

**Spinocerebelläre Ataxie 34 (SCA34):
Suche nach Punktmutationen im Fettsäure-Elongase-4-Gen (*ELOVL4*)
bei Ataxie-Patienten**

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

vorgelegt von Birkenfeld, Annika, geb. Dietrich
aus Dillenburg

Gießen 2021

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Institut für Humangenetik

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

Gutachter: Prof. Dr. med. Bernd A. Neubauer

Tag der Disputation: 05.05.2022

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Ataxien.....	1
1.1.1 Sporadische Ataxien.....	2
1.1.2 Autosomal-dominante cerebelläre Ataxien (ADCA).....	2
1.1.3 Autosomal-rezessive cerebelläre Ataxien (ARCA)	3
1.1.4 X-Chromosomale und mitochondriale Ataxien	5
1.2 Spinocerebelläre Ataxien	6
1.2.1 Epidemiologie und Klassifikation der SCA	6
1.2.2 Klinik der SCA.....	9
1.2.3 Genetik und Pathophysiologie der SCA.....	9
1.2.4 Diagnostik und Therapie der SCA	12
1.3 Spinocerebelläre Ataxie 34	14
1.3.1 Identifikation und klinisches Bild der SCA34	14
1.3.2 Merkmale des <i>ELOVL4</i> -Gens und der Fettsäure-Elongase 4....	17
1.3.3 Weitere mit <i>ELOVL4</i> assoziierte Krankheitsbilder	19
1.3.4 Zusammenfassung der bekannten Varianten in <i>ELOVL4</i>	20
1.4 Ziele der Arbeit	21
2. Material und Methoden	22
2.1 Material	22
2.1.1 Enzyme und Chemikalien	22
2.1.2 Kits	23
2.1.3 Puffer und Lösungen	23
2.1.4 Primer	24
2.1.5 Verbrauchsmaterialien	25
2.1.6 Geräte	25
2.1.7 Software und Datenbanken	26
2.2 Methoden	27
2.2.1 Auswahl der Patienten.....	27
2.2.2 DNA-Extraktion aus Blut.....	27
2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	28
2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese	32

2.2.5	Aufreinigung der PCR-Produkte	34
2.2.5.1	Reinigungskit	34
2.2.5.2	Exo-SAP-IT Verdau.....	34
2.2.6	Sequenzierung	35
2.2.6.1	Aufreinigung der Sequenzierungsprodukte.....	37
2.2.7	Sequenzanalyse und Datenbanken	37
3.	Ergebnisse	40
3.1	Auswertung Exon 1, <i>ELOVL4</i>	41
3.2	Auswertung Exon 2, <i>ELOVL4</i>	43
3.3	Auswertung Exon 3, <i>ELOVL4</i>	43
3.4	Auswertung Exon 4, <i>ELOVL4</i>	44
3.5	Auswertung Exon 5, <i>ELOVL4</i>	46
3.6	Auswertung Exon 6, <i>ELOVL4</i>	46
3.6.1	Unbekannte Variante in Exon 6	46
3.6.2	Bekannte Varianten in Exon 6	47
3.7	Übersicht nachgewiesener Varianten in <i>ELOVL4</i>	51
3.8	Lokalisation und <i>in silico</i> Analyse der unbekannteten Variante in Exon 6	52
4.	Diskussion	55
4.1	Häufigkeit der SCA34.....	55
4.2	Genetik der SCA34	56
4.2.1	Pathogene Varianten in <i>ELOVL4</i>	56
4.2.2	Nachgewiesene Varianten in <i>ELOVL4</i>	58
4.2.3	Neu identifizierte Variante unklarer klinischer Signifikanz in Exon 6.....	60
4.2.4	<i>ELOVL4</i> im Tiermodell.....	64
4.3	<i>ELOVL</i> -Proteinfamilie	66
4.4	Empfehlungen zur molekulargenetischen Testung auf SCA34	68
4.5	Ausblick	69
5.	Zusammenfassung	71

6. Summary	72
7. Abkürzungsverzeichnis	I
8. Abbildungsverzeichnis	IV
9. Tabellenverzeichnis	V
10. Literaturverzeichnis	VI
11. Ehrenwörtliche Erklärung zur Dissertation	XVI
12. Danksagung	XVII

1. Einleitung

Ataxie (griech.: *ἀταξία*, wörtlich Unordnung) ist definiert als Störung des Gleichgewichts und der Koordination der Motorik. Sie kann in einer Dysfunktion des Cerebellums, des Vestibularsystems, der Propriozeption sowie einer Kombination aus diesen begründet sein. Das Kleinhirn spielt eine wichtige Rolle im Prozess der Bewegungskoordination. Es besitzt zahlreiche Afferenzen und Efferenzen zu anderen Teilen des zentralen und peripheren Nervensystems, agiert als Zentrum der Integration sensorischer und motorischer Informationen und dient der Feinabstimmung von Motorik jeglicher Art. (Steiner & Diem, 2015)¹

1.1 Ataxien

Cerebelläre Ataxien sind eine heterogene Gruppe neurologischer Erkrankungen unterschiedlicher Ätiologie und Pathogenese (s. Abbildung 1.1). Ihnen allen ist eine Ataxie (Rumpf-, Extremitäten- und/oder Gangataxie) als Leitsymptom gemeinsam (Manto & Marmolino, 2009). Sie werden nach ihrer Ätiologie in sporadische und hereditäre Ataxien eingeteilt. Die frühe Identifikation von behandelbaren Auslösern und, sobald diese ausgeschlossen sind, die effiziente und systematische Suche nach genetischen Ursachen spielen eine große Rolle im Management der Ataxien (Shakkottai & Fogel, 2013).

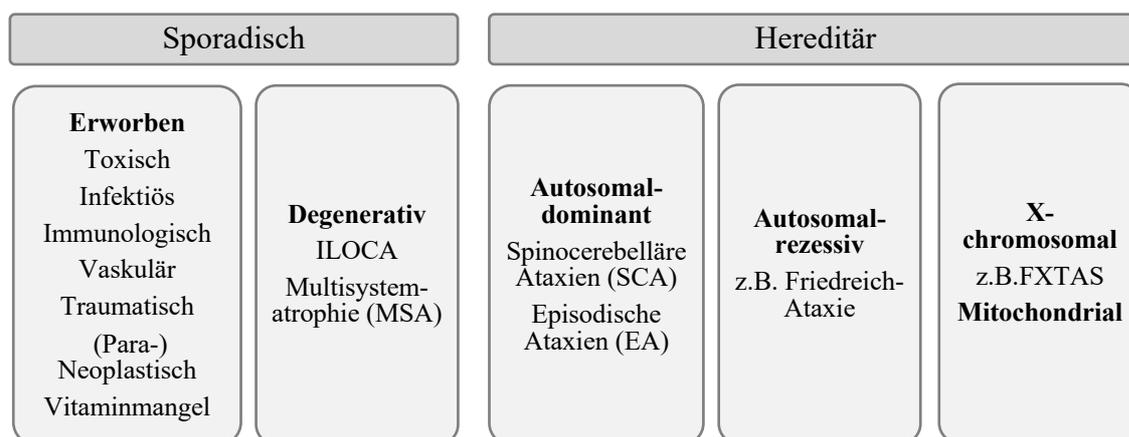


Abbildung 1.1 Einteilung der cerebellären Ataxien, modifiziert nach (Manto & Marmolino, 2009; Bürk, 2015)

ILOCA: idiopathische degenerative Ataxien, FXTAS: Fragiles-X-Tremor-Ataxie-Syndrom

¹ In den folgenden zwei Kapiteln (1. Einleitung und 2. Material und Methoden) beziehen sich die am Ende eines Absatzes nach dem Punkt stehenden Literaturangaben jeweils auf den gesamten vorherigen Absatz.

1.1.1 Sporadische Ataxien

Die Gruppe der sporadischen Ataxien umfasst die erworbenen und degenerativen Ataxien. Erworbene Ataxien können vielfältige Ursachen haben (s. Abbildung 1.1). Die alkoholinduzierte cerebelläre Degeneration ist der häufigste Vertreter der toxisch ausgelösten Ataxien und betrifft etwa ein Drittel aller Alkoholabhängigen. Unter Vitamin-B₁-Substitution und Alkoholkarenz sind die Symptome teilweise reversibel. Hypovitaminosen (v.a. Vitamin B₁, B₁₂ und E) können neben anderen Symptomen auch Ataxien hervorrufen, welche sich unter Substitutionstherapie meist langsam zurückbilden. Lösungsmittel, Schwermetalle und einige Medikamente wie Lithiumsalze, Zytostatika und Antiepileptika sind weitere bekannte Auslöser. (Bürk, 2015)

Hämorrhagische und ischämische Insulte, Traumata, cerebelläre Tumore und Metastasen können die Kleinhirnfunktion beeinträchtigen. Neuroradiologische Diagnostik ist in diesen Fällen wegweisend. Cerebellitiden, Abszesse und andere infektiöse bzw. parainfektiöse Ursachen bedürfen ausführlicher Liquordiagnostik. Die Paraneoplastische cerebelläre Degeneration zählt zu den subakuten Ataxien immunologischer Genese. Sie tritt meist im Rahmen eines kleinzelligen Bronchial-, Mamma-, und Ovariakarzinoms oder Lymphoms auf und kann dem Nachweis des Primärtumors vorausgehen. Kraniale Bildgebung zeigt eine fortschreitende Kleinhirnatrophie. (Manto & Marmolino, 2009)

Die idiopathischen degenerativen Ataxien (ILOCA, idiopathic late onset cerebellar ataxia), unter denen die cerebelläre Verlaufsform der Multisystematrophie die Häufigste darstellt, sind Ausschlussdiagnosen, welche erst nach Testung auf erworbene und genetische Ursachen gestellt werden sollten. Vermutlich liegt ein noch unbekannter genetischer Defekt in vielen Fällen zugrunde. (Bürk, 2015; Shakkottai & Fogel, 2013)

1.1.2 Autosomal-dominante cerebelläre Ataxien (ADCA)

Autosomal-dominante cerebelläre Ataxien (ADCA) bezeichnen eine heterogene Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen, deren aktuelle Klassifikation auf dem zugrunde liegenden genetischen Defekt und typischem Krankheitsverlauf basiert. Zu dieser Gruppe zählen die spinocerebellären Ataxien (SCA), die an späterer Stelle (s. Kapitel 1.2) gesondert besprochen werden, und die episodischen Ataxien (EA).

Episodische Ataxien sind gekennzeichnet durch wiederholte, anfallartige Koordinationsstörungen mit eindeutigem Beginn und Ende der Symptomatik. Die Dauer der Attacken

reicht je nach Subtyp von Minuten über Stunden bis zu Tagen. Neben Rumpf-, Extremitäten- und Gangataxie könne weitere Symptome wie Dysarthrie (motorische Sprachstörung), Tremor und Nystagmus auftreten. Auslöser sind meist physischer oder emotionaler Stress sowie körperliche Aktivität. Einige Patienten entwickeln v.a. im Spätstadium zusätzlich eine progressive Ataxie. (Choi & Choi, 2016)

Die Subtypen EA1 und EA2 wurden als einzige in mehreren Familien unterschiedlicher Ethnizität beschrieben. Auslösend sind Mutationen in Ionenkanälen. Bei EA1 ist der spannungsabhängige Kaliumkanal Subtyp 1 durch Mutationen im *KCNA1*-Gen verändert. EA2 betrifft das *CACNA1A*-Gen und einen spannungsabhängigen Calciumkanal. Mutationen in letzterem sind zugleich verantwortlich für SCA6. (Choi & Choi, 2016)

1.1.3 Autosomal-rezessive cerebelläre Ataxien (ARCA)

Autosomal-rezessive cerebelläre Ataxien (ARCA) betreffen das zentrale und periphere Nervensystem sowie in einigen Fällen andere Systeme und Organe. Gemeinsames Merkmal vieler ARCA ist der frühe Krankheitsbeginn (< 20. Lebensjahr). Sie lassen sich in vier Hauptgruppen unterteilen: degenerative, kongenitale, metabolische Ataxien und solche mit DNA-Reparaturdefekten. (Manto & Marmolino, 2009)

Bis heute (Stand Oktober 2020) sind ca. 60 primär rezessive Ataxien bekannt (Erkrankungen mit vorherrschender cerebellärer Symptomatik) (Beaudin, et al., 2019). Die Prävalenz aller ARCA liegt bei ca. 3,3/100.000, mit Friedreich-Ataxie als häufigsten Vertreter, gefolgt von Ataxia teleangiectatica und den Ataxien mit okulomotorischer Apraxie (Ruano, et al., 2014).

Friedreich-Ataxie (FRDA) kennzeichnet eine progressive Ataxie, Dysarthrie und Verlust der Muskelsehnenreflexe, Propriozeption und Oberflächensensibilität. Extra-neurologische Symptome sind Kardiomyopathie, Diabetes mellitus und eine Kyphoskoliose. FRDA wird durch einen intronischen GAA-Triplett-Repeat des *FXN*-Gens auf Chromosom 9 verursacht. Ca. 2–4 % der Patienten² sind *compound* heterozygot mit einer Punktmutation oder Deletion auf dem zweiten Allel. Die expandierten GAA-Repeats bilden Triplehelices aus, welche inhibierend auf die Transkription des *FXN*-Gens wirken. Es kommt zu reduzierten Leveln von Frataxin, einem kerncodierten

² Allein aus Gründen der besseren Lesbarkeit wurde im Text die männliche Form gewählt. Die Inhalte beziehen sich gleichermaßen auf beide Geschlechter. Ausnahmen sind gesondert gekennzeichnet.

mitochondrialen Protein, beteiligt am Eisenstoffwechsel und der Atmungskette. (Campuzano, et al., 1996; Koeppen & Mazurkiewicz, 2013)

Ataxia teleangiectatica (Louis-Bar-Syndrom) ist die häufigste ARCA bei Kindern unter fünf Jahren. Das klinische Bild ist geprägt von progressiver Ataxie, okulomotorischen Störungen und okulokutanen Teleangiektasien (kleine Gefäßerweiterungen im Gesicht und an den Konjunktiven). Das Louis-Bar-Syndrom ist assoziiert mit Immundefizienz, Intoleranz gegenüber ionisierender Strahlung und erhöhtem Risiko für maligne Erkrankungen, v.a. Leukämien und Lymphome. Ursächlich sind Mutationen im *ATM*-Gen, welches für die Serin/Threonin-Proteinkinase ATM codiert, ein Enzym, das an der Reparatur von Doppelstrangbrüchen der DNA beteiligt ist. (Gatti & Perlman, 2016; Manto & Marmolino, 2009)

Gemeinsame Merkmale der Ataxien mit okulomotorischer Apraxie (AOA) sind eine in der Kindheit auftretende progressive cerebelläre Ataxie, gefolgt von der namensgebenden okulomotorischen Apraxie. Dabei handelt es sich um eine Störung der zielgerichteten Blickmotorik. Betroffene können Objekte nicht adäquat fixieren, sondern bewegen den Kopf zuerst ruckartig in die verlangte Richtung; anschließend folgen die Augen der Kopfbewegung und das Objekt kann betrachtet werden. Oft geht dieser Zustand in eine externe Ophthalmoplegie (äußere Augenmuskellähmung) über. AOA1 und AOA2 sind die häufigsten Vertreter und wurden in mehreren Familien berichtet. In beiden Fällen sind Gene betroffen, welche für Proteine codieren, die am DNA- bzw. RNA-Metabolismus beteiligt sind. (Coutinho & Barbot, 2015; Moreira & Koenig, 2018)

Homozygote pathogene Missense-Varianten im *STUB1*-Gen, welches für CHIP (eine Ubiquitin-Ligase) codiert, wurden als ursächlich für SCAR16 identifiziert (Shi, et al., 2013; Synofzik, et al., 2014). Bei SCAR16 handelt es sich um eine ARCA mit variablem Auftreten von Pyramidenbahnzeichen und kognitiver Beeinträchtigung. Im gleichen Gen wurde bei einer spanischen Familie mit Ataxie und kognitiv-affektiven Symptomen eine dominante Frameshift-Variante nachgewiesen und als SCA48 definiert (s. Tabelle 1.1, S. 8) (Genis, et al., 2018). Varianten autosomal-dominanter (SCA48) und -rezessiver (SCAR16) Natur des *STUB1*-Gens können folglich zu cerebellärer Ataxie führen.

Für ARCA existiert bisher keine spezifische Therapie. Ausnahmen bilden das Refsum-Syndrom, die zu den Leukodystrophien zählende Cerebrotendinöse Xanthomatose, die Coenzym-Q₁₀-Mangel-Ataxie und die Ataxie mit Vitamin-E-Mangel (Bird, 2019). Diesen metabolischen Ataxien kann vorgebeugt, sie behandelt oder ihre Progression

aufgehalten werden. Ataxie mit Vitamin-E-Mangel ähnelt klinisch der Friedreich-Ataxie, jedoch tritt ein isolierter Vitamin-E-Mangel auf. Auslöser sind Veränderungen im *TTPA*-Gen und α -Tocopherol-Transportprotein, das am intrazellulären Vitamin-E-Transport beteiligt ist. Therapie der Wahl ist die orale Gabe von Vitamin E. (Schuelke, 2016)

1.1.4 X-Chromosomale und mitochondriale Ataxien

Die Gruppe der X-chromosomal und mitochondrial vererbten Ataxien ist klein. Das Fragile-X-Tremor-Ataxie-Syndrom (FXTAS) ist darunter der häufigste Vertreter. Ursächlich sind CGG-Triplett-Repeats im 5'-untranslatierten Bereich des *FMRI*-Gens, die vermutlich zu einer RNA-basierten Zytotoxizität auf Neurone führen. Bei einer Anzahl von 50–200 Wiederholungen entwickeln über 33 % der männlichen und 10 % der weiblichen Mutationsträger Symptome im Erwachsenenalter. Betroffene bilden neben progressiver Gangataxie und Intentionstremor auch periphere Neuropathie, autonome Dysfunktion und kognitive Beeinträchtigungen aus. (Zanni & Bertini, 2011)

Bei Mitochondriopathien handelt es sich um Erkrankungen mit gestörtem mitochondrialem Metabolismus, wobei hauptsächlich die oxidative Phosphorylierung (Atmungskette) beeinträchtigt ist. Sowohl das ringförmige mitochondriale Genom als auch das Kerngenom spielen eine Rolle in der Krankheitsentstehung. Mutationen in beiden Systemen können zu Syndromen mit unterschiedlichem klinischem Bild und Organbeteiligung führen. Häufig tritt eine neurologische und myopathische Symptomatik auf. Mitochondriale Erkrankungen, denen eine progressive Ataxie gemeinsam ist, sind das MERRF- (myoclonic epilepsy with ragged red fibers), NARP- (neuropathy, ataxia and retinitis pigmentosa) und das Kearns-Sayre-Syndrom. (Chinnery, 2014; Bird, 2019)

Das im Kindesalter auftretende NARP-Syndrom sowie das fulminant verlaufende im Kleinkindalter auftretende Leigh-Syndrom werden durch Varianten im mitochondrialen *MT-ATP6*-Gen, welches für die Untereinheit 6 der ATP-Synthase codiert, ausgelöst (Thorburn, et al., 2017). Es wurden zusätzlich Fälle eines im Erwachsenenalter beginnenden spinocerebellär-ataktischen Syndrom assoziiert mit Missense-Varianten in *MT-ATP6* beschrieben (Pfeffer, et al., 2012). Mitochondriale Varianten stellen eine Differentialdiagnose auch bei adulter cerebellärer Ataxie dar.

1.2 Spinocerebelläre Ataxien

Spinocerebelläre Ataxien (SCA) sind eine breite und heterogene Gruppe autosomal-dominant vererbter neurodegenerativer Erkrankungen, denen allen eine progressive Ataxie und Kleinhirndegeneration gemeinsam ist. Neben dem Cerebellum sind oft weitere Teile des zentralen Nervensystems (ZNS), wie das Spinalmark und der Hirnstamm involviert (daher die Bezeichnung „spinocerebellär“) (Paulson, 2009). Sie machen den größten Anteil der autosomal-dominanten cerebellären Ataxien (ADCA) aus.

1.2.1 Epidemiologie und Klassifikation der SCA

Die Prävalenz aller ADCA in wird auf 0–5,6/100.000 (im Durchschnitt 2,7/10⁵) geschätzt (Ruano, et al., 2014). SCA3 tritt weltweit am häufigsten auf (s. Abbildung 1.2). Über die Hälfte aller SCA verteilen sich auf die durch Triplet-Repeats verursachten SCA1–3, SCA6 und SCA7. Es existieren große regionale Unterschiede, die sich auf Gründereffekte zurückführen lassen. SCA3 erreicht mit 89 % die höchste relative Häufigkeit in der brasilianischen Bevölkerung (Ruano, et al., 2014). In Deutschland macht sie etwa 40 % der Ataxie-Familien aus (Schöls, et al., 1997). Auf Kuba stellt SCA2 mit 87% den größten Anteil der SCA-Patienten dar (Velázquez Pérez, et al., 2009).

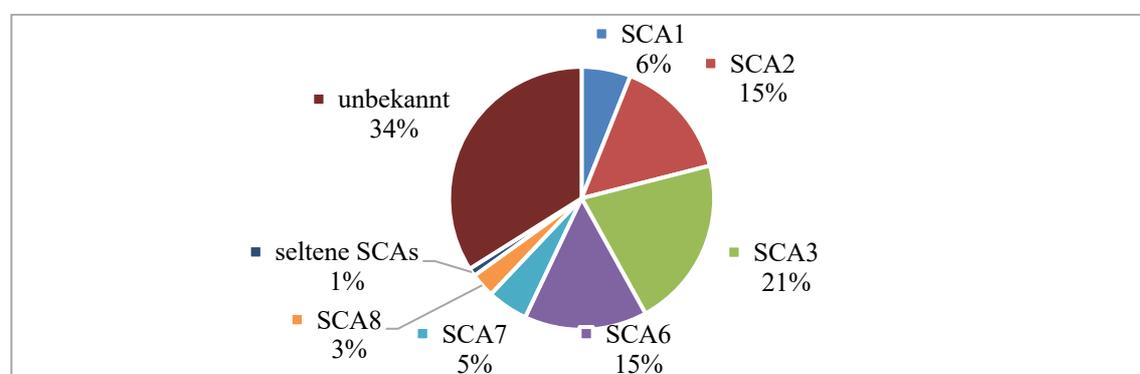


Abbildung 1.2 Globale Häufigkeit der SCA-Subtypen, nach (Bird, 2019)

Darstellung der prozentualen Häufigkeit der verschiedenen SCA-Subtypen in der Gesamtbevölkerung. In die Gruppe der seltenen SCA zählen u.a. SCA10, SCA12, SCA14, SCA17 und DRPLA.

