	45
Abbildung 3.14: Sequenzausschnitt aus dem codierenden Teil des Exon 9 des <i>ELOVL5</i> -Gens, A : Variante c.942 G>T p.Leu314Leu, heterozygot (Probe 968), B : Wildtyp, homozygot (Probe 431).....	46

Abbildung 3.15: Sequenzausschnitt des nicht-codierenden Abschnitts von Exon 9 des *ELOVL5*-Gens, **A**: Wildtyp, homozygot (Probe 654), **B**: Sequenzvariante 18.8:c.*77 A>G, heterozygot (Probe 723).....**46**

Abbildung 4.1: Evolutionäre Konservierung der von den bekannten Mutationen betroffenen Aminosäuren (Di Gregorio et al. 2014).....**52**

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Genetik der spinocerebellären Ataxien.....	12
Tabelle 2.1: Geräte und Verbrauchsartikel.....	20
Tabelle 2.2: Chemikalien.....	21
Tabelle 2.3: Puffer und Lösungen.....	21
Tabelle 2.4: Enzyme.....	22
Tabelle 2.5: Kits.....	22
Tabelle 2.6: Oligonukleotid-Primer.....	22
Tabelle 2.7: Software-Programme.....	23
Tabelle 2.8: Datenbanken und Online-Programme.....	23
Tabelle 2.9: Pipettierschema für den Mastermix für 5 DNA-Proben.....	27
Tabelle 2.10: PCR-Bedingungen.....	28
Tabelle 2.11: Annealingtemperaturen.....	28
Tabelle 2.12: Größe der PCR-Produkte in Basenpaaren.....	28
Tabelle 2.13: Für die Sequenzierungen verwendete F- und R-Primer.....	32
Tabelle 2.14: Bestandteile des Sequenzieransatzes.....	32
Tabelle 2.15: Bedingungen der verschiedenen PCR-Schritte.....	33
Tabelle 3.1: Liste aller gefundenen Sequenzvarianten.....	47

8 Literaturverzeichnis

8.1 Publikationen

Agbaga, M. P. (2016). Different Mutations in *ELOVL4* Affect Very Long Chain Fatty Acid Biosynthesis to Cause Variable Neurological Disorders in Humans. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **854**, 129-135.

Bender, A., Rémi, J., Feddersen, B., Fesl, G., Birnbaum, T. (2015). Kurzlehrbuch Neurologie. 2. Aufl., 265f. Elsevier Urban & Fischer, München.

Berlit, P. (2014). Basiswissen Neurologie. Mit 61 Tabellen. 6., überarb. und erw. Aufl., 269-272. Springer Verlag, Berlin.

Bird, T. D. (2015). Hereditary Ataxia Overview. *GeneReviews*, 1993-2017. Table 1. [Autosomal Dominant Cerebellar Ataxias: Molecular Genetics & Clinical Features]. University of Washington, Seattle.

Bird, T. D. (2016): Hereditary Ataxia Overview. *GeneReviews*, 1993-2017 University of Washington, Seattle.

Bonello, M. und Ray, P. (2016). A Case of Ataxia with Isolated Vitamin E Deficiency Initially Diagnosed as Friedreich's Ataxia. *Case Reports in Neurological Medicine*, 1–3.

Borroni, B., Di Gregorio, E., Orsi, L., Vaula, G., Costanzi, C., Tempia, F. et al. (2016). Clinical and neuroradiological features of spinocerebellar ataxia 38 (SCA38). *Parkinsonism & Related Disorders* **28**, 80 - 86.

Buselmaier, W. und Tariverdian, G. (2007): Humangenetik. 4., neu bearbeitete Auflage. 71-75. Springer Medizin Verlag, Heidelberg.

Bushart, D. D., Murphy, G. G. und Shakkottai, V. G. (2016): Precision medicine in spinocerebellar ataxias: treatment based on common mechanisms of disease. *Annals of Translational Medicine*, 2016 Januar; **4(2)**, 25. *Toward Precision Medicine in Neurological Diseases*.

Cadieux-Dion M., Turcotte-Gauthier M., Noreau A., Martin C., Meloche C., Gravel M., Drouin C. A., Rouleau G. A., Nguyen D. K. und Cossette P. (2014). Expanding the clinical phenotype associated with *ELOVL4* mutation: study of a large French-Canadian family with autosomal dominant spinocerebellar ataxia and erythrokeratodermia. *JAMA Neurologie*, 2014 April; **71(4)**, 470-475.

Costa Mdo C., Paulson H. L. (2012). Toward understanding Machado Joseph disease. *Progress in Neurobiology*; **97**, 239-257.