Bevor eine einheitliche Klassifikation der hereditären Ataxien existierte, wurden die Erkrankungen oft nach dem Erstbeschreiber benannt (z.B. Friedreich-Ataxie). Eine erste Einordnung der SCA erfolgte Anfang des 20. Jh. nach dem Muster der Hirndegeneration. Man unterschied zwischen olivopontocerebellärer, spinopontiner oder rein kortikaler cerebellärer Atrophie. Diese neuropathologische Einteilung erwies sich als nicht

zielführend, da die betroffenen Hirnregionen zwischen den Erkrankten innerhalb eines Subtyps und selbst innerhalb einer Familie variierten und eine pathologische Untersuchung nur *post mortem* möglich war. (Paulson, 2009)

Die im Jahr 1982 durch Harding eingeführte Klassifikation basierte auf der Symptomatik. Es wurde in vier klinische Typen nach dem Leitsymptom eingeteilt (Harding, 1982):

- ADCA Typ 1: Ataxie mit Ophthalmoplegie, Optikusatrophie, Demenz, extrapyramidalen Störungen und Muskelatrophie
- ADCA Typ 2: Ataxie mit Retinopathie, es können Ophthalmoplegie, Demenz oder extrapyramidale Störungen auftreten
- ADCA Typ 3: rein cerebelläre Ataxie mit Beginn ≥ 60 . Lebensjahr
- ADCA Typ 4: Ataxie mit Myoklonien und Taubheit

Durch den Fortschritt der molekulargenetischen Methodik und der Identifikation vieler bisher unbekannter hereditärer Ataxien wurde auch diese Klassifikation abgelöst durch die heutige, auf dem Genotyp basierende Einteilung (Rüb, et al., 2013). SCA werden chronologisch nach der Erstbeschreibung des Locus nummeriert und erstrecken sich aktuell bis SCA48 (OMIM, 2020). Einige neu beschriebene Subtypen und die ebenfalls dominant vererbte Dentatorubro-Pallidoluysische Atrophie (DRPLA) wurden noch nicht in die fortlaufende Benennung aufgenommen (s. Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1 Übersicht der spinocerebellären Ataxien

Name	Genlocus	Gen	Protein	Mutation
SCA1	6p22.3	<i>ATXN1</i>	Ataxin-1	(CAG) _n
SCA2	12q24	<i>ATXN2</i>	Ataxin-2	(CAG) _n
SCA3	14q32.	<i>ATXN3</i>	Ataxin-3 (MJD1)	(CAG) _n
SCA4	16q22.1	unbekannt		
SCA5	11q13	<i>SPTBN2</i>	β -III-Spektrin	MM, in-frame D
SCA6	19p13	<i>CACNA1A</i>	α -1A UE des Calciumkanals P/Q	(CAG) _n
SCA7	3p14	<i>ATXN7</i>	Ataxin-7	(CAG) _n
SCA8	13q21	<i>ATXN8/</i> <i>ATXN8OS</i>	Ataxin-8, -Gegenstrang	(CUG/CAG) _n
SCA10	22q13	<i>ATXN10</i>	Ataxin-10	(ATTCT) _n intronisch
SCA11	15q15	<i>TTBK2</i>	Tau Tubulin Kinase 2	D, I, FS
SCA12	5q32	<i>PPP2R2B</i>	UE B der Protein-Phosphatase 2	(CAG) _n 5'-UTR
SCA13	19q13	<i>KCNC3</i>	Spannungsabh. Kaliumkanal Subfamilie C3 (Kv3.3)	MM

Name	Genlocus	Gen	Protein	Mutation
SCA14	19q13	<i>PRKCG</i>	Serin/Threonin Proteinkinase C γ	MM, D, SM.
SCA15/16	3p26	<i>ITPR1</i>	Inositol 1,4,5-Triphosphatrezeptor 1	D
SCA17	6q27	<i>TBP</i>	TATA-Box-Bindungs-Protein	(CAG) n
SCA18	7q31-q32	<i>IFRD1</i>	Interferon-bezogener Entwicklungsregulator 1	MM
SCA19/22	1p13	<i>KCND3</i>	Spannungsabh. Kaliumkanal Subfamilie D3 (Kv4.3)	MM, D
SCA20	11q12	12 duplizierte Gene (260 kb)		Duplikation
SCA21	1p36.33	<i>TMEM240</i>	Transmembranprotein 240	MM, Nonsense
SCA23	20p13	<i>PDYN</i>	Prodynorphin	MM
SCA25	2p21-p13	<i>SCA25</i>	unbekannt	unbekannt
SCA26	19p13.3	<i>EEF2</i>	Eukaryotischer Elongationsfaktor-2 der Translation	MM
SCA27	13q33	<i>FGF14</i>	Fibroblasten Wachstumsfaktor 14	MM, D
SCA28	18p11	<i>AFG3L2</i>	Katalytische UE der mitoch. AAA-Protease (ATPase)	MM
SCA29	3p26	<i>ITPR1</i>	Inositol 1,4,5-Triphosphatrezeptor 1	MM
SCA30	4q34.3-q35.1	unbekannt		
SCA31	16q21	<i>BEAN</i>	<i>Brain-Expressed</i> , assoziiert mit NEDD4 (Ubiquitin-Ligase)	(TGGAA) n intronisch
SCA32	7q32-q33	unbekannt		
SCA34	6q14.1	<i>ELOVL4</i>	Fettsäure-Elongase 4	MM
SCA35	20p13	<i>TGM6</i>	Transglutaminase 6	MM
SCA36	20p13	<i>NOP56</i>	Kernprotein 56 (Ribonukleoprotein)	(GGCCTG) n intronisch
SCA37	1p32	<i>DABI</i>	DAB Adapter Protein 1	(ATTTC) n intronisch
SCA38	6p12.1	<i>ELOVL5</i>	Fettsäure-Elongase 5	MM
SCA40	14q32.11-q32.12	<i>CCDC88C</i>	<i>Coiled-Coil-Domain-Containing</i> Protein 88C	MM
SCA41	4q27	<i>TRPC3</i>	Transienter Rezeptorpotential-Kationenkanal Subtyp C3	MM
SCA42	17q21.33	<i>CACNA1G</i>	α -1G UE des spannungsabh. Calciumkanals	MM
SCA43	3q25	<i>MME</i>	Membran-Metalloendopeptidase	MM
SCA44	6q24.3	<i>GRM1</i>	Metabotroper Glutamatrezeptor 1	MM
SCA45	5q33.1	<i>FAT2</i>	FAT-atypisches Cadherin 2	MM
SCA46	19q13.2	<i>PLD3</i>	Phospholipase D3	MM
SCA47	1p35	<i>PUM1</i>	Pumilio RNA-Bindungsprotein 1	MM
SCA48	16p13.3	<i>STUB1</i>	<i>STIP1 homology and U-box containing</i> Protein 1	D, FS, MM
DRPLA	12p13	<i>ATNI</i>	Atrophin-1	(CAG) n

SCA34 hervorgehoben. D: Deletion, FS: Frameshift, I: Insertion, kb: Kilobasen, MM: Missense-Mutation, SM: Splice-Mutation, UE: Untereinheit, UTR: untranslatierte Region, modifiziert nach (Matilla-Dueñas, et al., 2014; Kim & Cho, 2015; Sun, et al., 2016; Bird, 2019; OMIM, 2020)

1.2.2 Klinik der SCA

Die Erkrankungsgruppe der SCA kennzeichnet ein heterogener Phänotyp. Das klinische Bild variiert oft stark innerhalb und zwischen den einzelnen Subtypen. Der Erkrankungsbeginn ist meist in der dritten bis vierten Lebensdekade, kann sich jedoch von der Kindheit bis ins hohe Alter ereignen (Durr, 2010).

Einige SCA lassen sich als rein cerebellär beschreiben (z.B. SCA5–6 und SCA31 (Sun, et al., 2016)); dabei sind alle Symptome auf eine Störung der cerebellären Regulation von Motorik und Gleichgewicht zurückzuführen. Der Koordinationsverlust von Muskelbewegungen äußert sich in Rumpf-, Extremitäten- und Gangataxie. Oft ist eine schleichend einsetzende Gangunsicherheit das erste Symptom. Weitere cerebelläre Manifestationen sind Dysarthrie, Muskelhypotonie und eingeschränkte Grob- und/oder Feinmotorik. Die schnelle Ausführung antagonistischer Bewegungen fällt zunehmend schwer (Dysdiadochokinese). Außerdem kann es in Folge der Kleinhirndegeneration zu Dysmetrie (überschießende/verminderte Zielbewegungen), Intentionstremor und Rebound-Phänomenen kommen. Okulomotorische Störungen, wie Nystagmus, Sakkaden und Diplopie treten häufig auf. Die rein cerebelläre Verlaufsform führt bei den Betroffenen oft im Verlauf zu einer Rollstuhlpflicht, ist jedoch mit einer normalen Lebenserwartung vereinbar. (Bürk, 2015; Paulson, 2009; Steiner & Diem, 2015)

Bei vielen SCA (v.a. Polyglutamin-SCA, s.u.) kommt es zur Ausprägung zusätzlicher neurologischer Symptome wie Parkinsonismus (SCA2–3, SCA8, SCA17), Chorea (SCA17), Epilepsie (SCA10, SCA17), periphere Neuropathie, pyramidale- und extrapyramidale Symptome sowie Retinopathie (SCA7). Demenz und milde bis moderate kognitive Beeinträchtigungen treten gelegentlich auf. (Paulson, 2009; Sun, et al., 2016)

1.2.3 Genetik und Pathophysiologie der SCA

Die Anzahl der Gene, deren Veränderung zur Ausprägung einer SCA führen, beläuft sich bis heute auf ca. 38 (Stand Oktober 2020, s. Tabelle 1.1) und wächst beständig. Der Erkrankungsgruppe liegen verschiedene Mutationsmechanismen und zahlreiche, teilweise noch ungeklärte Pathomechanismen zugrunde. Die häufigsten SCA werden durch codierende Triplet-Repeats ausgelöst. Es handelt sich um Wiederholungen des Codons CAG, welches für die Aminosäure Glutamin codiert. Aktuell sind sieben

Polyglutamin-SCA bekannt: SCA1–3, SCA6–7, SCA17 und DRPLA (Sandford & Burmeister, 2014).

Meist zeigen Polyglutamin-SCA eine diffuse neurologische Dysfunktion, die über das Bild einer rein cerebellären Ataxie hinausgeht, mit zunehmender Dauer an Komplexität gewinnt und die Lebenserwartung einschränkt. Abhängig vom betroffenen Gen wird die Erkrankung über einer bestimmten Schwelle der Wiederholungen manifest, für SCA17 ist dies bspw. ab 41 bzw. 42 Glutamin-Codonen im TATA-Box-Bindungs-Protein-Gen (*TBP*) mit einer reduzierten Penetranz und ab 49 Codonen mit vollständiger Penetranz der Fall (Nolte, et al., 2010; Toyoshima, et al., 2019). Die Repeatlänge korreliert invers mit dem Ersterkrankungsalter, d.h. je mehr CAG-Wiederholungen, desto früher der Krankheitsbeginn. Häufig geht mit steigender Repeatlänge ein anderer Phänotyp oder ein schwererer Verlauf einher. Bei SCA7-Patienten nimmt bspw. die Prävalenz des Visusverlustes, der Ophthalmoplegie und des Babinski-Reflexes mit der Repeatlänge zu (David, et al., 1998; Durr, 2010).

Der dynamische Charakter von Polyglutaminerkrankungen zeigt sich im Phänomen der Antizipation. Triplet-Repeats vererben sich instabil, d.h. mit steigender Anzahl auf die nachfolgende Generation (Repeat-Expansion). Antizipation ist ausgeprägt bei DRPLA und SCA7, bei SCA6 wurde sie nicht beschrieben (Durr, 2010). Eine durchschnittliche Antizipation von 12 CAG-Wiederholungen pro Generation findet sich bei SCA7; dies entspricht einem früheren Erkrankungsalter von 20 Jahren (Lebre & Brice, 2003).

Codierende CAG-Repeats resultieren in unphysiologisch langen und fehlgefalteten Proteinen, die im Nukleus (SCA1, SCA3, SCA7 und SCA17) oder im Zytoplasma (SCA2 und SCA6) von Neuronen akkumulieren und durch einen toxischen *Gain-of-function*-Mechanismus (Funktionsgewinn) schädigend auf die Zellfunktion wirken (Seidel, et al., 2012; Sun, et al., 2016). In den Einschlüssen finden sich zusätzlich weitere Proteine, Ubiquitin, Chaperone und Transkriptionsfaktoren, was für eine beeinträchtigte Proteasom-Funktion (Proteinabbau), Proteinfaltung und Transkriptionsregulation spricht (Matilla-Dueñas, et al., 2014). Führt die stattgehabte Mutation zum Funktionsverlust des Proteins, spricht man von einem *Loss-of-function*-Mechanismus (Funktionsverlust). Weitere bei Polyglutamin-SCA beschriebene Pathomechanismen sind die Dysregulation der Calcium-Homöostase (u.a. SCA2 und SCA6), ein defekter Glutamat-Transport der Zelle und mitochondriale Dysfunktion (u.a. SCA7) (Durr, 2010).

Repeats in nicht-codierenden oder intronischen Bereichen eines Gens können ebenfalls Ataxien auslösen und sind verantwortlich für SCA8 (CUG/CAG), SCA10 (ATTCT), SCA12 (CAG), SCA31 (TGGAA), SCA36 (GGCCTG) und SCA37 (ATTTC) (Sandford & Burmeister, 2014). Die Tri-, Penta- oder Hexanukleotid-Wiederholungen beeinflussen die Expression und Zellfunktion negativ durch verschiedene Pathomechanismen, wie z.B. *RNA-gain-of-function* (Akkumulation der messenger-RNA (mRNA) mit anderen Proteinen; bei SCA10 (White, et al., 2010)) oder Repeat-assoziierte nicht-ATG-vermittelten Translation (Translation in allen drei Leserastern ohne das Vorhandensein eines regulären ATG-Translationsstarts; bei SCA8 (Zu, et al., 2011)).

Etliche kürzlich beschriebene ADCA sind durch Punktmutationen verursacht. Einige finden sich weltweit, anderen nur in einzelnen Familien (private Mutationen). Korrelationen zwischen Genotyp und Phänotyp sind daher schwer herzustellen. Klinisch sind rein cerebelläre Verläufe häufiger. (Durr, 2010)

Dominante Mutationen können pathologisch sein durch Deletion des Gens, Zerstörung von funktionellen Proteinresten (z.B. Bindungs- und Transmembrandomänen), Haploinsuffizienz oder dem dominant-negativen Effekt (Sandford & Burmeister, 2014). Von Haploinsuffizienz spricht man, wenn die Aktivität des Wildtyp-Allels zur Kompensation des mutierten Allels nicht ausreicht; unterdrückt oder stört stattdessen das mutierte Genprodukt die Funktion des Wildtyp-Allels, wird dies als dominant-negativer Effekt bezeichnet (Buselmaier & Tariverdian, 2007). SCA-Gene sind an vielen zellulären Funktionen und Signalwegen beteiligt. Sind das zelluläre Membranpotential und die Signaltransduktion durch Mutationen in Ionenkanälen und Transportern gestört, resultiert dies in Channelopathien. Ein Beispiel ist SCA13, die durch Missense-Mutationen im *KCNC3*-Gen, welches für einen spannungsabhängigen Kaliumkanal codiert, ausgelöst wird (Waters, et al., 2006; Nolte & Müller, 2006). Neben Channelopathien (u.a. SCA13, SCA19/22, SCA29, SCA41, SCA42) betreffen einige konventionelle Mutationen die mitochondriale Funktion (SCA28, Ataxie des Erwachsenenalters (*MT-ATP6*-Gen)), die Tau-Phosphorylierung (SCA11), das Zytoskelett (SCA5), den Fettstoffwechsel (SCA34, SCA38) und weitere, noch nicht gänzlich aufgeklärte Mechanismen (Durr, 2010; Matilla-Dueñas, et al., 2014; Sun, et al., 2016).

1.2.4 Diagnostik und Therapie der SCA

Erstes Symptom vieler SCA-Patienten ist meist eine Gangunsicherheit. Die weiteren Symptome können durch sorgfältige klinisch-neurologische Untersuchungen ermittelt werden. Eine Differenzierung zwischen den verschiedenen Subtypen allein durch das klinische Bild ist aufgrund der phänotypischen Heterogenität jedoch nicht möglich. Lediglich einige spezielle Untersuchungsbefunde können wegweisend sein. So findet man bspw. bei allen von SCA7 betroffenen Patienten eine pathognomische Retinopathie, die zur Erblindung führt. (Paulson, 2009)

Verschiedene klinische Tests und Ratingskalen helfen bei der Diagnosestellung und erfassen die Schwere der Symptomatik und Beeinträchtigung. Ein bewährter und valider Ataxie-Score ist der SARA-Score (Scale for the assessment and rating of ataxia). Er misst die Ausprägung der Ataxie mit Punkten von 0 (keine Ataxie) bis 40 (schwerste Ataxie) und besteht aus acht Items: Gehen, Stehen, Sitzen, Sprache, Finger-Finger-Versuch, Finger-Nase-Versuch, Diadochokinese-Test (schnelle Pro- und Supination der Hände) und Knie-Hacke-Versuch. (Schmitz-Hübsch, et al., 2006; Weyer, et al., 2007)

Neben den oben genannten Tests gibt es noch weitere Untersuchungen zur Prüfung der Kleinhirnfunktion. Der Romberg-Versuch vergleicht die Standsicherheit bei offenen und geschlossenen Augen. Beim Unterberger-Tretversuch tritt der Patient eine Minute mit geschlossenen Augen auf der Stelle. Bei einseitiger cerebellärer oder vestibulärer Schädigung tritt ein Drehen zu einer Seite auf. Ein fehlendes Rebound-Phänomen (ungebremste überschießende Bewegung eines Armes, der zuvor gegen Widerstand gebeugt wurde) deutet ebenfalls auf eine Kleinhirnschädigung hin. Weitere Untersuchungen auf Blickstabilisierung, Nystagmus und Sakkaden sind sinnvoll und ergänzen die Koordinationsprüfungen. (Steiner & Diem, 2015)

Besteht der Verdacht auf eine SCA, sollte eine neuroradiologische Diagnostik mittels Magnetresonanztomographie (MRT) erfolgen. Sie ist essenziell zur Bestätigung einer Kleinhirnatrophie und Ausschluss erworbener struktureller oder vaskulärer Ursachen (z.B. Infarkte, Tumore) (Fogel, et al., 2009; Shakkottai & Fogel, 2013). Meist finden sich weitere degenerative Veränderungen des Hirnstamms, des Spinalmarks, der Basalganglien und anderen Teilen des ZNS (Sun, et al., 2016). Viele SCA-Subtypen teilen gleiche Muster der Neurodegeneration, weswegen die Differenzialdiagnose eine Genotypisierung der Betroffenen erfordert (Seidel, et al., 2012).

Fortschreitende Ataxie, symmetrische Untersuchungsbefunde und wiederholtes Auftreten in einer Familie legen eine hereditäre Erkrankung nahe. Die Erhebung einer Familienanamnese über drei Generationen ist indiziert. Treten in jeder Generation bei mehreren Familienangehörigen ähnliche Symptome auf, ist eine autosomal-dominante Vererbung wahrscheinlich. (Paulson, 2009)

Die genetische Untersuchung und die eingeschlossenen möglichen Gefahren sind in Deutschland durch das Gendiagnostikgesetz geregelt. Es sichert das Recht auf informationelle Selbstbestimmung, welches sowohl das Recht auf Wissen wie auch auf Nichtwissen beinhaltet. Die Untersuchung darf nur nach umfassender Aufklärung, Bedenkzeit und Einwilligung der betroffenen Person erfolgen. Vor allem der genetischen Beratung vor und nach der Testung durch einen Arzt mit Facharzt-, Schwerpunkt- oder Zusatzqualifizierung für Humangenetik kommt eine wichtige Rolle zu. (GenDG, 2009)

Es wird zuerst auf die häufigsten SCA-Loci getestet (meist Polyglutamin-SCA). Bei einem negativen Ergebnis werden in einer zweiten Runde seltenere SCA-Subtypen überprüft. In den letzten Jahren hat mit der Weiterentwicklung der Sequenzierungsmethoden die Multigentestung gegenüber der Einzelgentestung immer mehr an Bedeutung gewonnen. In Diagnostik-Panels ist es möglich, viele Ataxie-verursachende Gene parallel zu untersuchen. Ein positives Testergebnis sichert die Diagnose, während ein negatives Ergebnis eine SCA nicht ausschließt (Paulson, 2009). Bei bis zu 40 % aller Ataxie-Fälle mit genetisch vermuteter Ursache bleibt der genaue Defekt unentdeckt (Sailer & Houlden, 2012).

Kausale therapeutische Ansätze bei neurodegenerativen Erkrankungen sind meist limitiert oder nicht verfügbar. Auch für SCA existiert derzeit keine zugelassene pharmakologische oder chirurgische Therapie (Zesiewicz, et al., 2018). Obwohl einige neue Ansätze in Studien geprüft werden (s. Kapitel 4.5), konzentriert sich die aktuelle Therapie auf supportive und rehabilitative Maßnahmen. Viele Patienten profitieren von Physiotherapie (Miyai, et al., 2012), Logopädie oder Hilfsmitteln, wie Gehhilfen, Rollstühlen und Sprachcomputern. Einige Manifestationen wie epileptische Anfälle oder Spastiken können mit entsprechenden Pharmaka behandelt werden (Bird, 2019).

1.3 Spinocerebelläre Ataxie 34

Spinocerebelläre Ataxie 34 (SCA34) gehört zu den durch Punktmutationen verursachten SCA und wurde erstmals im Jahr 1972 bei einer frankokanadischen Familie beschrieben (Giroux & Barbeau, 1972). Ursächlich sind Mutationen im *ELOVL4*-Gen (elongation of very long-chain fatty acids-like 4), welches für die Fettsäure-Elongase 4 codiert (Cadieux-Dion, et al., 2014). Bei SCA34 handelt sich um eine seltene Erkrankung.

1.3.1 Identifikation und klinisches Bild der SCA34

Im Jahr 1972 wurde über ein bisher unbekanntes neurokutanes Syndrom in einer fünf Generationen umfassenden frankokanadischen Familie von Giroux und Barbeau berichtet. Betroffene Mitglieder der Familie zeigten eine Kombination aus Erythrokeratodermia variabilis (EKV) und Ataxie. Die Erkrankung folgte einem autosomal-dominanten Vererbungsmuster und war charakterisiert durch früh nach der Geburt auftretende papulosquamös-erythematöse Plaques mit variabler Ausprägung. Die Erytheme und Hyperkeratosen traten vorwiegend an den dorsalen Händen und Füßen sowie an Knien und Ohren auf, neigten zur Aggravation während den Wintermonaten und verschwanden meist im jungen Erwachsenenalter. Ab einem Alter von 40–45 Jahren kam es zur Ausbildung von progressiver Gangataxie, verringerten Muskelsehnenreflexen, gelegentlich Spastizität sowie Nystagmus und Dysarthrie. Im Verlauf benötigten die Betroffenen oft einen Rollstuhl. (Giroux & Barbeau, 1972)

Turcotte Gauthier untersuchte in einer Folgestudie eben jene frankokanadische Familie mittels genomweiter Kopplungsanalyse und konnte als Krankheitslocus die chromosomale Region **6p12.3–q16.2** ermitteln. Drei weitere europäische Familien mit rein cerebellärer Ataxie ungeklärter Ursache zeigten ebenfalls eine Kopplung zu dieser, als SCA34 bezeichneten, Kandidatenregion auf Chromosom 6 (Turcotte Gauthier, 2010).

Im Jahr 2014 konnten Cadieux-Dion et al. durch Kombination von Kopplungsanalyse und Exom-Sequenzierung eine heterozygote Missense-Mutation (**c.504G>C, p.Leu168Phe**) im Fettsäure-Elongase-4-Gen (*ELOVL4*) auf Chromosom 6 (6q14.1) als zugrunde liegende genetische Ursache der Ataxie der frankokanadischen Familie identifizieren. Von 19 ermittelten Mutationsträgern waren vier asymptomatisch. Ergänzend zum Befund von Giroux und Barbeau wurde das mittlere Alter des Symptombeginns der Ataxie auf 51 Jahre ermittelt. Erst mit Erreichen eines Alters von 60–70 Jahren benötigten die

Betroffenen eine Gehhilfe. MRT-Scans von sieben Familienangehörigen mit milder bis moderater Ataxie belegten eine cerebelläre und pontine Atrophie, die den Vermis stärker betraf als die cerebellären Hemisphären. Die Level der langkettigen Fettsäuren im Blut zweier untersuchter Patienten waren im Referenzbereich. (Cadieux-Dion, et al., 2014)

Eben jene Variante **c.504G>C** konnte im Jahr 2020 bei einer weiteren frankokanadischen Familie mit ähnlichen neurologischen Befunden (s.o.) nachgewiesen werden. Typische Läsionen einer EKV wurden nicht berichtet. Einige Betroffene hatten mildere Hautbeteiligung in Form eines diskoiden Ekzems oder Gingivitis, welche Zahnersatz notwendig machte. Immunhistochemie von dermalen Fibroblasten eines Betroffenen zeigte eine Fehllokalisierung und Aggregation des ELOVL4-Proteins gegenüber gesunden Kontrollen. Zusätzlich wurden signifikante kognitive Defizite in der exekutiven Funktion und mögliche psychiatrische Beteiligung festgestellt, was auf eine umfassendere Beteiligung anderer Hirndomänen hinweist. (Beaudin, et al., 2020)

Ozaki et al. berichteten im Jahr 2015 bei zwei nicht verwandten japanischen Familien von einer weiteren heterozygoten Missense-Mutation (**c.736T>G, p.Trp246Gly**) in *ELOVL4*. Die neun Betroffenen zeigten cerebelläre Ataxie, jedoch keine EKV. Bei einigen fanden sich zusätzlich okulomotorische Störungen (Nystagmus, supranukleäre Blickparese), Pyramidenbahnzeichen und vegetative Symptome (Blasenfunktionsstörungen und Obstipation). Ferner kam es bei allen untersuchten Patienten zu cerebellärer und pontiner Atrophie in MRT-Untersuchungen des Gehirns und radiologischen Auffälligkeiten wie dem *Hot-cross-bun-sign* (kreuzförmige Hyperintensität) oder Mittellinien-Hyperintensität des Pons. Es handelt sich um neuroradiologische Zeichen, die auch im Zusammenhang mit anderen degenerativen Erkrankungen (z.B. Multisystematrophie) und einigen anderen SCA (v.a. SCA2) auftreten (Lee, et al., 2009). Das durchschnittliche Erkrankungsalter lag bei 34 Jahren (13–56 Jahre). Erst im Alter von ca. 60 Jahren benötigten die Betroffenen eine Gehhilfe. Bei keinem der Patienten waren gegenwärtige oder zurückliegende Hautauffälligkeiten bekannt. (Ozaki, et al., 2015)

Ein weiterer Fall von SCA34 wurde im selben Jahr von Bourassa et al. berichtet. Ein betroffener Mann südamerikanischer Herkunft erkrankte während der Adoleszenz an einer Erythrokeratodermie. Im jungen Erwachsenenalter entwickelte er eine progressive Gangataxie sowie weitere neurologische Symptome – analog zu den von Giroux und Barbeau (1972) beschriebenen. Der Beginn der Symptomatik war mit Mitte 20 früher als

in den bisher beschriebenen Familien. Als ursächlich wurde eine weitere Missense-Mutation im *ELOVL4*-Gen ermittelt (**c.539A>C**, **p.Gln180Pro**). (Bourassa, et al., 2015)

Im Jahr 2018 beschrieben Bourque und Mitarbeiter einen Fall von EKV und Ataxie bei einer 60-jährigen Anglikanadierin. Eine neue heterozygote Missense-Mutation **c.698C>T**, **p.Thr233Met** konnte bei ihr im *ELOVL4*-Gen nachgewiesen werden. Die Hautveränderungen der Patientin manifestierten in der Kindheit mit vier Jahren, bestehen seither fort und sind hauptsächlich durch weitläufige erythematöse keratotische Plaques an Händen und Beinen gekennzeichnet. Sie entwickelte eine reine Gangataxie mit moderat positivem Romberg-Test, welche bereits in der Jugend begann. Okulomotorische Symptome wie Sakkaden, Oszillopsien und Doppelbilder traten ab dem 50. Lebensjahr auf. In Untersuchungen bestand eine Hyporeflexie der unteren Extremität und moderate Kleinhirnatrophie in der MRT. Eltern und Geschwister der Indexpatientin waren neurologisch und dermatologisch asymptomatisch. Unter Therapie mit 15 mg Baclofen (Muskelrelaxans) konnte bei ihr eine signifikante Reduktion der Doppelbilder und Oszillopsien erreicht werden. (Bourque, et al., 2018)

Zur Evaluation der Prävalenz von SCA34 untersuchten Ozaki und Mitarbeiter aus einer Gruppe von 506 bisher undiagnostizierten Ataxie-Patienten 153 Index-Patienten auf Mutationen in *ELOVL4*. Das Screening ergab den Nachweis der von Bourque et al. identifizierten Mutation **c.698C>T** bei einem Patienten mit Multisystem-Neurodegeneration incl. Ataxie und EKV. Sein Vater zeigte ebenfalls Ataxie, jedoch ohne Hautbeteiligung. Bei beiden wurden eine ausgeprägte pontine und cerebelläre Atrophie sowie das *Hot-cross-bun-sign* nachgewiesen. Die Prävalenz von SCA34 unter diesen bisher nicht diagnostizierten Ataxie-Patienten beträgt **0,2 %**. (Ozaki, et al., 2019)

Das Spektrum der klinischen Präsentation von SCA34 wurde im Jahr 2019 durch die Arbeit von Xiao et al erneut erweitert. In einer sieben Generationen umfassenden amerikanischen Familie konnte eine bisher unbekannte Missense-Mutation (**c512.T>C**, **pIle171Thr**) in *ELOVL4* nachgewiesen werden. Hier jedoch kam es bei einigen Betroffenen neben cerebellärer Ataxie, Dysarthrie, okulomotorischen Störungen und Pyramidenbahnzeichen zusätzlich bei der Funduskopie zum Nachweis von peripheren knochenbälkchenähnlichen Pigmentveränderungen, die mit einer Retinitis pigmentosa vereinbar sind. MRT-Untersuchungen zeigten cerebelläre und pontine Atrophie; Hautveränderungen lagen bei dieser Familie nicht vor. (Xiao, et al., 2019)

1.3.2 Merkmale des *ELOVL4*-Gens und der Fettsäure-Elongase 4

ELOVL4 liegt auf dem langen Arm von Chromosom 6 in der Region 6q14.1. Es codiert für die Fettsäure-Elongase 4, ein aus 314 Aminosäuren bestehendes Protein des Fettsäurestoffwechsels (Zhang, et al., 2001). Das *ELOVL4*-Transkript besteht aus sechs Exons. Die fünf beschriebenen SCA34 auslösenden Mutationen (Cadieux-Dion, et al., 2014; Ozaki, et al., 2015; Bourassa, et al., 2015; Bourque, et al., 2018; Xiao, et al., 2019) befinden sich in Exon 4 bzw. Exon 6 (s. Abbildung 1.3 und Tabelle 1.2, S. 20).

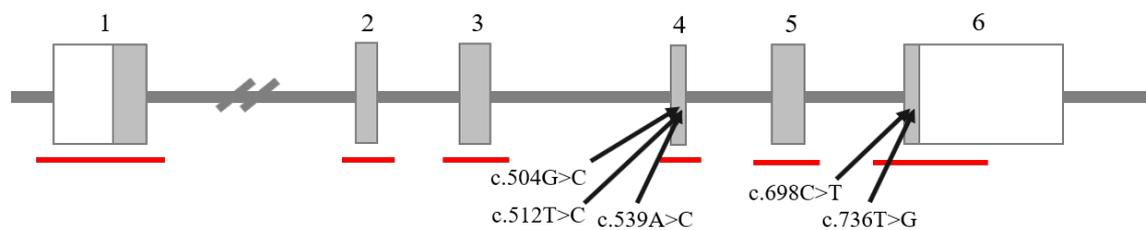


Abbildung 1.3 *ELOVL4*-Transkript und SCA34 assoziierte Sequenzänderungen

Die Exons sind grau dargestellt, rot kennzeichnet den in dieser Arbeit sequenzierten Bereich des Transkripts. Bekannte SCA34 auslösende Mutationen sind mit Pfeilen markiert.

ELOVL4 ist Teil der *ELOVL*-Genfamilie, deren Mitglieder für Enzyme des Fettstoffwechsels codieren (Jakobsson, et al., 2006). *ELOVL* steht für *elongation of very long-chain fatty acids* (Verlängerung langkettiger Fettsäuren). Fettsäuren werden nach der C-Atom-Kettenlänge und der Anzahl der Doppelbindungen klassifiziert. Fettsäuren ab einer Länge von ≥ 22 C-Atomen heißen *very long-chain fatty acids* (VLCFA), jene mit ≥ 26 C-Atomen *ultra long-chain fatty acids* (ULCFA) (Sassa & Kihara, 2014).

Eine erhebliche Anzahl der Fettsäuren, die zuvor *de novo* im Zytosol durch die Fettsäure-Synthase hergestellt oder durch die Nahrung aufgenommen wurden, erfahren eine weitere Verlängerung zu VLCFA. Die Elongation findet hauptsächlich an membrangebundenen Enzymen des endoplasmatischen Retikulums (ER) statt. In einem vierschrittigen Reaktionszyklus wird die durch einen Thioester an Coenzym A gebundene Fettsäure (Acyl-CoA) je Zyklus um zwei Kohlenstoffatome verlängert. Die erste geschwindigkeitsbestimmende Teilreaktion besteht aus der Kondensation von Malonyl-CoA und Acyl-CoA zu 3-Ketoacyl-CoA und wird von den Fettsäure-Elongasen der *ELOVL*-Familie katalysiert. (Jakobsson, et al., 2006)

Es sind sieben Elongasen in Säugetieren bekannt (*ELOVL1–7*), welche unterschiedliche Substratspezifität gegenüber Kettenlänge und Anzahl der Doppelbindungen besitzen

(Guillou, et al., 2010; Ohno, et al., 2010). ELOVL4 kann gesättigte bis mehrfach ungesättigte Fettsäuren elongieren und ist auf die Synthese von ULCFA ($C \geq 26$) spezialisiert (Agaba, et al., 2008). Während einige *ELOVL*-Gene ubiquitär exprimiert werden (*ELOVL1*, 5–6), zeigen andere spezifischere Gewebsexpression (*ELOVL2–4*, 7) (Guillou, et al., 2010). Mehrere Studien konnten die hohe evolutionäre Konservierung der Sequenz und das Vorkommen von *ELOVL4*-mRNA in den Fotorezeptorzellen der Retina des Menschen, der Maus und weiterer Wirbeltiere zeigen (Zhang, et al., 2001; Mandal, et al., 2004; Lagali, et al., 2003). Hohe Level der *ELOVL4*-mRNA finden sich außerdem im Gehirn, Thymus, Testis, Ovar und Prostata des Menschen (Ohno, et al., 2010; Zhang, et al., 2001) sowie in der Haut der Maus (Mandal, et al., 2004). Innerhalb des Cerebellums der Maus findet sich *ELOVL4* zu jedem Entwicklungszeitpunkt in hohen Konzentrationen in Neuronen jeder Zellschicht (Sherry, et al., 2017).

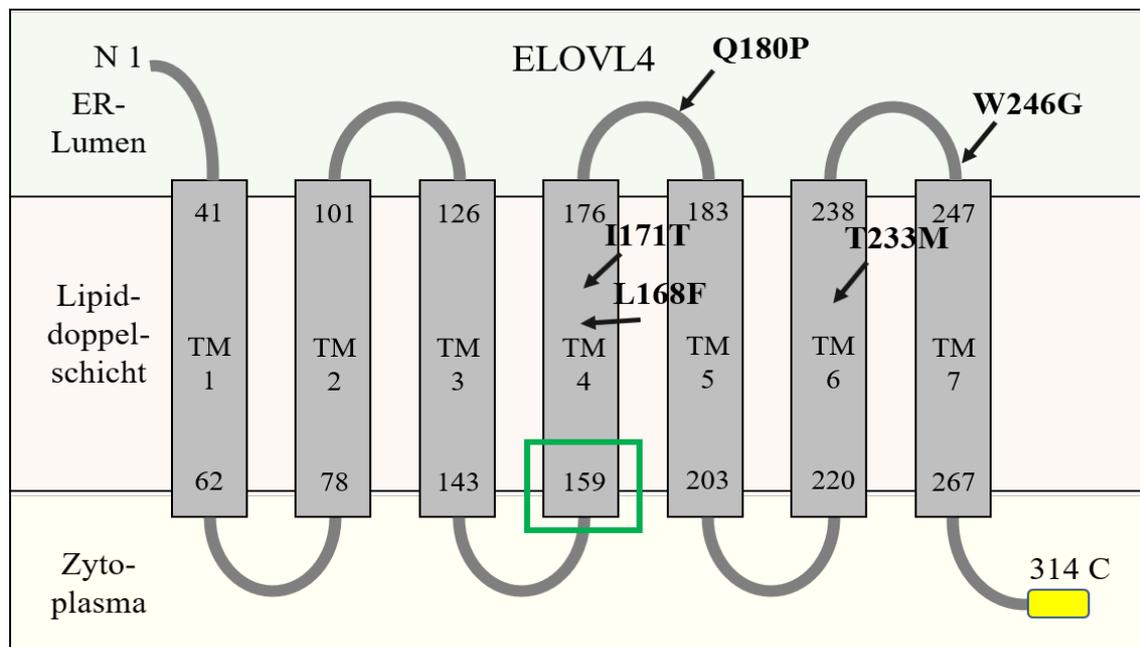


Abbildung 1.4 ELOVL4-Proteinschema, modifiziert nach (Ozaki, et al., 2015)

SCA34 auslösende Mutationen sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Das gelbe Rechteck markiert das ER-Retentionssignal, der grüne Rahmen die Dioxy-Eisen-Bindungsstelle. TM: Transmembrandomäne

ELOVL4 teilt die für alle Mitglieder der *ELOVL*-Familie charakteristischen Merkmale: mehrere Transmembrandomänen (TM), eine Histidin-reiche Di-Oxy-Eisen-Bindungsstelle (HXXHH), die essentiell für die Bildung von 3-Ketoacyl-CoA ist (Denic & Weissman, 2007), und ein C-terminales Di-Lysin-Motiv (KXXXX), welches als ER-Retentionssignal dient (Jackson, et al., 1990) (s. Abbildung 1.4). Demnach ist die subzelluläre Lokalisation von ELOVL4 im ER (Ambasudhan, et al., 2004).

1.3.3 Weitere mit *ELOVL4* assoziierte Krankheitsbilder

Neben den oben erwähnten SCA34 auslösenden Varianten gibt es weitere Phänotypen, die mit Sequenzänderungen in *ELOVL4* assoziiert sind. Dominante Mutationen in *ELOVL4* sind bekannte Auslöser von Morbus Stargardt Typ 3 (STGD3), einer früh einsetzenden progressiven Makuladegeneration. STGD3 führt zum Verlust der zentralen Sicht, Atrophie des Pigmentepithels der Retina und letztlich zur irreversiblen Erblindung (Vasireddy, et al., 2010). Die drei beschriebenen STGD3 auslösenden Varianten befinden sich in Exon 6 und führen durch die Generation eines Stopcodons zum Verlust von 45 bzw. 51 Aminosäuren am C-terminalen Ende des Proteins (s. Tabelle 1.2, S. 20) (Zhang, et al., 2001; Edwards, et al., 2001; Bernstein, et al., 2001; Maugeri, et al., 2004). Durch den Wegfall des ER-Retentionssignals verliert *ELOVL4* seine physiologische Lokalisation im ER (Ambasudhan, et al., 2004) und akkumuliert mit Wildtyp-*ELOVL4* zu perinukleären Aggresomen (Grayson & Molday, 2005; Vasireddy, et al., 2005). Der dominant-negative Effekt dieser Mutationen konnte an mehreren transgenen Mausmodellen bestätigt werden. Genaddition bzw. -substitution einer heterozygoten STGD3-Mutation in das Mausgenom machten es möglich, den charakteristischen Phänotyp zu rekapitulieren und den Mangel von mehrfach ungesättigten ULCFA ($C > 30$) in Phosphatidylcholinen von Photorezeptoren der Retina festzustellen (Karan, et al., 2005; Vasireddy, et al., 2006; McMahon, et al., 2007; Harkewicz, et al., 2012). *ELOVL4* ist daher entscheidend für die Synthese von ULCFA und die Netzhautfunktion.

Aldahmesh et al. berichteten im Jahr 2011 von homozygoten *ELOVL4*-Varianten bei zwei saudi-arabischen Kindern mit angeborener Ichthyose. Die Betroffenen bildeten nach der Geburt trockene, schuppige Haut, therapierefraktäre Epilepsie, schwere mentale Retardierung und spastische Tetraplegie aus. Beide starben innerhalb der ersten Lebensjahre. Bei den rezessiven Varianten handelt es sich um eine Nonsense-Mutation in Exon 5 und eine Deletion in Exon 6, die beide in einem verfrühten Stopcodon resultieren (s. Tabelle 1.2, S. 20). Insgesamt wurde ein *Loss-of-function*-Mechanismus des *ELOVL4*-Proteins vermutet. (Aldahmesh, et al., 2011)

Ein weiterer Fall von angeborener Ichthyose bei drei Geschwistern einer pakistanischen Familie wurde im Jahr 2014 von Mir et al. beschrieben. Ursächlich ist eine homozygote Nonsense-Mutation in Exon 1 von *ELOVL4*, die im Verlust aller stromabwärts gelegener TM des Proteins resultiert (s. Tabelle 1.2, S. 20). Während alle Betroffenen Symptome

der Ichthyose ausbildeten, kam es nur bei einem der drei Geschwister zur Ausprägung des neurologischen Phänotyps mit mentaler Retardierung, spastischer Tetraplegie und Epilepsie. Mir et al. vermuteten als möglichen Faktor, welcher zur phänotypischen Variabilität beiträgt, die Verwendung von mindestens einem alternativen ATG-Translationsstart stromabwärts der Mutationsstelle. (Mir, et al., 2014)

1.3.4 Zusammenfassung der bekannten Varianten in *ELOVL4*

Die verschiedenen pathogenen Varianten in *ELOVL4* resultieren in erheblich unterschiedlichen Phänotypen. Zusammengenommen ergibt sich für *ELOVL4* eine essenzielle Rolle für die Gehirnentwicklung und -physiologie sowie die normale Funktion der Retina und Epidermis. Nachfolgend findet sich eine tabellarische Zusammenfassung der pathogenen Varianten in *ELOVL4* sowie deren Erstbeschreiber.

Tabelle 1.2 Beschriebene pathogene Varianten in *ELOVL4*

Ort	Bezeichnung	AS-Austausch	Art	Phänotyp	Quelle
Exon 1	c.78C>G	p.Tyr26*	Nonsense	Ichthyose, mentale Retard., spast. Tetraplegie	Mir, et al., 2014
Exon 4	c.504G>C	p.Leu168Phe	MM	SCA34 (mit EKV)	Cadieux-Dion, et al., 2014
Exon 4	c.512T>C	p.Ile171Thr	MM	SCA34 (mit RP)	Xiao, et al., 2019
Exon 4	c.539A>C	p.Gln180Pro	MM	SCA34 (mit EKV)	Bourassa, et al., 2015
Exon 5	c.646C>T	p.Arg216*	Nonsense	Ichthyose, mentale Retard., spastische Tetraplegie	Aldahmesh, et al., 2011
Exon 6	c.690delT	p.Ile230Metfs*22	D, FS		
Exon 6	c.698C>T	p.Thr233Met	MM	SCA34 (mit EKV)	Bourque, et al., 2018
Exon 6	c.736T>G	p.Trp246Gly	MM	SCA34	Ozaki, et al., 2015
Exon 6	c.790_794del	p.Asn264Leufs*9	D, FS	Morbus Stargardt Typ 3 (STGD3)	Zhang, et al. 2001 Edwards, et al., 2001
Exon 6	c.789_793 delinsAAC	p.Asn264Thrfs*1 0	D, FS		Bernstein, et al., 2001
Exon 6	c.810C>G	p.Tyr270*	Nonsense		Maugeri, et al., 2004

SCA34 assoziierte Varianten grau hervorgehoben. AS: Aminosäure, D: Deletion, EKV: Erythrokeratodermia variabilis, FS: Frameshift, MM: Missense-Mutation, RP: Retinitis pigmentosa

1.4 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden DNA-Proben von 61 Ataxie-Patienten mit positiver Familienanamnese und typischer Klinik auf beschriebene und gegebenenfalls neue Varianten im *ELOVL4*-Gen molekulargenetisch untersucht.