Cvetanovic, M., Kular, R. K. und Opal, P. (2012): LANP mediates neuritic pathology in Spinocerebellar ataxia type 1. *Neurobiology of disease* **48 (3)**, 526–532.

Di Bella, D., Lazzaro, F., Brusco, A., Plumari, M., Battaglia, G., Pastore, A. et al. (2010). Mutations in the mitochondrial protease gene AFG3L2 cause dominant hereditary ataxia SCA28. *Nature Genetics* **42 (4)**, 313–321.

Di Gregorio, E., Borroni, B., Giorgio, E., Lacerenza, D., Ferrero, M., Lo Buono, N. et al. (2014). ELOVL5 mutations cause spinocerebellar ataxia 38. *American journal of human genetics* **95 (2)**, 209–217.

do Carmo Costa, M. und Paulson, H. L. (2013). New hope for therapy in neurodegenerative diseases. *Cell Research* **23 (10)**, 1159–1160.

Galka-Marciniak, P., Urbanek, M. O. und Krzyzosiak, W. J. (2012): Triplet repeats in transcripts: structural insights into RNA toxicity. *Biological chemistry* **393 (11)**, 1299–1315.

Gan, S.-R., Ni, W., Dong, Y., Wang, N., Wu, Z.-Y. und Li, X.-J. (2015): Population Genetics and New Insight into Range of CAG Repeats of Spinocerebellar Ataxia Type 3 in the Han Chinese Population. *PLoS ONE* **10 (8)**, S. e0134405.

Gleixner, C., Müller, M. und Wirth, S.-B. (2009): Neurologie und Psychiatrie - 2009/10. Für Studium und Praxis ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges und der mündlichen Examina in den Ärztlichen Prüfungen. 7. Aufl., 219. Med. Verl. - und Informationsdienste, Breisach am Rhein.

Hacke, W. (Hg.) (2016): Neurologie. Unter Mitarbeit von Poeck K., Wick W., Schwab S., Ringleb P. und Bendszus M. Springer-Verlag GmbH. 14., überarbeitete Auflage, 626-641 und 942-954. Springer Verlag, Berlin.

Harding, A. E. (1982): The clinical features and classification of the late onset autosomal dominant cerebellar ataxias. *Brain* **105 (1)**, 1–28.

Harenberg, L. G. (2015): Die Bedeutung der Spinocerebellären Ataxie Typ 23 (SCA23) für Ataxie-Patienten aus Deutschland : Screening auf Mutationen im Prodynorphin-Gen (PDYN), 5f.

- Hersheson, J., Haworth, A. und Houlden, H. (2012): The inherited ataxias. Genetic heterogeneity, mutation databases, and future directions in research and clinical diagnostics. *Human Mutation* **33 (9)**, 1324–1332.
- Hufschmidt, A., Lücking, C. H. und Rauer, S. (Hg.) (2009): Neurologie compact. LEHR-Programm gemäß §14 JuSchG. 5. Aufl. Stuttgart: 273-279 Thieme.
- Hull, J., Shackleton, S. und Harris, A. (1993): Abnormal mRNA splicing resulting from three different mutations in the CFTR gene. *Human molecular genetics* **2 (6)**, 689–692.
- Jacobi, H., Minnerop, M. und Klockgether, T. (2013): Genetik der spinocerebellären Ataxien. *Nervenarzt* **84 (2)**, 137–142.
- Jansohn, M. und Rothhämel, S. (2012): Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. 5. Auflage, 68, 589-591 und 611. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Jayadev, S. und Bird, T. D. (2013): Hereditary ataxias. Overview. *Genetics in Medicine* **15 (9)**, 673–683.
- Kim, B.-R., Lim, J.-H., Lee, S. A., Park, S., Koh, S.-E., Lee, I.-S. et al. (2011): Usefulness of the Scale for the Assessment and Rating of Ataxia (SARA) in Ataxic Stroke Patients. *Annals of Rehabilitation Medicine* **35 (6)**, 772.
- Kim, J. S. und Cho, J. W. (2015): Hereditary Cerebellar Ataxias. A Korean Perspective. *Journal of Molecular Diagnostics* **8 (2)**, 67–75.
- Klockgether, T. und Paulson, H. (2011): Milestones in ataxia. *Movement Disorders* **26 (6)**, 1134–1141.
- Koeppen, A. H. (2005): The pathogenesis of spinocerebellar ataxia. *Cerebellum (London, England)* **4 (1)**, 62–73.
- Lamprakos, C., Stocker, A. und Cascella, M. (2015): Mechanisms of recognition and binding of α -TTP to the plasma membrane by multi-scale molecular dynamics simulations. *Frontiers in Molecular Biosciences* **2**, 36.
- Leonard, A. E., Bobik, E. G., Dorado, J., Kroeger, P. E., Chuang, L. T., Thurmond, J. M. et al. (2000): Cloning of a human cDNA encoding a novel enzyme involved in the elongation of long-chain polyunsaturated fatty acids. *The Biochemical journal* **350(3)**, 765–770.