Ziel der Arbeit ist es, Aussagen über die Häufigkeit von SCA34 in diesem vorselektierten Patientenkollektiv zu treffen und Rückschlüsse über die Relevanz einer genetischen Testung auf SCA34 bei Ataxien ungeklärter Ursache zu ziehen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Enzyme und Chemikalien

Tabelle 2.1 Enzyme und Chemikalien

Enzyme und Substanzen	Hersteller
ABI-Sequenzier-Mix	BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, Foster City, USA
Agarose	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Betain (5M)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Cut-Puffer H	Roche, Basel, CH
DdeI	New England BioLabs, Ipswich, USA
EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
Exo-SAP	Affymetrix, Santa Clara, USA
HiDi Formamid	Applied Biosystems, Foster City, USA
Nukleotide dATP, dGTP, dCTP, dTTP, je 100 mM	Promega, Madison, USA
PCR-Puffer 10x	Taq PCR Core Kit, Qiagen, Hilden
pUC19 Plasmid-DNA	Gewonnen aus Bakterienstämmen
Sephadex G-50 Superfine	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Sequenzier-Puffer 5x	BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, Foster City, USA
Sucrose	Merck, Darmstadt
Taq-Polymerase	Taq PCR Core Kit, Qiagen, Hilden
TRIS-Hydrochlorid (TRIS-HCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Trismabase	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Xylencyanol	Merck, Darmstadt

2.1.2 Kits

Tabelle 2.2 Kits

Kit	Hersteller
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
Exo-SAP-IT PCR Product Cleanup	Affymetrix, Santa Clara, USA
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden
Straight PCR OLS Kit	OLS OMNI Life Science, Bremen
Taq PCR Core Kit	Qiagen, Hilden

2.1.3 Puffer und Lösungen

10x TBE-Puffer (TRIS-Borat-EDTA-Puffer)

540 g Trismabase (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)

275 g Borsäure

200 ml EDTA-Lösung 0.5 M (pH 8,0)

ad Aqua dest. auf 5 l

pH auf 8,2–8,4 einstellen

1x TBE-Puffer

Ein Teil 10x Puffer verdünnt auf neun Teile Aqua dest.

10 mM TRIS-HCl

TRIS-Hydrochlorid auf 10 mM mit Aqua dest. verdünnen, pH ca. 7,4

Nukleotidmix

Je 5 µl dATP, dGTP, dCTP, dTTP (100 mM)

380 µl 10 mM TRIS-HCl

(1,25 mM je Base)

pUC/DdeI-Größenstandard

10 µl pUC19 Plasmid-DNA (1460 µg/ml)

10 µl Cut-Puffer H (für Enzyme)

4-5 µl Enzym DdeI (10 U/µl)

ad Aqua dest. auf 100 µl, im Heizblock für drei Stunden bei 37 °C inkubieren

Banden bei 890 bp, 540 bp, 426 bp, 409 bp, 240 bp, 166 bp

Agarosegel-Ladepuffer

40 g Sucrose 40 %

10 ml 10x TBE-Puffer

0,25 g Bromphenolblau

0,25 g Xylencyanol

ad 1x TBE-Puffer auf 100 ml

2.1.4 Primer

Synthetisiert von Microsynth, Balgach, CH

Tabelle 2.3 Primer zur Amplifizierung des *ELOVL4*-Gens

Exon	Primer	PCR-Produkt	Exon-Größe	Schmelz-temp.	Annealing-temp.
1F 1R	5'-CACGTGACGCCGGCTGA-3' 5'-CTGATCCGCAGCATCCGAAAG-3'	547 bp	401 bp (100 bp)	59,8 °C 63,2 °C	61 °C
2F 2R	5'-ACTCAAAGGACAGTGATCCGT-3' 5'-GAGTAGCTAACAGTTATGTCTGGGT-3'	429 bp	188 bp	59,5 °C 64,1 °C	61 °C
3F 3R	5'-TGCACAGTAACTTCTAGCAATCG-3' 5'-GACAGAGCAAGAACTGTC-3'	389 bp	81 bp	60,9 °C 55,0 °C	55 °C
4F 4R	5'-GGAGAGATGCTTAGGTTTTTC-3' 5'-ATGATTAACCATGAAAGCAAG-3'	455 bp	172 bp	57,5 °C 53,4 °C	55 °C
5F 5R	5'-TTTCATTTCTAATCTGTAAGCAAGA-3' 5'-TAGAGTCAAGTGGGCATAAC-3'	408 bp	128 bp	57,6 °C 56,4 °C	55 °C
6F 6R	5'-GTTGTGAATGAGGAGCTAGC-3' 5'-CTTTAACAACCTGGATGTGAAC-3'	729 bp	2.072 bp (276 bp)	58,4 °C 58,4 °C	58 °C

Angabe des codierenden Anteils der Exons in Klammern. F: forward, vorwärts; R: reverse, rückwärts

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.4 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
24-Well PCR-Platte	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Cap Stripes	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
1,5/2 ml Eppendorf-Gefäße	Eppendorf, Hamburg
Foto-Thermopapier	Diagramm Halbach, Schwerte
Mikrotiterplatten Multiscreen HV	Merck Millipore, Carrigtwohill, IRL
Multi-Screen Positionierahmen für die Zentrifugation	Merck Millipore, Carrigtwohill, IRL
Multiwell-8er-Streifen (0,5 µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg

2.1.6 Geräte

Tabelle 2.5 Geräte

Gerät	Hersteller
Analysewaage EMB 1000-2	Kern, Balingen
Digitaler monochromatischer Drucker P93DW	Mitsubishi Electric Europe, Barcelona, ESP
Eisbereiter	Manitowoc Company, Manitowoc, USA
Elektrophorese-Kammer Horizon 58	Life Technologies, Carlsbad, USA
Heizblock Techne Dri-Block DB3	Techne, Stone, UK
Mikrowelle MS 196 VUT	LG Electronics, Eschborn
Multifuge 3L-R	Heraeus, Hanau
Pipetten 1000 µl, 200 µl, 100 µl Pipetman classic 10-100 µl Labmate pro 10 µl Research	Gilson, Villiers le Bel, F HTL Lab Solutions, Warschau, PL Eppendorf, Hamburg
Sequencer 3130xl Genetic Analyser	Applied Biosystems, Foster City, USA
Spannungsquelle	Biometra, Göttingen
Thermocycler Cyler T Professional basic	Biometra, Göttingen
Thermomixer C	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge Mini Centrifuge	Labnet, Woodbridge, USA

Gerät	Hersteller
UV-Transilluminator Intas Gel Imager	Intas, Göttingen
Vortex	Heidolph, Schwabach

2.1.7 Software und Datenbanken

Tabelle 2.6 Software und Datenbanken

Software und Datenbanken	Hersteller
SeqScape Version 2.5	Applied Biosystems, Foster City, USA
Finch TV Version 1.4	Geospiza
Ensembl Genome Browser http://www.ensembl.org	European Molecular Biology Laboratory's European Bioinformatics Institute (EMBL- EBI), Hinxton, UK
Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP	National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, USA
MutationTaster http://www.mutationtaster.org	NeuroCure Cluster of Excellence, Charité Universitätsmedizin, Berlin
PolyPhen-2 http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2	Sunyaev Lab, Harvard University, Boston, USA
PROVEAN http://provean.jevl.org	J. Craig Venter Institute, La Jolla, Rockville, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Auswahl der Patienten

Zur Untersuchung des *ELOVL4*-Gens standen 61 anonymisierte DNA-Proben zur Verfügung. Bei den Studienteilnehmern handelt es sich um überwiegend deutsche Patienten, deren DNA nach einer genetischen Beratung und Einverständniserklärung gemäß Gendiagnostikgesetz im Institut für Humangenetik Gießen in den Jahren 1994 bis 2018 asserviert wurden (GenDG, 2009). Die Geschlechterverteilung lag bei 1 (weiblich) zu 1,4 (männlich). Die ausgewählten Patienten weisen eine für die spinocerebelläre Ataxie typische Klinik mit Bewegungsstörungen auf. Familienanamnestisch lässt sich eine autosomal-dominant vererbte Ataxie vermuten. Die Proben wurden zuvor auf andere Ataxie-Loci getestet. SCA1-3, SCA6-8, SCA10-14, SCA17, SCA19, SCA23, SCA27, SCA28 und SCA38 konnten als Krankheitsursache ausgeschlossen werden.

2.2.2 DNA-Extraktion aus Blut

Für die Nukleinsäureanalytik ist eine einwandfreie Isolierung und Reinigung von DNA unverzichtbar. Es stehen unterschiedliche Methoden und Protokolle, angepasst auf den Ausgangsorganismus, die Art der zu reinigenden Nukleinsäuren und deren nachfolgende Anwendungen, zur Verfügung. In dieser Arbeit wurde die DNA mittels des QIAamp DNA Blood Mini Kit des Herstellers Qiagen aus EDTA-Blut extrahiert. Nach Angaben des Herstellers erhält man aus 200 µl Vollblut durchschnittlich eine Ausbeute von ca. 4-12 µg DNA bei einem Elutionsvolumen von 50-200 µl.

Im ersten Schritt wurden zum Aufschluss der Zellmembranen der Erythrozyten und Abbau der Zellproteine 20 µl Qiagen-Protease, 200 µl Lysepuffer und 200 µl des EDTA-Blutes in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben. Der Ansatz wurde für etwa 15 Sekunden auf dem Vortex gemischt und anschließend 10 Minuten bei 52 °C in einem Wasserbad inkubiert. Die im Kit enthaltenen QIAamp-Säulenfilter besitzen eine Silicagel Membran, an welcher die Nukleinsäuren im nächsten Schritt binden. Dazu wurden 200 µl Ethanol (96 %) zum Ansatz gegeben und erneut 15 Sekunden gemischt. Die Säulenfilter wurden auf 2 ml Auffangröhrchen gestellt, der gesamte Ansatz aufgetragen und eine Minute bei 8.000 rpm zentrifugiert. Das Auffangröhrchen mit dem Eluat konnte verworfen werden. Die DNA befand sich gebunden an die Membran im Säulenfilter.

Es folgten zwei Waschschr itte zur Entfernung von übriggebliebenen Zellbestandteilen, wie z.B. Proteinen und bivalenten Kationen, welche inhibierend auf die spätere Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wirken können. Je Schritt wurden ein neues Auffangröhrchen (unter dem Säulenfilter) und 500 µl Waschpuffer 1 bzw. 2 eingesetzt. Die Zentrifugationen wurden bei 8.000 rpm für eine Minute und bei 13.000 rpm für drei Minuten durgef hrt. Nach dem zweiten Waschschr itt wurde noch vorhandene Flüssigkeit am Rand des S ulenfilters mit der Pipette entfernt und der Filter auf ein neues 1,5 µl Eppendorf-Gefäß gestellt.

Im finalen Elutionsschr itt wurden 200 µl Elutionspuffer auf den Säulenfilter gegeben, zunächst bei Raumtemperatur für fünf Minuten inkubiert und anschließend bei 13.000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Die DNA, die zuvor an den Filter gebunden hatte, befand sich nun im Eluat und der Säulenfilter konnte verworfen werden. Alle DNA-Proben wurden nach diesem Verfahren extrahiert und anschließend bei 4  C gelagert.

2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) ist seit ihrer Entwicklung im Jahr 1983 durch den amerikanischen Biochemiker Kary B. Mullis die Standardmethode zur Amplifizierung von Nukleinsäuren in der Molekularbiologie. In kurzer Zeit kann jeder beliebige DNA-Abschnitt, dessen flankierende Sequenz bekannt ist, *in vitro* vervielf tigt werden. Vorteil ist, dass das interessierende Teilstück in Form von gesamtgenomischer DNA vorliegen kann und nur eine geringe Menge DNA-Ausgangsmaterial exponentiell zu DNA-Fragmenten gleicher Länge vervielf tigt wird. (Mullis, 1990; Lottspeich & Engels, 2012, p. 827)

Zunächst wird das zu vervielf tigende, aus Zellen, Bakterien oder Viruspartikeln extrahierte und gereinigte DNA-Material benötigt. Die vier Desoxyribonukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) liegen zumeist in einem Mix im äquimolaren Verhältnis vor. Als Startermolekül der PCR dienen Oligonukleotide von etwa 20 Basenpaaren (bp) Länge, sog. Primer. Es wird ein Vorwärts- und Rückwärts-Primer für den *sense*- und *antisense*-Strang benötigt. Die Primer werden so gewählt, dass sich das interessierende Teilstück der DNA zwischen ihnen befindet. Dabei ist darauf zu achten, dass die Primer wenig repetitive Sequenzen, Sekundärstrukturen und Bereiche gleicher Basen enthalten und die Differenz der Primer-Schmelztemperaturen max. 5  C beträgt (GIT Labor-Fachzeitschrift, 2017).

Bei dem am häufigsten verwendeten Enzym Taq-Polymerase handelt es sich um die DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus*, die in der Lage ist, doppelsträngige DNA bei 72 °C zu verlängern und zudem bei hohen Temperaturen von 95 °C eine gute Thermostabilität besitzt. Der eingesetzte Puffer richtet sich nach der verwendeten Polymerase und sollte Magnesiumchlorid enthalten (DNA-Polymerasen benötigen für ihre Enzymaktivität zweiwertige Ionen). (Lottspeich & Engels, 2012, pp. 831-832)

Die PCR ist eine thermozyklische Reaktion mit wiederkehrenden Zyklen einer bestimmten Temperatur und Zeitdauer. Das in dieser Arbeit verwendete dreistufige Protokoll ist beispielhaft für Exon 3 in Abbildung 2.1 dargestellt.

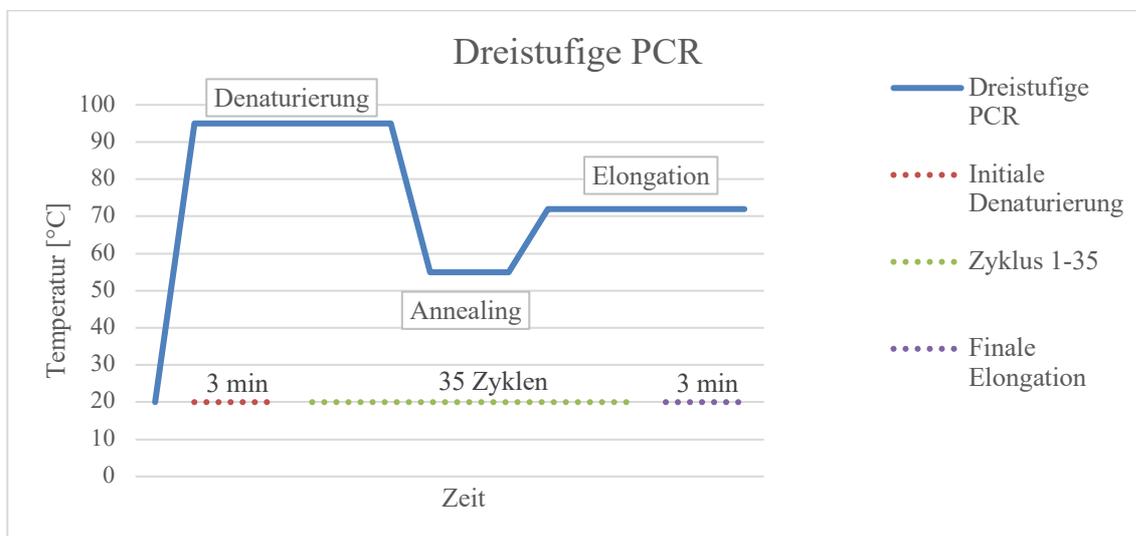


Abbildung 2.1 Dreistufige PCR, modifiziert nach (Lottspeich & Engels, 2012, p. 830)

Pro Zyklus wird der DNA-Gehalt verdoppelt, es kommt bei n Zyklen zu einer exponentiellen Amplifikation der DNA um den Faktor 2^n . Nach 30-35 Zyklen erhält man genügend Produkt, um weiterarbeiten zu können. (Lottspeich & Engels, 2012, p. 831)

Im Folgenden sind die Schritte der PCR genauer erläutert (s. Abbildung 2.2, S. 30).

Denaturierung: Bei 92-98 °C wird die DNA in ihre Einzelstränge aufgespalten. Im ersten Zyklus sollte dieser Schritt ca. 3-10 Minuten dauern. In jedem weiteren Zyklus reichen 10-60 Sekunden, um die DNA vollständig zu denaturieren.

Annealing: Die Primer lagern sich im zweiten Schritt an die Sequenz der DNA komplementär an. Dabei wird die Temperatur in dem für die Primer spezifischen Bereich gehalten. Diese Annealingtemperatur wird durch die beiden Primer-

Schmelztemperaturen bestimmt und sollte 5-20 °C über ihnen liegen (GIT Labor-Fachzeitschrift, 2017).

Elongation: Bei 72 °C besitzt die Taq-Polymerase ihr Temperaturoptimum und verlängert die DNA durch Nukleotid-Einbau beginnend am freien 3'-OH-Ende der Primer. Pro Minute können so ca. 1000 Basenpaare (1 kb) eingebaut werden. Nach dem letzten Zyklus schließt sich eine letzte, längere Elongation von einigen Minuten an. (Lottspeich & Engels, 2012, pp. 827-833)

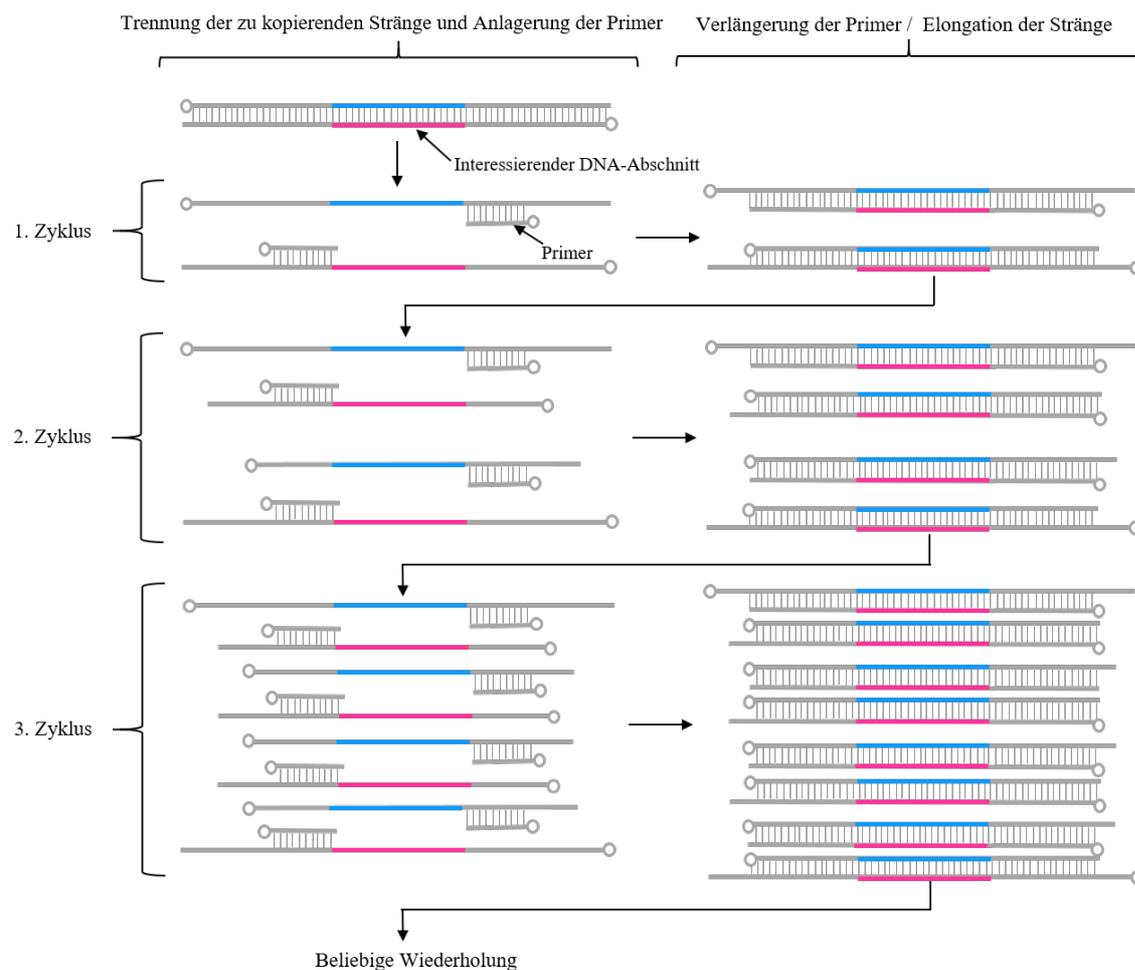


Abbildung 2.2 Schema der PCR, nach Michael Goodman, in (Mullis, 1990, p. 65)

Durchführung:

Es wurde ein PCR-Reaktionsansatz bestehend aus Taq-Polymerase, 10x PCR-Puffer (beides im Taq PCR Core Kit des Herstellers Qiagen enthalten), Nukleotidmix, Betain, F- und R-Primer (je 50 µM) und Aqua dest. hergestellt (s. Tabelle 2.7). Zu 1 µl der Patienten-DNA wurden je 40 µl des PCR-Mixes in 0,5 µl Multiwell-8er-Streifen gegeben.

Tabelle 2.7 PCR-Reaktionsansätze für fünf Proben (Gesamtvolumen 200 μ l)

	Exon 1	Exon 2	Exon 3	Exon 4	Exon 5	Exon 6
10x PCR-Puffer	20 μ l					
Nukleotidmix	40 μ l					
5M Betain	20 μ l	–	20 μ l	–	–	–
Primer F	3 μ l					
Primer R	3 μ l					
Taq-Polymerase	2 μ l					
Aqua dest.	112 μ l	132 μ l	112 μ l	132 μ l	132 μ l	132 μ l

10x PCR-Puffer enthält 15 mM Magnesiumchlorid, im finalen Mix sind es 1,5 mM. Die einzelnen Nukleotide liegen in der Konzentration 1,25 mM im Nukleotidmix vor. Betain senkt den Schmelzpunkt, verbessert das Primer-Annealing und erhöht die Ausbeute.

Die Reaktionsbedingungen wurden, abgestimmt auf jedes Exon, im Thermocycler eingestellt (s. Tabelle 2.8). Nach 35 Zyklen war ausreichend PCR-Produkt vorhanden. Es wurden anschließend analytische Agarosegele zur Kontrolle des DNA-Gehalts angefertigt.

Tabelle 2.8 PCR-Bedingungen der *ELOVL4*-Exons

Exon	Initiale Denaturierung	Denaturierung	Annealing	Elongation	Letzte Elongation
1	95 °C – 3 min	94 °C – 30 s	61 °C – 30 s	72 °C – 40 s	72 °C – 3 min
2	95 °C – 3 min	94 °C – 30 s	61 °C – 30 s	72 °C – 40 s	72 °C – 3 min
3	95 °C – 3 min	94 °C – 30 s	55 °C – 30 s	72 °C – 40 s	72 °C – 3 min
4	95 °C – 3 min	94 °C – 30 s	55 °C – 30 s	72 °C – 35 s	72 °C – 3 min
5	95 °C – 3 min	94 °C – 30 s	55 °C – 30 s	72 °C – 40 s	72 °C – 3 min
6	95 °C – 3 min	94 °C – 30 s	58 °C – 30 s	72 °C – 40 s	72 °C – 3 min

2.2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Größenauftrennung von Nukleinsäuren. In diesem Fall wurde sie zur Erfolgskontrolle der PCR, einer Abschätzung des DNA-Gehalts und der Reinheit der Probe sowie der Detektion eventueller Störbanden eingesetzt.

Agarose ist ein aus den Monomeren D-Galactose und 3,6-Anhydro-L-Galactose bestehendes Polysaccharid und wird zur elektrophoretischen Trennung von Nukleinsäuren verwendet. Dazu muss Agarose mit einem ionischen Puffer aufgekocht und in einen Gelschlitten gegossen werden. Während der Abkühlung vernetzen sich die Zuckerpolymere und bilden, je nach Konzentration der Agarose im Gel, unterschiedlich große Poren aus (150 nm bei einem 1%igen Gel). Die aufzutrennenden DNA-Fragmente werden in Geltaschen eingebracht und anschließend eine Spannung angelegt, sodass die negativ geladenen Nukleinsäuren das Gel in Richtung Anode durchwandern. Nukleinsäuren sind über einen weiten pH-Bereich immer negativ geladen und besitzen eine gleichbleibende Ladungsdichte (Verhältnis von Molekülgröße und Ladung ist konstant). Die Laufstrecke ist somit von der Molekülgröße der Nukleinsäuren abhängig. Große Fragmente werden beim Durchtritt durch die Gelporen gebremst, während kleine Fragmente das Gel schneller passieren können. Es besteht eine lineare Abhängigkeit des Logarithmus der Fragmentlänge (in bp) und der Laufstrecke des Fragmentes (in cm) im Gel. Abhängig vom Agarosegehalt und der Porengröße des Gels werden unterschiedliche Größenbereiche optimal aufgetrennt. Je kleiner die aufzutrennenden DNA-Fragmente, desto höher konzentriert sollte das Agarosegel sein. Die verwendeten 1,5%igen Gele besitzen den optimalen Auftrennungsbereich bei 200-300 bp Länge der DNA-Fragmente. (Lottspeich & Engels, 2012, pp. 276; 749-753)

Die der DNA-Probe zugesetzten Farbstoffe im Ladepuffer zeigen an, wie weit die Banden gewandert sind. Um die Nukleinsäuren auf dem Gel sichtbar zu machen, wird Ethidiumbromid verwendet. Es interkaliert in die Doppelhelix der DNA und emittiert in diesem gebundenen Zustand unter Anregung mit ultraviolettem Licht sichtbares rotes Licht (Fluoreszenz).

Durchführung:

Zur Erfolgskontrolle der PCR wurden 1,5%ige Agarosegele verwendet. Dazu wurden 1,5 g Agarose mit 100 ml 1x TBE-Puffer in einem Erlenmeyerkolben unter gelegentlichem Schwenken in der Mikrowelle aufgekocht. Sobald sich die Agarose

vollständig aufgelöst hatte und die Lösung klar wurde, konnten drei Tropfen Ethidiumbromid hinzugefügt werden. Es wurden kleine Gelschlitten (35 ml) und Gel-Kämme mit zehn kleinen Taschen verwendet. Nach einem kurzen Abkühlen konnte das Gel in die vorbereiteten Gelschlitten gegossen werden und war nach ca. 30 Minuten gebrauchsfertig. Anschließend wurden die Kämme entfernt und das Gel in eine horizontale Elektrophorese-Kammer gelegt. Als Laufpuffer diente 1x TBE-Puffer, der das Gel vollständig überdecken sollte.

Von den PCR-Produkten wurden pro Probe 3 μ l eingesetzt und mit je 1 μ l Agarosegel-Ladepuffer, der zur Blaufärbung und Beschwerung der Probe diente, versetzt. Die Ansätze wurden mit Aqua dest. auf 10 μ l aufgefüllt und in die Taschen des Gels gegeben. Zur Größenbestimmung der PCR-Produkte wurde in eine der Taschen 5 μ l des pUC/DdeI-Größenstandard eingebracht (zur Herstellung der Größenstandards siehe Kapitel 2.1.3). Bei einer angelegten Spannung von 60-80 V waren die PCR-Fragmente nach etwa 30-45 Minuten ausreichend aufgetrennt.

Im UV-Transilluminator wurden die Banden im Gel sichtbar gemacht und für die Labordokumentation fotografiert (s. Abbildung 2.3). Bei guter Qualität konnten die PCR-Produkte direkt aufgereinigt (s. u.) oder für den späteren Gebrauch bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren werden.

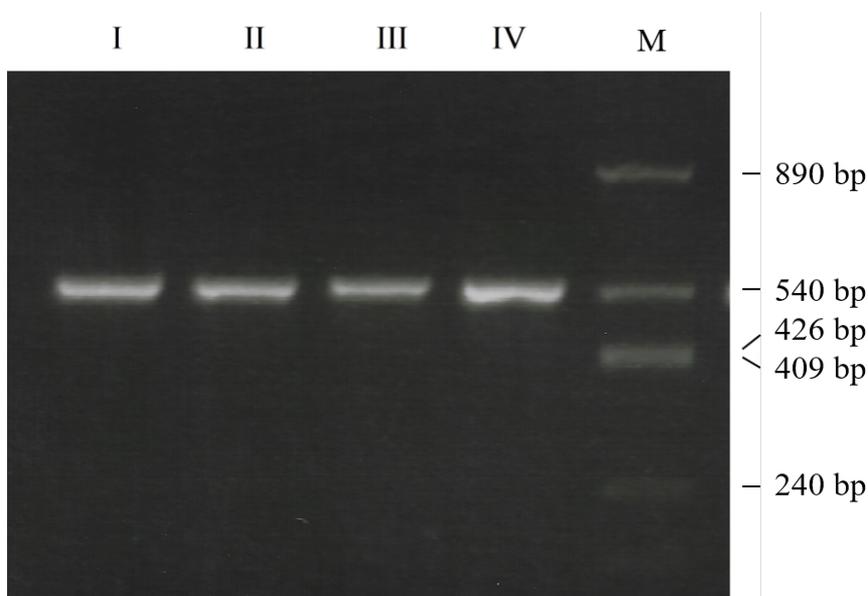


Abbildung 2.3 Beispielbild eines Agarosegels

Dargestellt sind vier *ELOVL4*-PCR-Produkte des Exon 1. Die Größe der PCR-Produkte beträgt 547 bp. Als Größenstandard (M) diente pUC/DdeI.

2.2.5 Aufreinigung der PCR-Produkte

War die PCR erfolgreich und die erhaltene DNA-Menge ausreichend, konnten die PCR-Produkte zur Weiterverarbeitung entweder über einen Säulen-Filter (OLS-Kit) oder den Exo-SAP-IT-Verdau aufgereinigt werden. Beide Verfahren reinigen das PCR-Produkt von überschüssigen Primern, Nukleotiden und gesamtgenomischer DNA.

2.2.5.1 Reinigunskit

Eine einfache Methode ist die Reinigung der Ansätze über das Straight-PCR-OLS Kit der Firma OMNI Life Science. Es wird jeweils der gesamte PCR-Ansatz, gemäß den Angaben des Herstellers, aufgereinigt. Anschließend bietet sich die Möglichkeit, erneut ein analytisches Agarosegel zur Kontrolle des DNA-Gehalts anzufertigen.

Der im Kit enthaltene Spin-Filter wurde auf ein Auffang-Röhrchen (Receiver-Tube) gesteckt. 500 µl des Bindepuffers (im Kit enthalten) sowie das gesamte PCR-Produkt wurden auf den Filter gegeben und durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette gemischt. Es wurde eine Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die DNA war somit an den Filter gebunden. Das Filtrat und das Receiver-Tube konnten verworfen werden.

Der Spin-Filter wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß (Elution-Tube) überführt. Abhängig von der Menge des PCR-Produktes wurde Elutionspuffer auf die Filtermitte gegeben (meist 30 µl) und bei Raumtemperatur für fünf Minuten inkubiert. Eine zweite Zentrifugation bei 7.000 rpm schloss sich an. Der Spin-Filter wurde verworfen. Das gereinigte PCR-Produkt befand sich nun im Elution-Tube und konnte bei -20 °C zur späteren Weiterverarbeitung gelagert werden.

2.2.5.2 Exo-SAP-IT Verdau

Das Exo-SAP-IT PCR Product Cleanup des Herstellers Affymetrix reinigt PCR-Produkte enzymatisch in einem Schritt. Es enthält Exonuklease I (Exo) zum Abbau überschüssiger Primer und Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP) zur Dephosphorylierung von Nukleotiden (Affymetrix, 2016). Vorteil dieses Verfahren ist, dass viele PCR-Produkte gleichzeitig bearbeitet werden können (meist 16 Proben).

Es wird nur die für die spätere Sequenzierung benötigte Menge der PCR-Produkte verwendet. Abhängig von dem zuvor bestimmten DNA-Gehalt wurden 2–5 µl je PCR-Produkt eingesetzt. Pro Ansatz benötigte man 0,8 µl des Exo-SAP-IT Enzyms. Der Ansatz wurde mit Aqua dest. auf 5 µl aufgefüllt und in Multiwell-Streifen gegeben. Es

folgten zwei Inkubationen von je 15 Minuten bei 37 und 80 °C. In der ersten Inkubation wurden Primer abgebaut und Nukleotide phosphoryliert. Die zweite Inkubation (bei 80 °C) diente der Inaktivierung der Enzyme. Die gereinigten PCR-Produkte konnten direkt zur Sequenzierung weiterverwendet werden.

2.2.6 Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung dient der Identifizierung der Nukleotid-Abfolge in einem DNA-Strang und beruht auf dem von Fred Sanger im Jahr 1977 vorgestellten Sanger-Verfahren. Prinzip dieses sog. Didesoxyverfahren ist die enzymatische Synthese von basenspezifisch terminierten DNA-Fragmenten, die anschließend nach ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt werden. Durch das entstehende Bandenmuster kann die Sequenz der DNA rekonstruiert werden. (Lottspeich & Engels, 2012, p. 864)

Entscheidend für die Entwicklung der Sanger-Sequenzierung ist die Entdeckung, dass synthetisch hergestellte 2',3'-Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTPs) die Elongation der DNA durch DNA-Polymerasen inhibieren. Wird ein solches ddNTP von der Polymerase in den wachsenden DNA-Strang eingebaut, kann dort keine weitere Verlängerung stattfinden, da dem Didesoxynukleotid die 3'-Hydroxylgruppe der Ribose fehlt. Der Strang ist terminiert.

Der ursprüngliche Ablauf der Sequenzierung sieht zuerst eine Denaturierung der DNA von drei Minuten bei 100 °C in ihre Einzelstränge vor. Es folgt eine 30-minütige Inkubation bei 67 °C, derweil die Primer komplementär an die DNA binden. Anschließend wird die Reaktion auf vier Ansätze aufgeteilt, welche die DNA-Polymerase, die vier natürlichen Desoxynukleotide und jeweils eines der Didesoxynukleotide (ddNTPs) enthalten. Die DNA-Polymerase baut statistisch, neben den natürlichen dNTPs, auch ddNTPs in den wachsenden DNA-Strang ein. Ein eingebautes ddNTP terminiert die Elongation und es entstehen Fragmente unterschiedlicher Länge mit dem ddNTP des jeweiligen Ansatzes am Ende. Die radioaktiv markierten Reaktionsprodukte (ursprünglich P-32 markiertes dATP) können in einem denaturierenden Polyacrylamidgel ihrer Größe nach aufgetrennt und mittels Autoradiographie dargestellt werden. Aus der Folge der Banden der vier Ansätze lässt sich die Nukleotid-Abfolge ablesen. (Sanger, et al., 1977)

In dieser Arbeit wurde die Cycle-Sequenzierung angewendet. Es handelt sich um eine zyklisch durchlaufene Sequenzierungs-Reaktion, die – analog zur PCR – mit

thermostabiler DNA-Polymerase im Thermocycler durchgeführt wird. In einem Ansatz bestehend aus Template-DNA, einem Oligonukleotidprimer, DNA-Polymerase, Puffer und einem dNTP-/ddNTP-Gemisch wird die DNA amplifiziert und sequenziert. Im Gegensatz zur PCR, bei der zwei unterschiedliche Primer zum Einsatz kommen, handelt es sich bei der Cycle-Sequenzierung um eine lineare Amplifikation der DNA. Jedes der vier Didesoxynukleotide ist mit einem anderen Fluoreszenz-Farbstoff markiert. Dies hat zum Vorteil, dass die Reaktion nicht auf vier Ansätze aufgeteilt werden muss und auf Radioaktivität verzichtet werden kann. (Lottspeich & Engels, 2012, pp. 859-875)

Durchführung:

Es wurde das BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit des Herstellers Applied Biosystems verwendet. Ein Sequenzier-Ansatz wurde nach Angaben des Herstellers in 0,5 µl Multiwell-8er-Streifen gegeben (s. Tabelle 2.9).

Tabelle 2.9 Sequenzier-Ansatz (pro Probe)

Reagenz	Menge [µl]
PCR-Produkt	5
Sequenzier-Puffer 5x	1
Forward-/ Reverse-Primer 10 µM	1,5
ABI-Sequenzier-Mix (u.a. Polymerase)	2,5
Aqua dest.	5

Tabelle 2.10 Sequenzier-Bedingungen der *ELOVL4*-Exons

Exon	Initiale Denat.	Denaturierung	Annealing	Elongation
1	94 °C – 2 min	94 °C – 10 s	61 °C – 30 s	50 °C – 3 min
2	94 °C – 2 min	94 °C – 10 s	61 °C – 30 s	50 °C – 3 min
3	94 °C – 2 min	94 °C – 10 s	55 °C – 30 s	50 °C – 3 min
4	94 °C – 2 min	94 °C – 10 s	55 °C – 30 s	50 °C – 3 min
5	94 °C – 2 min	94 °C – 10 s	55 °C – 30 s	50 °C – 3 min
6	94 °C – 2 min	94 °C – 10 s	58 °C – 30 s	50 °C – 3 min

In 25 repetitiven Zyklen von Primer-Denaturierung, Primer-Annealing und Elongation wurde die DNA sequenziert (s. Tabelle 2.10). Die Auswertung der Sequenzierung erfolgte im Sequencer per Kapillarelektrophorese und Fluoreszenzanalyse. Die Abfolge der Farbsignale entspricht der Nukleotidsequenz der DNA.

2.2.6.1 Aufreinigung der Sequenzierungsprodukte

Vor der Kapillarelektrophorese wurden die Sequenzierungsprodukte durch Gelfiltration mittels Sephadex-Säulen von Primern und Nukleotiden gereinigt. Dazu wurden pro Sequenzierungsprodukt 350 µl gequollenes Sephadex G-50 Superfine in die Wells einer Mikrotiterplatte gegeben und zwei Minuten bei 2100 rpm zentrifugiert. Das Eluat in der unteren Platte wurde verworfen und eine neue Elutionsplatte verwendet. Anschließend wurde das gesamte Sequenzierungsprodukt auf die Sephadex-Säule gegeben und erneut zwei Minuten bei 2100 rpm zentrifugiert. Die gereinigten Sequenzierungsprodukte befanden sich im Eluat der Elutionsplatte und konnten in einen Multiwell-Streifen überführt werden.

Pro Sequenzierung wurde 10 µl deionisiertes Formamid hinzugegeben. Es stabilisiert die Sequenzierungsprodukte und verhindert das Ausbilden von Sekundärstrukturen, die die Kapillarelektrophorese stören können.

2.2.7 Sequenzanalyse und Datenbanken

Die Sequenzierungsprodukte wurden im Sequencer 3130xl Genetic Analyzer des Herstellers Applied Biosystems per Kapillarelektrophorese aufgetrennt und einer Fluoreszenzanalyse zugeführt. Im Detektor wurden die Farbsignale der mit Fluoreszenzfarbstoff beladenen Didesoxynukleotide erkannt und daraus mittels der Gerätesoftware ein Elektropherogramm, von welchem die Nukleotid-Abfolge abgelesen werden konnte, erstellt.

Nach einer kurzen Durchsicht mit der frei verfügbaren Software Finch TV des Herstellers Geospiza wurden die Sequenzen zufriedenstellender Qualität mit dem Programm SeqScape (Version 2.5) des Herstellers Applied Biosystems bearbeitet (s. Abbildung 2.4). Die Software analysiert die Basenabfolge der DNA und ist in der Lage, Sequenzvarianten zu identifizieren.

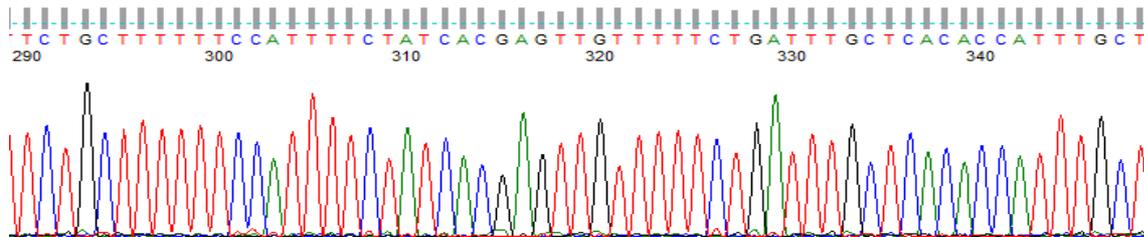


Abbildung 2.4 Elektropherogramm einer Beispielsequenz in Finch TV aus Exon 6

Die Sequenzen wurden mit der Referenzsequenz der Datenbank Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org>, Release 104, Mai 2021) des European Molecular Biology Laboratory's European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) verglichen. Dadurch konnten bereits bekannte und neue Varianten identifiziert werden. Das Ensembl-Projekt wurde 1999 ins Leben gerufen, um Sequenz-Informationen des menschlichen Genoms frei verfügbar zu machen und enthält eine stetig wachsende Anzahl an Daten von Genomen unterschiedlicher Organismen. (Howe, et al., 2021)

Gefundene Varianten konnten mit der Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>) des National Center for Biotechnology Information (NCBI) genauer analysiert werden. Die dbSNP-Datenbank ist eine öffentliche Datenbank kurzer Sequenzvarianten wie SNPs, kleine Multibasendeletionen oder -Insertionen und Mikrosatelliten-Repeats. Es werden Sequenz-Daten von einzelnen Forschern sowie großer Sequenzier-Projekte (wie das 1000 Genomes Project, Stand 2.504 Genome) akzeptiert. Zu jeder Variante finden sich Informationen zu Kontext, Häufigkeit, klinischer Signifikanz und den Übermittlern. (Sherry, et al., 2001; The 1000 Genomes Project Consortium, et al., 2015)

In silico Vorhersagen zur Bewertung des Effektes gefundener Sequenzvarianten auf das ELOVL4-Protein wurden mit MutationTaster (Schwarz, et al., 2014) (<http://www.mutationtaster.org>), PolyPhen-2 (Adzhubei, et al., 2013) (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>) und PROVEAN (Choi, et al., 2012) (<http://provean.jcvi.org>) durchgeführt. Diese bioinformatischen Werkzeuge geben Prognosen über mögliche schädliche Auswirkungen der Sequenzänderung. Sie eignen sich besonders zur Interpretation großer Datenmengen von genetischen Varianten, welche bei modernen Sequenzierungs-Projekten (z.B. Exom- und Genom-Sequenzierung) entstehen.

MutationTaster bspw. arbeitet mit Sequenzvarianten auf DNA-Ebene. Verschiedene Tests und Eigenschaften der Sequenzänderungen werden in die auf einer Bayes-Statistik

beruhenden Berechnungen einbezogen. Neben Informationen zu Spleißstellen, Proteineigenschaften und Grad der Konservierung der Sequenz, werden auch Häufigkeiten der analysierten Varianten in großen Datenbanken (wie das 1000 Genomes Project) angegeben.

PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2) gibt Prognosen über den möglichen Einfluss einer Aminosäure-Substitution auf die Stabilität und Funktion menschlicher Proteine unter Verwendung von strukturellen und phylogenetischen Betrachtungen der Sequenzänderung. So fließen in die Berechnungen der Vorhersage-Scores neben Alignment-Analysen auch Informationen zur 3D-Proteinstruktur, Bindungsstellen und funktionellen Bereichen des Proteins (z.B. von der UniProtKB/Swiss-Prot Datenbank (The UniProt Consortium, 2017)) ein. Einige strukturelle Analysen von PolyPhen-2 basieren auf externen Scores. Zur Evaluation von möglichen funktionellen Effekten einer Substitution auf TM verwendet PolyPhen-2 z.B. den PHAT trans-membrane specific matrix score (Ng, et al., 2000).

Der PROVEAN-Score (Protein Variation Effect Analyzer) misst die Änderung der Proteinsequenz auf Basis von Referenzsequenzen und unter Einbezug von Sequenzhomologen der NCBI-Proteindatenbank. Dabei beschränkt sich die Prognose nicht nur auf einzelne Aminosäure-Substitutionen, sondern kann auch auf *in-frame* Insertionen, Deletionen und multiple Aminosäure-Substitutionen angewandt werden.

3. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 61 anonymisierte Patientenproben auf das Vorhandensein von Sequenzveränderungen im *ELOVL4*-Gen untersucht. Es handelt sich überwiegend um deutsche Patienten, deren DNA nach einer genetischen Beratung und Einverständniserklärung gemäß Gendiagnostikgesetz (GenDG) im Institut für Humangenetik Gießen asserviert wurden. Die Patienten zeigten allesamt das klinische Bild einer spinocerebellären Ataxie und wurden zuvor negativ auf Loci für SCA1–3, SCA6–8, SCA10–14, SCA17, SCA19, SCA23, SCA27, SCA28 und SCA38 getestet. Die sechs codierenden Exons des *ELOVL4*-Gens sowie die angrenzenden intronischen Bereiche wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert und anschließend sequenziert. Die Auswertung erfolgte über die Software SeqScape (Version 2.6) des Herstellers Applied Biosystems. Referenzsequenzen wurden der Gendatenbank Ensembl Genome Browser entnommen (Release 104, Mai 2021). Alle nachfolgenden Daten zur MAF (minor allele frequency, Allelfrequenz des selteneren Allels) in Europa oder global sind dem 1000 Genomes Project (Phase 3) über Ensembl oder dbSNP entnommen.

Der Begriff **Mutation** ist definiert als Veränderung der Nukleotidsequenz, während **Polymorphismus** für Veränderungen mit einer Häufigkeit von $\geq 1\%$ steht. Beide Begriffe werden an anderen Stellen jedoch auch für pathogene bzw. benigne Sequenzänderungen verwendet. Um Verwechslungen zu vermeiden, werden im Folgenden die neutralen Begriffe **Variante** oder **SNV** (Einzelnukleotid-Variante, single nucleotide variant) für Veränderungen der DNA-Sequenz verwendet. Dies entspricht den aktuellen Empfehlungen des American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) (Richards, et al., 2015). Die Nomenklatur der Sequenzvarianten beinhaltet außerdem die Einteilung von Varianten in fünf Klassen: Normvariante ohne klinische Relevanz (1), wahrscheinliche Normvariante (2), Variante unklarer klinischer Relevanz (3), wahrscheinlich pathogene Variante (4) und pathogene Varianten (5) (Plon, et al., 2008). Die Beifügung **wahrscheinlich** findet Gebrauch bei einer Sicherheit von mehr als 90 % (Richards, et al., 2015).

ELOVL4 befindet sich auf dem langen Arm des Chromosom 6 (6q14.1). Der Genort lautet 6:79,914,814-79,947,553. Dabei gibt die erste Zahl die Nummer des Chromosoms, hier Chromosom 6, an. Die folgenden Zahlen beziehen sich auf die absolute Basenposition des Gens im Chromosom, beginnend an der ersten Base des kurzen Armes. Das *ELOVL4*-

Gen liegt auf dem Rückwärtsstrang und wird vom Telomer zum Zentromer transkribiert. Das entstehende *ELOVL4*-Transkript besteht aus sechs Exons und umfasst 3013 bp. Der proteincodierende Bereich beinhaltet 945 bp und codiert für die Fettsäure-Elongase 4, ein 314 Aminosäuren langes Protein des Fettsäurestoffwechsels (s. Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: *ELOVL4*-Gen, -Transkript und -Protein

HGNC-Name	ELOVL4
Ensembl-Gen-ID	ENSG00000118402
Genort	6:79,914,814-79,947,553
Locus	6q14.1
Ensembl-Transkript-ID	ENST00000369816.5
Länge des Transkripts	3013 bp
Anzahl Exons	6
Länge der codierenden Sequenz	945 bp
Ensembl-Protein-ID	ENSP00000358831.4
Anzahl Aminosäuren	314

In den untersuchten 61 Patientenproben wurden elf verschiedene Sequenzvarianten nachgewiesen. Sie werden im Folgenden, beginnend bei Exon 1, dargestellt. Eine tabellarische Übersicht findet sich in Kapitel 3.7.

3.1 Auswertung Exon 1, *ELOVL4*

Das erste Exon (ENSE00001450997) des *ELOVL4*-Gens ist 374 bp lang. Die letzten 100 bp codieren für die Aminosäuren 1–34. Exon 1 trennt ein 20.798 bp langes Intron von Exon 2. Das analysierte PCR-Produkt besitzt eine Länge von 547 bp und umspannt einen kleinen Teil der 5'-UTR (untranslated region, untranslatierte Region), den nicht-codierenden und codierenden Teil des Exon 1 sowie einen kleinen Bereich des Intron 1.

Es wurden zwei bereits bekannte Sequenzvarianten im nicht-codierenden Abschnitt des Exon 1 im vorliegenden Patientenkollektiv gefunden. Sie befinden sich in der Promotorregion von *ELOVL4*, haben keinen Aminosäureaustausch zur Folge und betreffen keine Spleißstelle.

Bei den Patientenproben 980 und 1113 wurde die Variante **c.-236C>T** (rs240307) in der heterozygoten Form nachgewiesen (s. Abbildung 3.1). Der Basenaustausch von Cytosin zu Thymin liegt an Position 39 im Transkript und ist 236 bp vom codierenden Bereich des Exon 1 entfernt. Für das Patientenkollektiv ließ sich eine MAF von $T = 0,016$ bestimmen. Global liegt sie bei $T = 0,145$. In der europäischen Population tritt die Variante seltener auf ($T = 0,028$) – dennoch häufiger als im vorliegenden Patientenkollektiv.

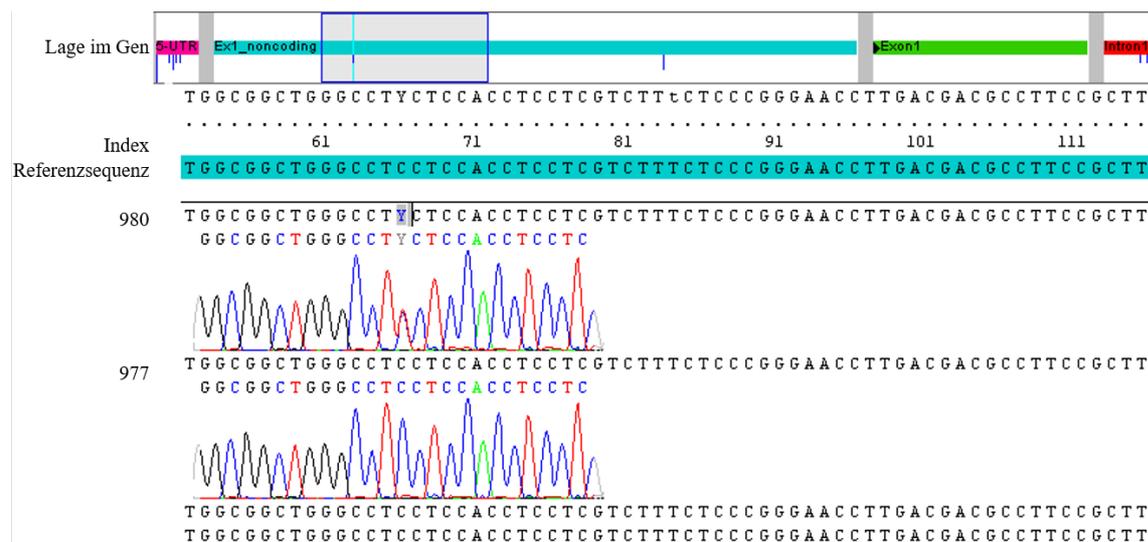


Abbildung 3.1 Sequenzausschnitt Exon 1, *ELOVL4* (c.-236C>T)

Dargestellt ist die SNV **c.-236C>T** in der heterozygoten Form (Probe 980) und der Wildtyp (Probe 977).

Bei der zweiten nachgewiesenen Variante handelt es sich um die SNV **c.-90G>C** an Position 185 des Transkripts (rs62407622). Die Variante liegt im nicht-codierenden Teil 90 bp vom Startcodon der Translation entfernt. Bei 13 Patientenproben fand sie sich in der heterozygoten Form (Genotyp G/C) und bei sechs Patienten in der homozygoten Form (Genotyp C/C, s. Abbildung 3.2). Die ermittelte MAF der Patientengruppe beträgt $C = 0,205$. Damit wurden höhere Werte als in der Gesamtbevölkerung ($C = 0,087$) und der europäischen Bevölkerung ($C = 0,184$) ermittelt. Ein Patient (Nr. 1113) war Träger beider Varianten in der heterozygoten Form (s. Kapitel 4.2.2).

In Ensembl werden beide 5'-UTR-Varianten als benigne bzw. wahrscheinlich benigne mit Assoziation zu Morbus Stargardt Typ 3 (STGD3) aufgeführt. Das bedeutet, unter diesem Phänotyp wurden sie bereits von einem oder mehreren Sequenzdaten-Übermittlern beschrieben. Ein kausaler Zusammenhang zwischen der Variante und der Erkrankung ist nicht bekannt.

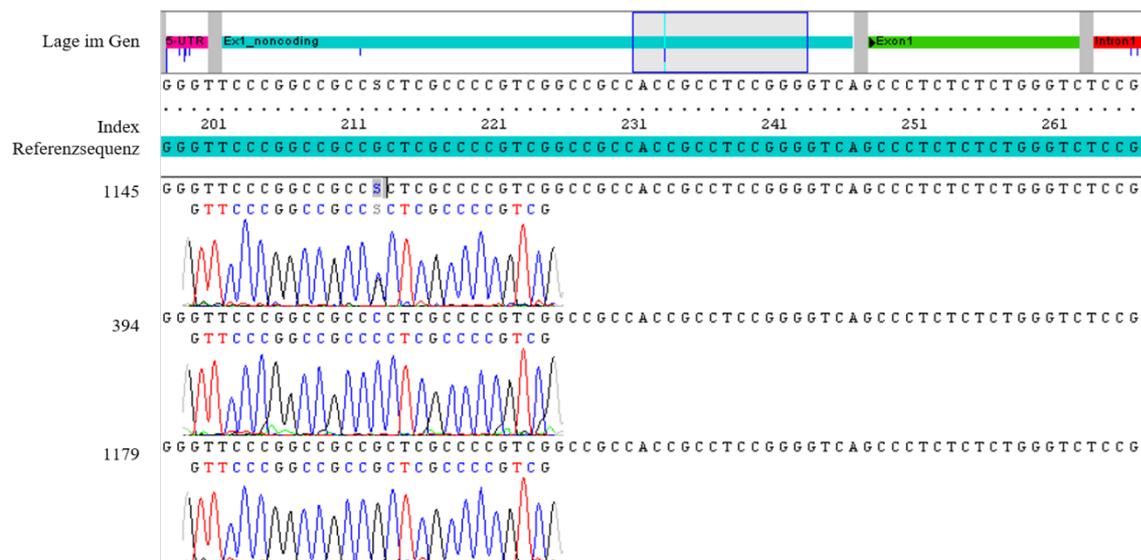


Abbildung 3.2 Sequenzausschnitt Exon 1, *ELOVL4* (c.-90G>C)

Zu sehen ist die SNV c.-90G>C in Probe 1145 (heterozygot), 394 (homozygot) und der Wildtyp (Probe 1179).

3.2 Auswertung Exon 2, *ELOVL4*

Exon 2 (ENSE00000918614) besitzt eine Länge von 188 bp und codiert für die Aminosäuren 34–96 im *ELOVL4*-Protein. Es wird durch ein 20.798 bp langes Intron von Exon 1 und durch ein 1.161 bp langes Intron von Exon 3 getrennt. Mit den verwendeten Primern konnte ein PCR-Produkt von 429 bp Länge amplifiziert und sequenziert werden. Es wurden bei der Sequenzanalyse weder in Exon 2 noch in angrenzenden intronischen Bereichen Sequenzvarianten gefunden.

3.3 Auswertung Exon 3, *ELOVL4*

Exon 3 (ENSE00000918613) ist 81 bp groß und codiert für die Aminosäuren 97–122. Die angrenzenden intronischen Bereiche sind 1.161 bp zu Exon 2 und 3.155 bp zu Exon 4 groß. Das sequenzierte PCR-Produkt des Exon 3 hat eine Länge von 389 bp.

Im angrenzenden intronischen Bereich von Exon 3 konnte eine bekannte Sequenzvariante an Position c.289-99T>C in Intron 2 nachgewiesen werden (rs343627). Sie liegt 99 bp vor Exon 3 und hat eine Transition von Thymin zu Cytosin zur Folge. Bei 16 Patienten fand sich die SNV in der heterozygoten Form (Genotyp T/C) und bei drei Patienten in der homozygoten Form (C/C, s. Abbildung 3.3). Die MAF im Patientenkollektiv beläuft sich auf C = 0,180. In der europäischen Bevölkerung wird sie mit C = 0,117 angegeben (global C = 0,323).

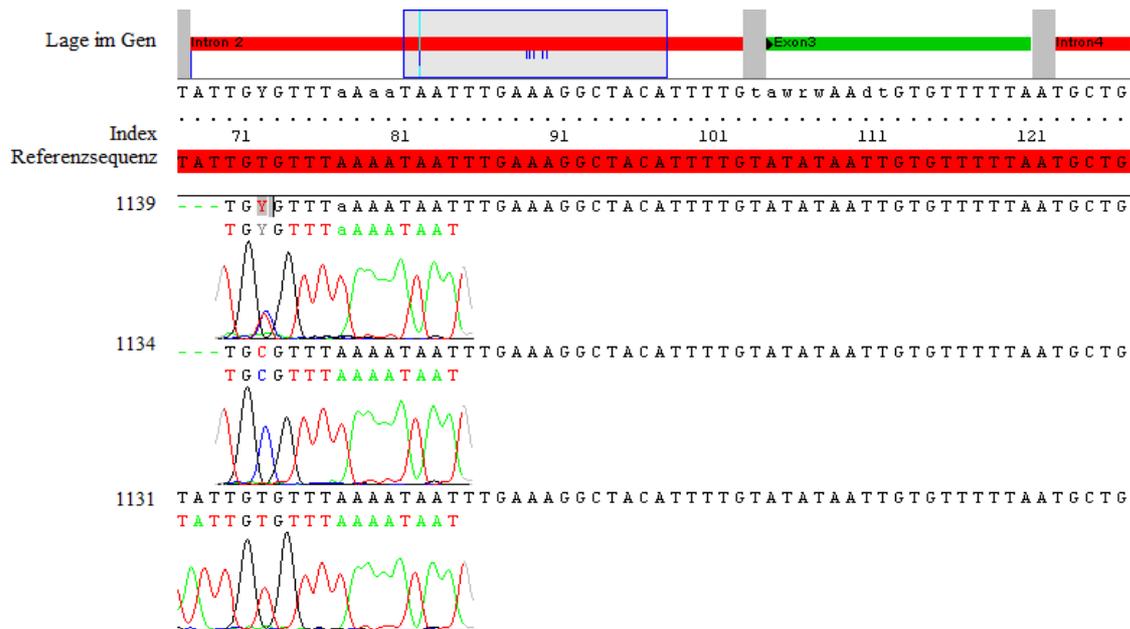


Abbildung 3.3 Sequenzausschnitt Intron 2, *ELOVL4* (c.289-99T>C)

Dargestellt ist die Variante c.289-99T>C in der heterozygoten Form (Probe 1139), in der homozygoten Form (Probe 1134) und der Wildtyp (Probe 1131).

3.4 Auswertung Exon 4, *ELOVL4*

Exon 4 (ENSE00000918612) umfasst einen 172 bp großen Bereich im *ELOVL4*-Gen. Es codiert für die Aminosäuren 123–180. Von den angrenzenden Exons wird es durch 3.155 bp und 2.077 bp lange Introns getrennt. Das untersuchte PCR-Produkt hat eine Länge von 455 bp. Es wurden zwei bekannte Sequenzvarianten in Intron 3 bzw. 4 nachgewiesen.

Bei der in Intron 3 liegenden Variante handelt es sich um die Deletions-Insertions-Variante c.370-118_370-117delCCinsGA (rs35163932). Angaben zur MAF dieser Variante fehlen in der dbSNP-Datenbank. Anstatt als Deletions-Insertions-Variante von je zwei Nukleotiden lässt sie sich synonym als zwei Substitutionen je eines Nukleotids beschreiben: c.370-118C>G und c.370-117C>A (rs7770586/-5). Die MAF für beide SNVs liegt bei G bzw. A = 0,229 in der Gesamtbevölkerung und bei G bzw. A = 0,116 in Europa. Im Patientenkollektiv konnte der betreffende Bereich nur bei etwa einem Drittel der Patientenproben beurteilt werden. Jeweils nur dann, wenn der R-Primer zur Sequenzierung verwendet wurde. Die Variante liegt 117 bp weit in Intron 3 und wurde durch den F-Primer teilweise nicht abgedeckt. Auf weiter Sequenzierungen mit dem R-Primer wurde verzichtet, da sie bekannt und nicht pathogen ist.

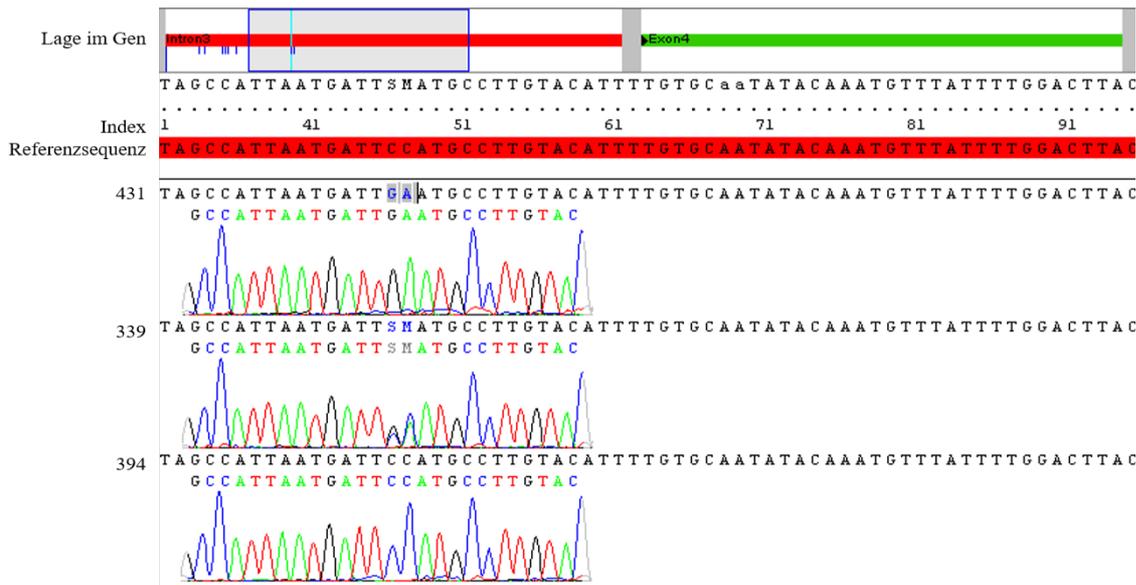


Abbildung 3.4 Sequenzausschnitt Intron 3, *ELOVL4* (c.370-118_370-117delCCinsGA)

Zu sehen ist die Insertions-Deletions-Variante **c.370-118_370-117delCCinsGA** in der homozygoten (Probe 431) und heterozygoten Form (Probe 339) sowie der Wildtyp (Probe 394).

Sie fand sich bei sechs Patientenproben, wobei zwei davon homozygote Träger des Allels waren (s. Abbildung 3.4). Jeder dieser Patienten war zugleich auch Träger zweier Varianten in Exon 6 (s. Kapitel 3.6.2).

Die bekannte SNV **c.541+60G>A** liegt 60 bp distal des Exon 4 in Intron 4 (rs45466000). Die MAF beläuft sich auf A = 0,016 global bzw. A = 0,040 in der europäischen Bevölkerung. Angaben zur klinischen Relevanz sind nicht bekannt.

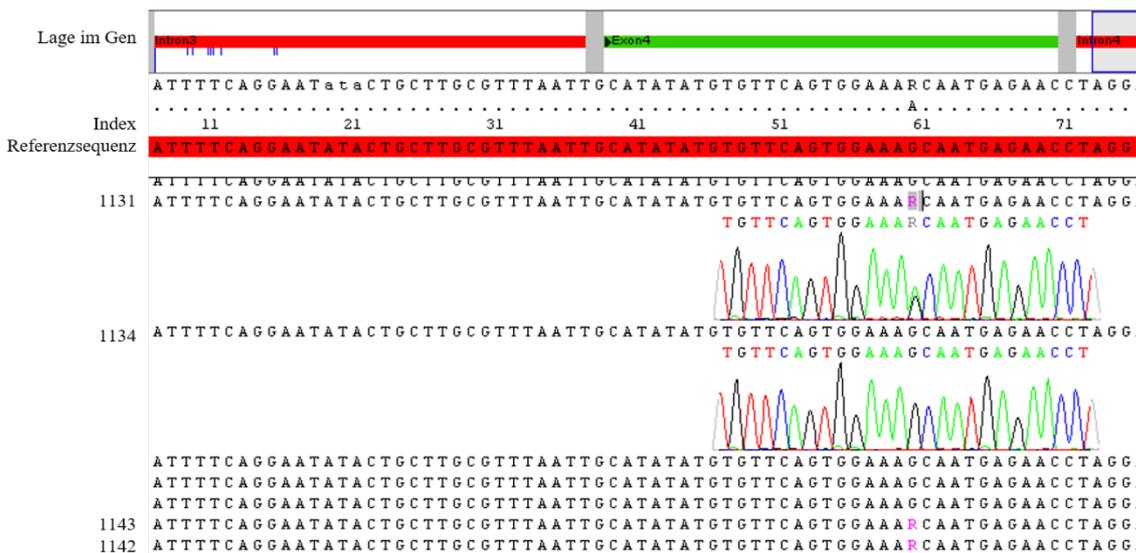


Abbildung 3.5 Sequenzausschnitt Intron 4, *ELOVL4* (c.541+60G>A)

Abgebildet ist die SNV **c.541+60G>A** (Probe 1131, 1143, 1142) und der Wildtyp (Probe 1134)

Im vorliegenden Kollektiv trat die Variante bei fünf Patienten auf je einem Allel auf (s. Abbildung 3.5). Bei sieben Proben konnte der Bereich in Intron 4 nicht beurteilt werden. Unter Berücksichtigung der ausgefallenen Proben ergibt sich eine MAF von $A = 0,046$.

3.5 Auswertung Exon 5, *ELOVL4*

Exon 5 (ENSE00000918611) ist 128 bp groß und codiert für die Aminosäuren 180–222 in *ELOVL4*. Die angrenzenden Introns sind 2.077 bp zu Exon 4 und 2.536 bp zu Exon 6 groß. In dem 408 bp umfassenden PCR-Produkt konnten weder im Exon 5 selbst noch in den beiden angrenzenden Introns Sequenzvarianten nachgewiesen werden.