- Liang, L., Chen, T. und Wu, Y. (2016): The electrophysiology of spinocerebellar ataxias. *Neurophysiologie Clinique/Clinical Neurophysiology* **46(1)**, 27-34.
- Lim, J., Hao, T., Shaw, C., Patel, A. J., Szabo, G., Rual, J.-F. et al. (2006): A protein-protein interaction network for human inherited ataxias and disorders of Purkinje cell degeneration. *Cell* **125 (4)**, 801–814.
- Liu, Z., Zeng, S., Zeng, J., Zhou, Y., Zeng, X., Jiang, H. et al. (2015): SCA38 is rare in mainland China. *Journal of the Neurological Sciences* **358 (1-2)**, 333–334.
- Lu, C. S., Chang, H. C., Kuo, P. C., Liu, Y. L., Wu, W. S., Weng, Y. H. et al. (2004): The parkinsonian phenotype of spinocerebellar ataxia type 3 in a Taiwanese family. *Parkinsonism & related disorders* **10 (6)**, 369–373.
- Maas, R. P. P. W. M., van Gaalen, J., Klockgether, T. und van de Warrenburg, B. P. C. (2015): The preclinical stage of spinocerebellar ataxias. *Neurology* **85 (1)**, 96–103.
- Manto, M. und Marmolino, D. (2009): Cerebellar ataxias. *Current Opinion in Neurology* **22 (4)**, 419–429.
- Matilla-Dueñas, A. (2006): Molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxias. *Brain* **129 (6)**, 1357–1370.
- Matilla-Dueñas, A. (2012): The Ever Expanding Spinocerebellar Ataxias. Editorial. *Cerebellum* **11 (4)**, 821–827.
- Mattle, H. und Mumenthaler, M. (2011): Kurzlehrbuch Neurologie. 119 Tabellen. 3., vollst. überarb. Aufl., 190-192. Stuttgart: Thieme.
- Mülhardt, C. (2013): Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics. 7., aktualisierte Auflage, 36,58-61 und 184-189. Springer Verlag, Berlin.
- Müller, H.-J. und Prange, D. R. (2016): PCR - Polymerase-Kettenreaktion. 2. Aufl. 2-6. Springer Verlag, Berlin.
- Nolte, D. und Müller, U. (2006): Punktmutationen und Deletionen bei spinocerebellären Ataxien. *Neuroforum* **4**, 260-265.
- Ohno, Y., Suto, S., Yamanaka, M., Mizutani, Y., Mitsutake, S., Igarashi, Y. et al. (2010): ELOVL1 production of C24 acyl-CoAs is linked to C24 sphingolipid synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107 (43)**, 18439–18444.

Paulson, H. (2015): Spinocerebellar Ataxia Type 3. *GeneReviews*, 1993-2017. University of Washington, Seattle.

Paulson, H. L. (2009): The Spinocerebellar Ataxias. *Journal of Neuro-Ophthalmology* **29 (3)**, 227–237.

Pschyrembel, W. und Arnold, U. (Hg.) (2014): Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. 266., aktualisierte Aufl., 72. Berlin: de Gruyter.

Punzet, R. (2013): ^{99m}Tc-HYNIC-DAPI-DNA-Bindungsnachweis und Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen durch ^{99m}Tc-HYNIC-DAPI mittels Agarose-Gelelektrophorese, 8f.

Richard, G.-F. (2015): Shortening trinucleotide repeats using highly specific endonucleases: a possible approach to gene therapy? *Trends in genetics* **31 (4)**, 177–186.

Riess, O., Schmidt, T. und Schöls, L. (2001): Autosomal dominant vererbte spinocerebelläre Ataxien. Klinik, Genetik und Pathogenese. *Deutsches Ärzteblatt* **98(23)**, 1546-1558.

Rudenskaia, G. E., Kurkina, M. V. und Zakharova, E. (2012): Ataxia with oculomotor apraxia: clinical-genetic characteristics and DNA-diagnostic. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova* **112 (10)**, 58–63.