3.6 Auswertung Exon 6, *ELOVL4*

Das letzte Exon (ENSE00001450988) des *ELOVL4*-Gens ist 2.070 bp groß. Die ersten 276 bp codieren für die Aminosäuren 223–314. Anschließend folgt die 3'-UTR. Es wurde nur ein Teil des Exon 6 amplifiziert und sequenziert. Das 729 bp große PCR-Produkt umfasste einen Teil des Intron 5, den codierenden Teil des Exon 6 und ca. 200 bp der 3'-UTR. Es wurden vier exonische und zwei intronische Varianten gefunden.

3.6.1 Unbekannte Variante in Exon 6

Bei Patientenprobe 975 wurde eine bisher unbekannte Missense-Variante in Exon 6 gefunden (s. Abbildung 3.6).

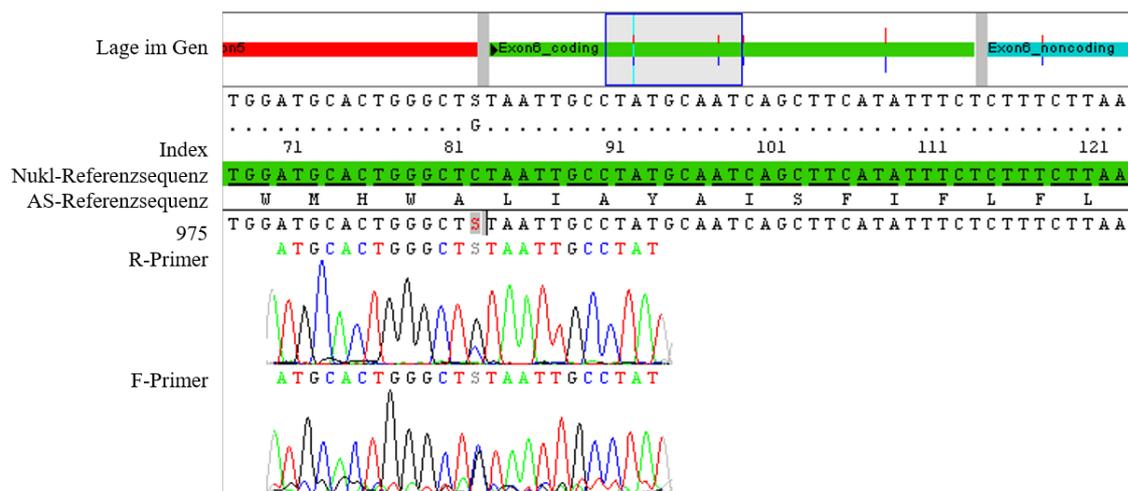


Abbildung 3.6 Sequenzausschnitt Exon 6, *ELOVL4* (c.751C>G)

Zwei unabhängige PCR-Produkte aus DNA der Patientenprobe 975 wurden mit dem R- und F-Primer sequenziert und zeigten übereinstimmende Ergebnisse. In der Sequenz des R-Primers ist der Peak des Wildtyp Allels (C) nur etwa halb so hoch. Bei der F-Primer-Sequenz sind beide Peaks (C/G) gleich hoch. Nukl: Nukleinsäure, AS: Aminosäure

Es handelt sich um einen Nukleotidaustausch an Position 751 der codierenden Sequenz: **c.751C>G**. Die Transversion von Cytosin zu Guanin bedingt einen Aminosäureaustausch im ELOVL4-Protein. An Position 251 findet sich statt Leucin die aberrante Aminosäure Valin (p.Leu251Val). Für das Patientenkollektiv errechnet sich die MAF auf G = 0,008. Eine *in silico* Analyse der Variante findet sich in Kapitel 3.8.

3.6.2 Bekannte Varianten in Exon 6

Die bereits bekannte SNV **c.800T>C** (rs148594713) konnte bei der Patientenprobe 892 nachgewiesen werden (s. Abbildung 3.7). Es handelt sich um eine Missense-Variante, welche an Position 267 des ELOVL4-Proteins zu einem Aminosäureaustausch von Isoleucin zu Threonin führt (p.Ile267Thr). Gemäß Ensembl wird die SNV als wahrscheinlich benigne bewertet. Sie findet sich in der europäischen Bevölkerung mit einer MAF von C = 0,008. Für die Patientengruppe ergibt sich der gleiche Wert.

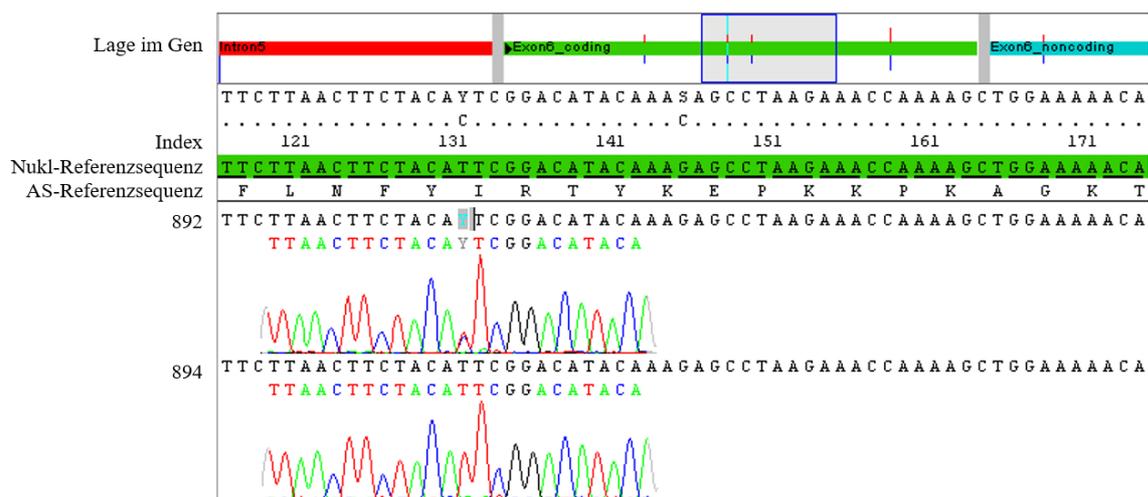


Abbildung 3.7 Sequenzausschnitt Exon 6, *ELOVL4* (c.800T>C)

Darstellung der Variante **c.800T>C** (Probe 892) und der Wildtyp (Probe 894). Nukl: Nukleinsäure, AS: Aminosäure

Bei den Patientenproben 4, 1006, 1010 und 1131 wurde die bereits bekannte Sequenzvariante **c.814G>C** in der heterozygoten Form nachgewiesen (rs148919174, s. Abbildung 3.8). Es kommt zu einem Austausch der Aminosäure Glutaminsäure an Position 272 im Protein gegen Glutamin (p.Glu272Gln). Global ist die MAF auf C = 0,001 bestimmt worden. In Europa liegt sie bei C = 0,004. Für das Patientenkollektiv wurden mit C = 0,033 höhere Werte ermittelt. Ensembl listet die Variante als wahrscheinlich benigne.

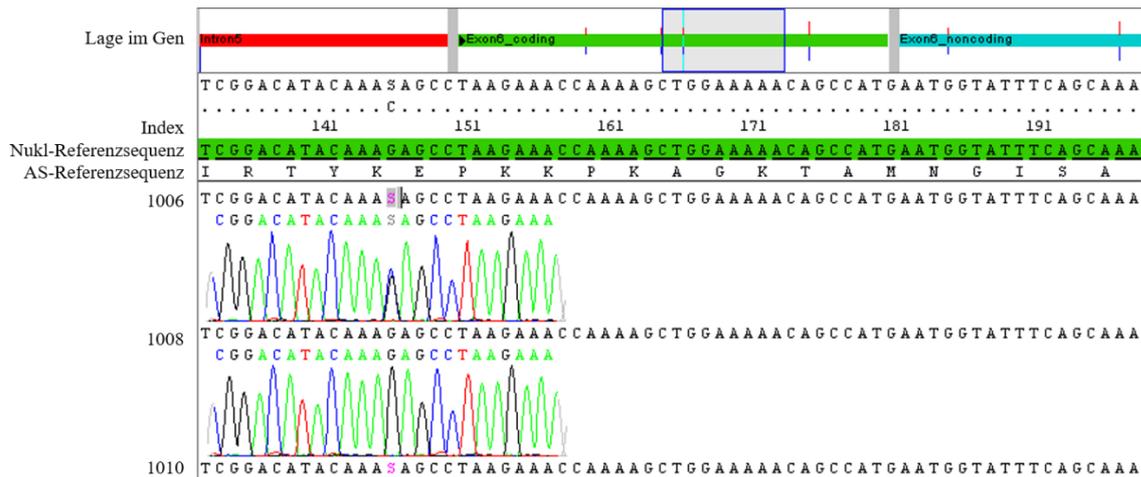


Abbildung 3.8 Sequenzausschnitt Exon 6, *ELOVL4* (c.814G>C)

Variante **c.814G>C** ist zu sehen in Probe 1006 und 1010 (Genotyp G/C). Als Vergleich ist eine Wildtyp-Sequenz (1008) abgebildet. Nukl: Nukleinsäure, AS: Aminosäure

Bei der vierten exonischen Variante handelt es sich um die Missense-Variante **c.895A>G** (rs3812153). An Position 895 der codierenden Sequenz kommt es zum Austausch von Alanin zu Guanin, der zum Einbau der Aminosäure Valin an Position 299 im *ELOVL4*-Protein führt (p.Met299Val). Auf Ensembl ist sie als benigne Variante zu finden. Die globale MAF beträgt $G = 0,242$, in Europa liegt sie bei $G = 0,115$. Die Variante fand sich bei 19 der 61 untersuchten Patientenproben, wobei drei davon homozygote Träger des Allels waren (s. Abbildung 3.9). Das macht in Summe eine ermittelte MAF von $G = 0,180$. Alle Träger dieser Sequenzveränderung waren zugleich Träger der SNV im nicht-codierenden Abschnitt von Exon 6 (c.*142G>C, s.u.). Es ist von einer gekoppelten Vererbung der beiden Sequenzvarianten und einem gemeinsamen Haplotyp auszugehen.

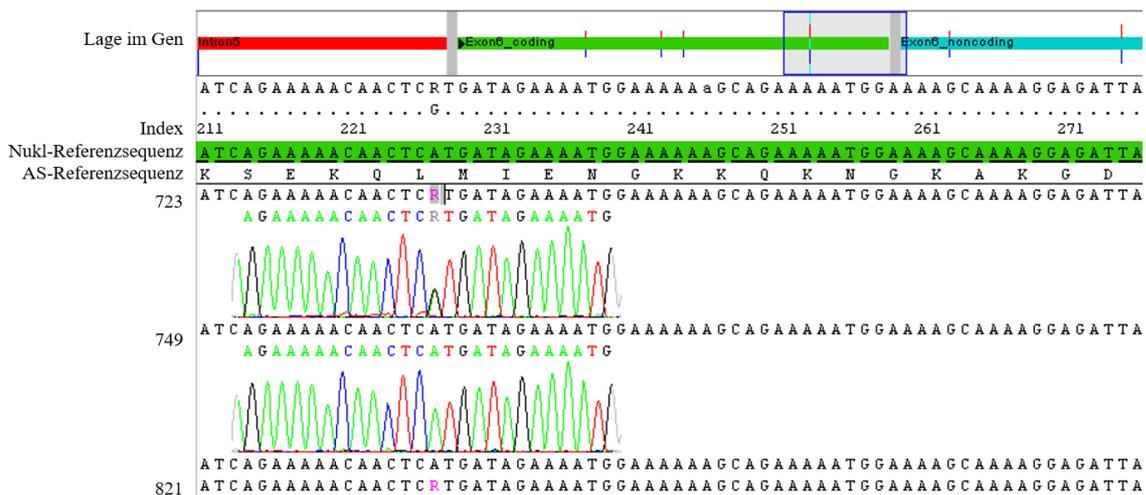


Abbildung 3.9 Sequenzausschnitt Exon 6, *ELOVL4* (c.895A>G)

Variante **c.895A>G** in Probe 723 und 821 sowie der Wildtyp in 749. Nukl: Nukleinsäure, AS: Aminosäure

Im nicht-codierenden Bereich des Exon 6 wurde bei Patient 642 die Variante **c.*32G>C** nachgewiesen (rs371941167, s. Abbildung 3.10). Die Transversion von Guanin zu Cytosin befindet sich 32 bp hinter dem Stopcodon der Translation. Die Variante ist bereits bekannt, jedoch selten. Die globale MAF ist kleiner 0,001. Bei dem vorliegenden Patientenkollektiv wurde sie mit $C = 0,008$ ermittelt. Daten zur klinischen Signifikanz sind auf Ensembl nicht vorhanden. MutationTaster bewertet die Variante als pathologisch mit möglichen Auswirkungen auf Spleißstellen. Von einer klassischen Spleißmutation ist aufgrund der Lokalisation der Variante jedoch nicht auszugehen (s. Kapitel 4.2.2).

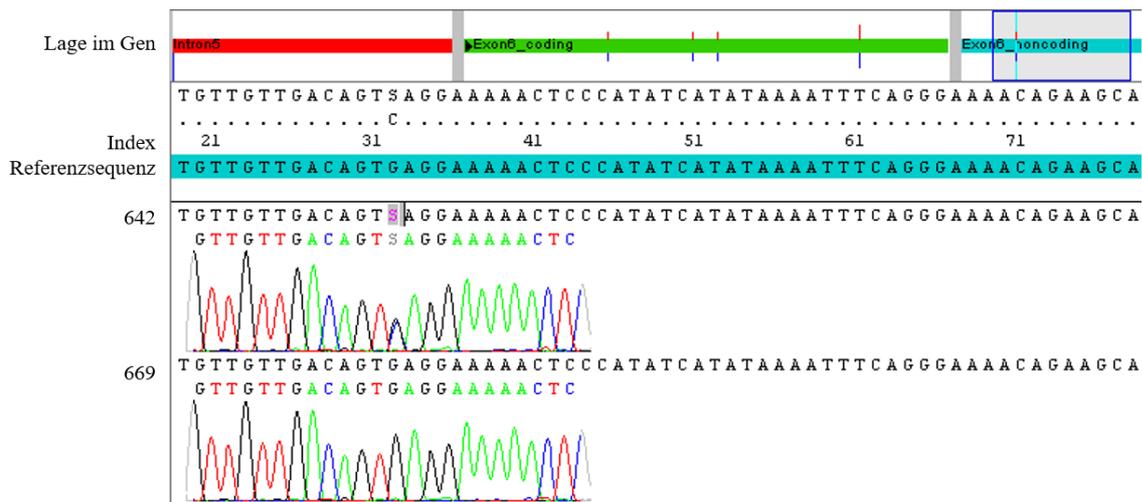


Abbildung 3.10 Sequenzausschnitt Exon 6 / 3'-UTR, *ELOVL4* (c.*32G>C)

Zu sehen ist die Variante **c.*32G>C** bei Patient 642 und der Wildtyp (669) zum Vergleich.

Die letzte gefundene Variante in *ELOVL4* befindet sich in der 3'-UTR an Position 1361 des Transkripts. Es handelt sich um die bekannte benigne Variante **c.*142G>C** (rs1512118). Die Transversion von Guanin zu Cytosin liegt 142 bp distal des Stopcodons. Analog zur Missense-Variante c.895A>G in Exon 6, wurde die Variante bei den gleichen 19 Patienten nachgewiesen, unter denen drei homozygote Träger waren (s. Abbildung 3.11). Die beiden Varianten werden vermutlich gekoppelt vererbt. Ihre errechneten MAFs entsprechen sich und liegen bei $C = 0,180$. Für die europäische und globale Bevölkerung finden sich ähnliche Werte: $C = 0,116$ und $C = 0,242$.

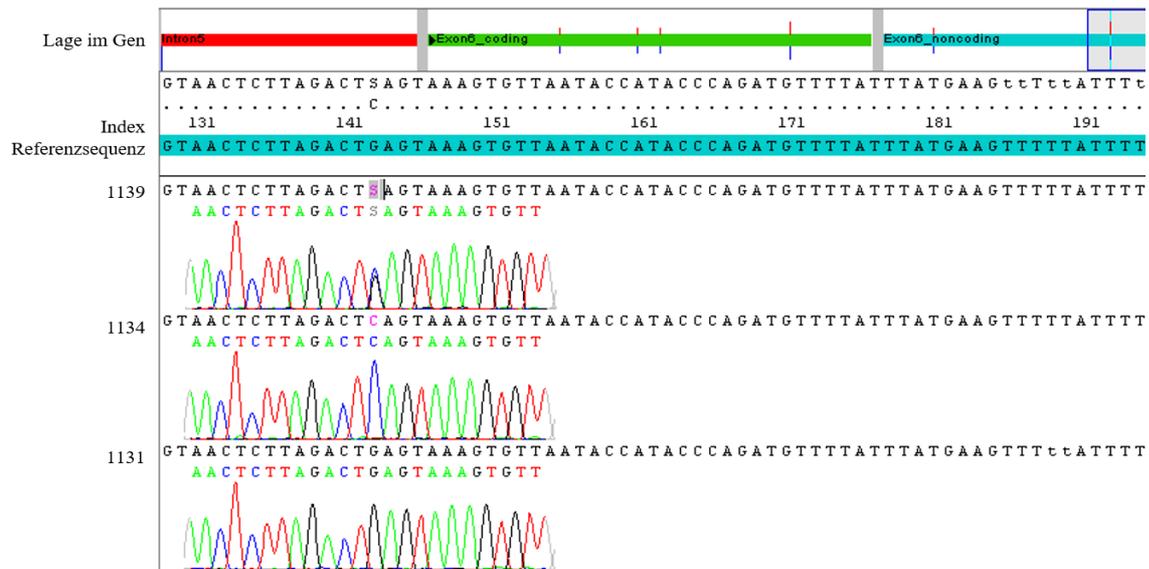


Abbildung 3.11 Sequenzausschnitt Exon 6 / 3'-UTR, *ELOVL4* (c.*142G>C)

Darstellung der Variante c.*142G>C in der heterozygoten (Probe 1139) und homozygoten Ausprägung (Probe 1134) sowie der Wildtyp (Probe 1131)

3.7 Übersicht nachgewiesener Varianten in *ELOVL4*

Tabelle 3.2 Nachgewiesene Varianten im *ELOVL4*-Gen

Lokalisation	Bezeichnung	AS-Austausch	rs-Nummer	MAF Global (Europa)	MAF Patientenkollektiv
5'-UTR / Exon 1	c.-236C>T	–	rs240307	T = 0,145 (T = 0,028)	T = 0,016
5'-UTR / Exon 1	c.-90G>C	–	rs62407622	C = 0,087 (C = 0,184)	C = 0,205
Intron 2	c.289-99T>C	–	rs343627	C = 0,323 (C = 0,117)	C = 0,180
Intron 3	c.370-118_370-117delCCinsGA	–	rs35163932	G/A = 0,229 (G/A = 0,116)	nicht beurteilbar
Intron 4	c.541+60G>A	–	rs45466000	A = 0,016 (A = 0,040)	A = 0,046
Exon 6	c.751C>G	p.Leu251Val	–	–	G = 0,008
Exon 6	c.800T>C	p.Ile267Thr	rs148594713	C = 0,006 (C = 0,008)	C = 0,008
Exon 6	c.814G>C	p.Glu272Gln	rs148919174	C = 0,001 (C = 0,004)	C = 0,033
Exon 6	c.895A>G	p.Met299Val	rs3812153	G = 0,242 (G = 0,115)	G = 0,180
3'-UTR / Exon 6	c.*32G>C	–	rs371941167	C < 0,001	C = 0,008
3'-UTR / Exon 6	c.*142G>C	–	rs1512118	C = 0,242 (C = 0,116)	C = 0,180

Darstellung aller im Patientenkollektiv nachgewiesenen Sequenzvarianten. Die unbekannte Variante in Exon 6 ist grau gekennzeichnet. AS: Aminosäure, rs: reference SNP, UTR: untranslatierte Region

3.8 Lokalisation und *in silico* Analyse der unbekanntenen Variante in Exon 6

Drei verschiedene *in silico* Analysewerkzeuge wurden verwendet, um mögliche Auswirkungen der unbekanntenen Missense-Variante **c.751C>G** (p.Leu251Val) in Exon 6 auf das ELOVL4-Protein zu untersuchen (s. Kapitel 2.2.7).

MutationTaster bewertet die Variante als **krankheitsverursachend** bzw. **wahrscheinlich schädlich** (Schwarz, et al., 2014). Sie wurde in keiner Gendatenbank oder Sequenzierungsprojekt, wie dem 1000 Genomes Project oder der ExAC-Datenbank (Exome Aggregation Consortium), gefunden. Der Grad der Konservierung (langsamere Evolution einer Sequenz als unter neutraler Gendrift zu erwarten) des Nukleotids und der Aminosäure fließen in die Berechnungen der Vorhersage ein. Zur Untersuchung der Konservierung führt MutationTaster ein Sequenz-Alignment (engl. Abgleichung) von der angefragten Proteinsequenz mit orthologen Proteinen zehn anderer Spezies (Schimpanse, Rhesusaffe, Katze, Maus, Huhn, Kugelfisch, Zebrafisch, Fruchtfliege, Fadenwurm, Krallenfrosch) durch (s. Abbildung 3.12).