Sailer, A. und Houlden, H. (2012): Recent Advances in the Genetics of Cerebellar Ataxias. *Current Neurology and Neuroscience Reports* **12 (3)**, 227–236.

Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **74(12)**, 5463-5467.

Saunders, H. M. und Bottomley, S. P. (2009): Multi-domain misfolding: understanding the aggregation pathway of polyglutamine proteins. *Protein engineering, design & selection* **22 (8)**, 447–451.

Schaaf, C. P. und Zschocke, J. (2013): Basiswissen Humangenetik. 2., überarbeitete Auflage, 31-50. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; Imprint; Springer (Springer-Lehrbuch).

Schmitz-Hubsch, T., Du Montcel, S. T., Baliko, L., Berciano, J., Boesch, S., Depondt, C. et al. (2006): Scale for the assessment and rating of ataxia: development of a new clinical scale. *Neurology* **66 (11)**, 1717–1720.

Shakkottai, V. G. und Fogel, B. L. (2013). Clinical Neurogenetics. *Neurologic Clinics* **31 (4)**, 987–1007.

Shikama A., Shinozaki H., Takeuchi Y., Matsuzaka T., Aita Y., Murayama T., Sawada Y., Piao X., Toya N., Oya Y., Takarada A., Masuda Y., Nishi M., Kubota M., Izumida Y., Nakagawa Y., Iwasaki H., Kobayashi K., Yatoh S., Suzuki H., Yagyu H., Kawakami Y., Yamada N., Shimano H., Yahagi N. (2015) Identification of human ELOVL5 enhancer regions controlled by SREBP. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2 465(4)**, 857-863.

Smeets, C. J. L. M. und Verbeek, D. S. (2014). Cerebellar ataxia and functional genomics. Identifying the routes to cerebellar neurodegeneration. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1842 (10)**, 2030–2038.

Storey, E. (2014). Genetic Cerebellar Ataxias. *Seminars in Neurology* **34 (03)**, 280–292.

Whaley, N., Fujioka, S. und Wszolek, Z. K. (2011). Autosomal dominant cerebellar ataxia type I. A review of the phenotypic and genotypic characteristics. *Orphanet Journal of Rare Diseases* **6 (1)**, 33.

8.2 Internetseiten (zuletzt geprüft am 20.06.2017)

<http://www.bioinformatics.org/sms/iupac.html>

<http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR002076>

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000012660;r=6:53267398-53349179

http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProteinSummary?db=core;g=ENSG00000012660;r=6:53267398-53349179;t=ENST00000370918

<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ELOVL4>

<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ELOVL6>

<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ELOVL7>

[http://genome-euro.ucsc.edu/cgi-](http://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgGene?hgg_gene=uc011dwx.2&hgg_prot=uc011dwx.2&hgg_chrom=chr6&hgg_start=53132195&hgg_end=53213977&hgg_type=knownGene&db=hg19&hgsid=218687794_A32hw0YaJXEAFJI21sWzcJ6ufJvB)

[bin/hgGene?hgg_gene=uc011dwx.2&hgg_prot=uc011dwx.2&hgg_chrom=chr6&hgg_start=53132195&hgg_end=53213977&hgg_type=knownGene&db=hg19&hgsid=218687794_A32hw0YaJXEAFJI21sWzcJ6ufJvB](http://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgGene?hgg_gene=uc011dwx.2&hgg_prot=uc011dwx.2&hgg_chrom=chr6&hgg_start=53132195&hgg_end=53213977&hgg_type=knownGene&db=hg19&hgsid=218687794_A32hw0YaJXEAFJI21sWzcJ6ufJvB)

<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9NYP7>

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

9 Anlage

9.1 Erklärung zur Dissertation

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

Eva Helene Reith

9.2 Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Müller, Leiter des Instituts für Humangenetik, für die Bereitstellung des Laborarbeitsplatzes und der Materialien sowie für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. rer. nat. Dagmar Nolte für die Vergabe des Themas und die hervorragende Betreuung. Sie stand mir während der Erstellung der Arbeit immer mit Rat und Tat zur Seite und hatte stets ein offenes Ohr. Mit vielen wertvollen Tipps, Kommentaren und gründlichen Korrekturen hat sie mir sehr geholfen.

Auch bei den Mitarbeitern des humangenetischen Labors möchte ich mich ganz herzlich für die stete Hilfsbereitschaft bedanken. Dieser Dank gilt insbesondere Frau Sylvia Stanek für die vielen guten Ratschläge bei der Arbeit im Labor.

Vielen Dank an meine Familie und Freunde für die große Unterstützung durch Ermutigungen, Korrekturlesen und das Interesse an meiner Arbeit.