Name	Spezies	Übereinstimmung	Protein-ID	Sequenz-Alignment ↓
Referenzsequenz				C P F P K W M H W A L I A Y A I S F I F L F
Variante		all conserved		C P F P K W M H W A V I A Y A I S F I F L F
Schimpanse	P.troglodytes	all identical	ENSPTRG00000018370	C P F P K W M H W A L I A Y A I S F I F L F
Rhesusaffe	M.mulatta	all identical	ENSMMUG00000020208	C P F P K W M H W A L I A Y A I S F I F L F
Katze	F.catus	all identical	ENSFCAG00000006421	C P F P K W M H W A L I A Y A I S F I F L F
Maus	M.musculus	all identical	ENSMUSG00000032262	C P F P K W M H W A L I A Y A I S F I F L F
Huhn	G.gallus	all conserved	ENSGALG00000015876	C P F P K W M H W G V I F Y A I T F I F L F
Kugelfisch	T.rubripes	all identical	ENSTRUG00000004612	C D F P H W M H Y S L I C Y A I T F I V L F
Zebrafisch	D.rerio	all identical	ENS DARG00000006773	C P F P K W M H W C L I G Y A L T F I I L F
Fruchtfliege	D.melanogaster	not conserved	FBgn0036128	C E Y G K W L T P I G A A M V P F L F M F
Fadenwurm	C.elegans	no homologue		
Krallenfrosch	X.tropicalis	no homologue		

Abbildung 3.12 Alignment-Analyse der Variante p.Leu251Val in MutationTaster

Sequenz-Alignment der Variante p.Leu251Val mit humaner Referenzsequenz und Orthologen der aufgeführten Spezies. Position 251 im humanen ELOVL4 wurde mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Übereinstimmung der Sequenz ist entweder bezeichnet als „all identical“ (gleiche AS im Menschen und Ortholog), „all conserved“ (alle konserviert, ähnliche AS), „not conserved“ (nicht konserviert, keine Übereinstimmung der Sequenzen) oder „no homologue“ (kein homologes Gen bekannt). AS: Aminosäure

Mit Ausnahme der Fruchtfliege, des Fadenwurms und des Krallenfrosches konnten Übereinstimmungen der Aminosäuresequenzen für die restlichen Spezies ermittelt werden. Die Aminosäure Leucin an Position 251 des humanen ELOVL4-Proteins ist hoch konserviert und findet sich bei allen Spezies mit Ausnahme des Huhns. In MutationTaster

sind zwei Scores (phyloP / phastCons) zur Beurteilung der Konservierung eingebettet, welche beide das betreffende Nukleotid an Position 751 und den flankierenden Bereich als konserviert beurteilen. Spleißstellen sind nicht betroffen, da sich die Variante 82 bp distal der Spleißstelle zwischen Intron 5 und Exon 6 befindet. MutationTaster gibt außerdem an, dass die Aminosäure-Substitution innerhalb einer TM lokalisiert ist (s. Abbildung 3.13), deren Funktion möglicherweise beeinträchtigt sein kann.

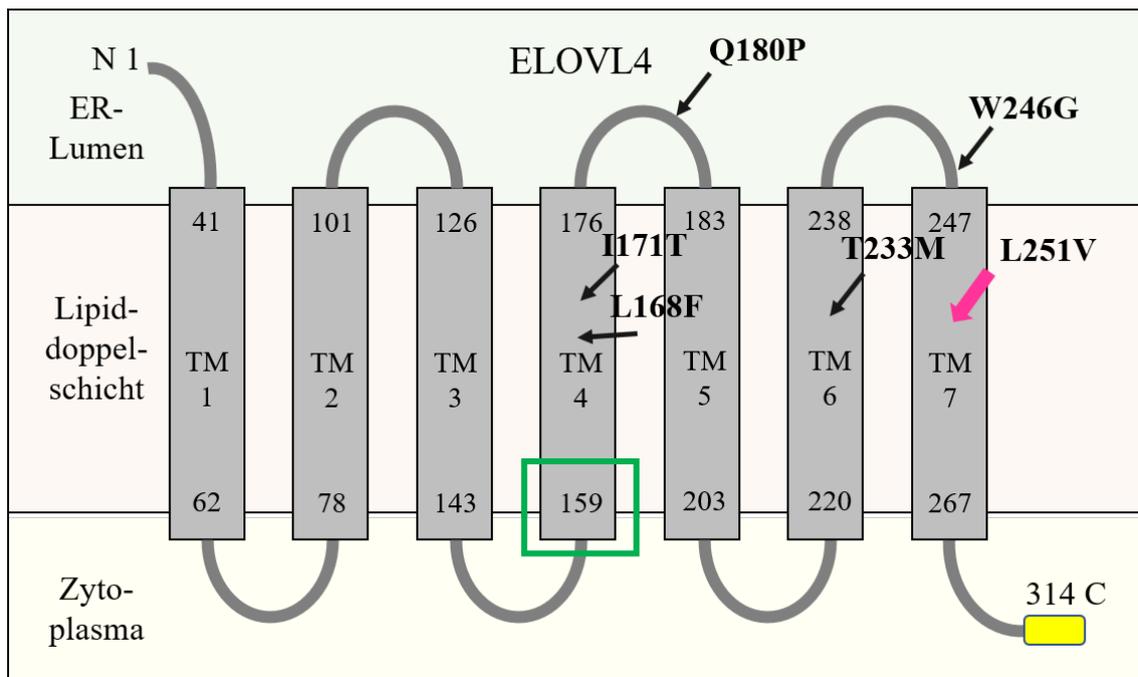


Abbildung 3.13 Variante p.Leu251Val im ELOVL4-Proteinschema

Modifiziert nach (Ozaki, et al., 2015). SCA34 verursachende pathogene Varianten sind mit schwarzen Pfeilen, die Variante p.Leu251Val mit einem pinken Pfeil gekennzeichnet. TM: Transmembrandomäne

PolyPhen-2 ordnet die Substitution p.Leu251Val in beiden Vorhersage-Scores (HumDiv und HumVar) als **benigne** ein (Adzhubei, et al., 2013). Zur Beurteilung von monogenen Erkrankungen sollte dem HumVar-Score Vorrang gegeben werden. Er erstreckt sich von 0,0 (benigne) bis 1,0 (pathogen) und wurde für die Variante in Exon 6 bei 0,158 ermittelt (Sensitivität: 0,89; Spezifität: 0,72). In die Berechnungen fließen Alignment-Analysen, externe Scores und Informationen zur 3D-Proteinstruktur, Bindungsstellen und funktionellen Bereichen des Proteins ein.

PROVEAN beurteilt den Effekt der Variante als **neutral** und ermittelt einen Vorhersagescore von -1,22 bei einer Sensitivität von 80 % und einer Spezifität von 79 % (Choi, et al., 2012). Der Cutoff liegt bei -2,5. Alle kleineren Werte sind als schädliche Frequenzveränderungen einzuordnen. Wählt man eine höhere Sensitivität von 91 %

(mehr schädliche Varianten werden als solche erkannt unter Einbeziehung jener Varianten mit geringerer Sicherheit der Pathogenität) liegt der Cutoff bei $-1,3$. Die Variante p.Leu251Val liegt somit über der Schwelle und wird als neutral gewertet.

Der Grad der Konservierung der gesamten ELOVL4-Proteinsequenz und die evolutionäre Verwandtschaft des Proteins mit anderen Spezies wurden mit Sequenz-Orthologen aus der Datenbank des Ensembl Genome Browsers untersucht. Leucin an Position 251 ist in den meisten Primaten, Nagetieren und anderen höheren Säugetieren konserviert. Zu den in Primaten (26 untersuchte Spezies) vorkommenden ELOVL4-Proteinen besitzt das humane ELOVL4 eine Ähnlichkeit von 96,4 %. Zu Nagetieren sind es 93,5 % und zu anderen höheren Säugetieren (Laurasiatheria) 92,2 %. In einigen Hühnerarten findet sich – analog zur Variante – die Aminosäure Valin anstelle von Leucin. Die gesamte Sequenz-Übereinstimmung von ELOVL4 im Huhn mit dem humanen ELOVL4 liegt bei ca. 76 %. (Howe, et al., 2021)

Gemäß den Guidelines des ACMG zur Interpretation von Sequenzvarianten lässt sich die Variante p.Leu251Val als **Variante unklarer klinischer Relevanz** (Klasse 3) einordnen. Die Klassifikation beruht auf der Kombination von Kriterien unterschiedlicher Stärke (sehr stark, stark, moderat und unterstützend), welche für oder gegen die Pathogenität sprechen (Richards, et al., 2015). Es sind zwei der sechs moderaten (PM) und ein unterstützendes (PP) Pathogenitätskriterium erfüllt.

PM1: Die Variante ist in einer funktionellen Proteindomäne (TM) lokalisiert, in der bisher keine andere benigne Variante beschrieben wurde.

PM2: Sie findet sich nicht in großen Sequenzierungsprojekten wie dem 1000 Genomes Project oder der ExAC-Datenbank.

PP2: Innerhalb des Gens sind Missense-Varianten ein bekannter Krankheitsmechanismus (s. Kapitel 1.3.1), während benigne Missense-Varianten selten sind.

Nicht erfüllt, da uneinheitliche Vorhersagen:

PP3: Mehrere rechnerische Beweise (Konservierung, Evolution, Spleißwirkung, usw.) deuten auf eine schädliche Auswirkung auf das Genprodukt hin.

Eine ausführliche Diskussion der neu identifizierten Variante **c.751C>G** (p.Leu251Val) in Exon 6 erfolgt in Kapitel 4.2.3.

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 61 vorselektierte Ataxie-Patienten auf das Vorliegen von Varianten und Mutationen im *ELOVL4*-Gen molekulargenetisch untersucht. Die Studienteilnehmer wurden zuvor bereits negativ für 17 häufige SCA-Loci getestet und weisen eine für spinocerebelläre Ataxien typische Klinik mit Bewegungsstörungen auf. Familienanamnestisch lässt sich ein dominanter Erbgang vermuten.

4.1 Häufigkeit der SCA34

Gemäß der Europäischen Kommission gelten Erkrankungen, die weniger als fünf von 10.000 Menschen betreffen, als seltene Erkrankungen bzw. *Orphan Diseases* (Commission of the European Communities, 2008). Spinocerebelläre Ataxien zählen eindeutig in diese Gruppe.

Ruano und Kollegen konnten in einer Meta-Analyse von 22 Studien aus 16 Ländern die Prävalenz aller dominant vererbten cerebellären Ataxien auf **0–5,6/100.000** (durchschnittlich $2,7/10^5$) bestimmen (Ruano, et al., 2014). Abhängig von Region und Land variieren die Daten teilweise stark. So wurde die Prävalenz für die Gruppe der SCA in Norwegen auf $4,2/10^5$ (Erichsen, et al., 2009), in den Niederlanden auf $3,0/10^5$ (van de Warrenburg, et al., 2002), in Portugal auf $5,6/10^5$ (Coutinho, et al., 2013), in Brasilien auf $1,9/10^5$ (Jardim, et al., 2001) und in Japan auf $5,0/10^5$ erhoben (Tsuji, et al., 2008; Ruano, et al., 2014). Einige Autoren vermuten, dass die tatsächliche Prävalenz in einigen geografischen Gebieten noch weit höher liegen könnte (Klockgether & Paulson, 2011; Matilla-Dueñas, 2012). Die Häufigkeit der einzelnen SCA-Subtypen unterliegt ebenfalls regionalen Schwankungen, welche vermutlich auf Gründereffekte zurückzuführen sind. Insgesamt ist die Datenlage jedoch lückenhaft und die einzelnen Studien weisen große Unterschiede in den Patientenzahlen auf. Aktuelle epidemiologische Daten für Deutschland sind nicht vorhanden. In einer Studie aus dem Jahre 1997 stellte SCA3 mit 42% den größten Anteil unter deutschen SCA-Familien dar (Schöls, et al., 1997).

SCA34 zählt zu den durch Punktmutationen verursachten SCA und wurde bisher in acht Familien weltweit beschreiben. Es handelt sich um zwei große frankokanadische Familien (Cadioux-Dion, et al., 2014; Beaudin, et al., 2020), drei nicht verwandte japanische Familien (Ozaki, et al., 2015; Ozaki, et al., 2019), eine große amerikanische Familie (Xiao, et al., 2019), einen südamerikanischen Patienten (Bourassa, et al., 2015) und eine anglokanadische Patientin (Bourque, et al., 2018).

Ozaki und Mitarbeiter untersuchten im Jahr 2019 erstmals eine 506 Ataxie-Patienten umfassende Kohorte auf Mutationen in *ELOVL4*. Die Prävalenz von SCA34 in diesem Kollektiv betrug **0,2 %** (Ozaki, et al., 2019). Eine sorgfältige Testung von bisher nicht diagnostizierten Ataxie-Patienten und der wachsende Einsatz der Panel-Diagnostik könnte in der Zukunft dazu beitragen, Informationen über Häufigkeit der SCA34 unter allen Subtypen und der Gesamtbevölkerung zu gewinnen.

Das dieser Arbeit zugrunde liegende Kollektiv umfasst nur eine geringe Anzahl an Patienten (61). Rückschlüsse auf die Prävalenz von SCA34 sind daher nicht zu treffen. Jedoch konnte die geringe Patientenzahl durch eine geeignete Vorselektion der Studienteilnehmer ausgeglichen werden. Nur Ataxie-Patienten mit typischen cerebellären Bewegungsstörungen in der Vorgeschichte, einer Familienanamnese typisch für einen dominanten Erbgang und einer negativen Testung auf die häufigsten SCA-Typen wurden in diese Arbeit eingeschlossen. Daher besteht trotz insgesamt niedriger Prävalenz von SCA34 die Aussicht, pathogene Varianten im *ELOVL4*-Gen in diesem vorselektierten Patientenkollektiv nachzuweisen.

Die Variante (c.751C>G / p.Leu251Val) in Exon 6 stellt eine potenziell pathogene Sequenzänderung in *ELOVL4* dar (s. Kapitel 4.2.3). Unter Vorbehalt kann die Prävalenz für diese möglicherweise mit SCA34 assoziierte Variante mit **1,6 %** in dem hier untersuchten Kollektiv angegeben werden.

4.2 Genetik der SCA34

4.2.1 Pathogene Varianten in *ELOVL4*

SCA34 assoziierte Varianten im *ELOVL4*-Gen konnten erstmalig im Jahr 2014 identifiziert werden (Cadieux-Dion, et al., 2014). Es handelt sich bisher ausnahmslos um heterozygote Missense-Varianten in codierenden Bereichen des Gens, die einen Aminosäureaustausch im ELOVL4-Protein bedingen. Die Fettsäure-Elongase 4 besteht aus sieben TM und ist in der Membran des ER lokalisiert (Ambasudhan, et al., 2004). Die drei in Exon 4 liegenden pathogenen Varianten führen zu einem Aminosäureaustausch an Position 168, 171 und 180 (p.Leu168Phe, p.Ile171Thr, p.Gln180Pro) und betreffen die vierte TM bzw. den intraendoplasmatischen Loop zur nächsten TM (s. Abbildung 1.4, S.18) (Cadieux-Dion, et al., 2014; Xiao, et al., 2019; Bourassa, et al., 2015). Bei den beiden in Exon 6 liegenden pathogenen Variante verhält es sich ähnlich; eine liegt

innerhalb der sechsten TM (p.Thr233Met) (Bourque, et al., 2018) und eine im intraendoplasmatischen Loop am Übergang zur nachfolgenden siebten TM (p.Trp246Gly) (Ozaki, et al., 2015). Auffällig ist, dass es lediglich bei den ersten vier Varianten neben spinocerebellärer Ataxie zusätzlich zur Ausprägung von EKV oder Retinitis pigmentosa – jedoch mit unvollständiger Penetranz und variabler Expressivität – kommt. Die topografisch letzte Variante ist bislang die Einzige, bei der die Betroffenen ausschließlich neurologische Symptome zeigten.

Erste Schritte in Richtung einer biochemischen Validierung der ELOVL4 Dysfunktion bei SCA34 konnten durch Beaudin und Mitarbeiter bei einer der frankokanadischen Familien erfolgen. Immunfluoreszenz-Untersuchungen von dermalen Fibroblasten aus einer Hautbiopsie konnte bei einem Träger der Variante p.Leu168Phe eine Aggregation und Fehllokalisierung des veränderten ELOVL4-Proteins über die perinukleäre Region hinaus nachweisen (Beaudin, et al., 2020). Ob und in welchem Umfang sich diese Ergebnisse auch für die anderen pathogenen Varianten und Betroffenen nachweisen lassen ist noch unklar.

Mit Sequenzänderungen in *ELOVL4* sind weitere Krankheitsbilder vergesellschaftet. Drei verschiedene heterozygote Varianten in Exon 6 wurden als ursächlich für Morbus Stargardt Typ 3 (STGD3), einer dominanten Form der Makuladegeneration, beschrieben (Zhang, et al., 2001; Edwards, et al., 2001; Bernstein, et al., 2001; Maugeri, et al., 2004). Es handelt sich um eine Nonsense-Mutation und zwei Deletionen, die über ein Frameshift des Leserasters zu einem vorzeitigen Stopcodon und schließlich zum verfrühten Abbruch der Translation führen. Alle drei Varianten sind nahe des C-Terminus lokalisiert (innerhalb der siebten TM oder dahinter) und führen zum Verlust des C-terminalen ER-Retentionssignals. Damit verliert das aberrante Protein seine physiologische Lokalisation im ER (Ambasudhan, et al., 2004) und akkumuliert mit Wildtyp-ELOVL4 zu perinukleären Aggresomen (Vasireddy, et al., 2005). STGD3 liegt ein dominant negativer Effekt des mutierten ELOVL4 auf den Wildtyp zugrunde (Grayson & Molday, 2005).

Des Weiteren sind drei homozygote Sequenzvarianten im *ELOVL4*-Gen beschrieben, die ebenfalls durch Generierung eines Stopcodons zum Verlust aller stromabwärts gelegener Proteinanteile führen (Aldahmesh, et al., 2011; Mir, et al., 2014). Hier ist die Lokalisation jedoch verschieden. Eine von ihnen befindet sich in der ersten TM und führt zum Verlust aller weiteren sechs TM, während sich die beiden anderen in bzw. vor der sechsten TM befinden. Sowohl die Lokalisation der Varianten als auch der homozygote

Vererbungsmechanismus mit Schädigung beider Allele scheinen eine Rolle für die Entwicklung des schweren Krankheitsbildes zu spielen. Phänotypisch zeigen die Betroffenen ein variables Bild von kongenitaler Ichthyose, mentaler Retardierung, Epilepsie und spastischer Tetraplegie.

Wie schon bei SCAR16 und SCA48, die beide auf Varianten im *STUB1*-Gen zurückgehen (Shi, et al., 2013; Genis, et al., 2018), spielen auch innerhalb des *ELOVL4*-Gens heterozygote (dominante) und homozygote (rezessive) Varianten eine Rolle für die Krankheitsentstehung. Die verschiedenen beschriebenen pathogenen Varianten in *ELOVL4* resultieren in erstaunlich unterschiedlichen Phänotypen. Dabei sind Einflüsse von der Art der Sequenzänderung (Missense, Nonsense), des Vererbungsmechanismus (heterozygot/homozygot bzw. dominant/rezessiv) und der Lokalisation innerhalb *ELOVL4* auf den resultierenden Phänotyp erkennbar. Inwieweit die Phänotypen überlappen ist nicht bekannt.

4.2.2 Nachgewiesene Varianten in *ELOVL4*

Im vorliegenden Patientenkollektiv konnten zehn bereits bekannte und eine bisher unbekannt Sequenzvariante im *ELOVL4*-Gen nachgewiesen werden. Angaben zur MAF (minor allele frequency) in dieser Kohorte sind aufgrund der geringen Patientenzahl nicht repräsentativ. Dennoch wurden mehrfach ähnliche Häufigkeiten für die in dieser Arbeit untersuchten Patienten und die europäische Bevölkerung ermittelt (s. Tabelle 3.2, S.51). Die Angaben zur MAF sind dem 1000 Genomes Project oder der ExAC-Datenbank über Ensembl oder dbSNP entnommen (The 1000 Genomes Project Consortium, et al., 2015; Howe, et al., 2021; Sherry, et al., 2001).

In der 5'-UTR konnten zwei SNV (c.-90G>C und c.-236C>T) nachgewiesen werden, bei denen es sich gemäß Ensembl und dbSNP um wahrscheinlich benigne, relativ häufige Varianten handelt. Sie befinden sich in der Promotorregion des *ELOVL4*-Gens. Ein einzelner der 61 getesteten Patienten (Nr. 1113) ist heterozygot für beide Varianten.

Kürzlich konnten Donato et al. die gleiche Konstellation bei einem kaukasischen Patienten mit Makuladegeneration im Sinne eines Morbus Stargardt und fehlendem Nachweis eines auslösenden Gendefekts feststellen. *In silico* Analysen offenbarten eine mögliche Beeinträchtigung der Bindung und Funktion von Transkriptionsfaktoren (TF) in der Promotorregion durch Aktivierung bzw. Unterdrückung von mehrerer TF-Bindungsstellen. Funktionelle Analysen mittels Dual-Luciferase-Reporter-Gen-Assays

ergaben bei der Kombination beider 5'-UTR-Varianten eine starke Reduktion der Genexpression von *ELOVL4* um ca. 97 % (Donato, et al., 2018). Inwieweit beide Varianten und die *ELOVL4*-Downregulation für den ophthalmologischen Phänotyp des Patienten verantwortlich sind, ist Gegenstand weiterer Forschung.

Bei Probe 1113 handelt es sich um eine 1950 geborene Patientin, die unter einer ab dem 60. Lebensjahr beginnenden progressiven Gangataxie leidet. Dysarthrie liegt zum Zeitpunkt der klinischen Vorstellung im Jahr 2010 nicht vor. Die Familienanamnese zeigt sich leer, jedoch ist ihr Vater früh verstorben. Über Sehstörungen liegen keine Befunde vor, daher ist eine gleichzeitig vorliegende Makuladegeneration nicht auszuschließen. Ob die durch beide Promotor-Varianten verursachte gestörte Genexpression auch zu dem neurologischen Krankheitsbild mit Ataxie führen könnte ist unklar.

Im vorliegenden Patientenkollektiv konnten drei intronische Varianten in Intron 2, 3 und 4 nachgewiesen werden. Die Varianten haben keinen Aminosäureaustausch zur Folge und betreffen keine Spleißstelle. Da sie bei > 1 % der europäischen Bevölkerung vorkommen, können sie als gutartige Polymorphismen eingeordnet werden. Es konnten ähnliche Häufigkeiten wie in der europäischen Bevölkerung für das jeweils seltenere Allel ermittelt werden.

Bei der Variante c.370-118_370-117delCCinsGA in Intron 3 fiel auf, dass alle Merkmalsträger gleichzeitig auch Träger zweier Varianten in Exon 6 bzw. der 3'-UTR waren (c.895A>G / p.Met299Val und c.*142G>C). Es ist von einer gekoppelten Vererbung der drei Merkmale und einem gemeinsamen Haplotyp auszugehen, welcher mit einer MAF von 12 % in der europäischen Bevölkerung und 18 % im hier untersuchten Patientenkollektiv vorkommt.

In der 3'-UTR konnten zwei Varianten nachgewiesen werden. Bei einer handelt es sich um eben jene gekoppelt vererbte, häufige Einzelnukleotid-Variante c.*142G>C. Die andere Variante (c.*32G>C) fand sich nur bei einem Patienten (Nr. 642). Sie ist vorbeschrieben, aber sehr selten. In der ExAC-Datenbank ist sie bei zwei Probanden gefunden worden (2 von 121.406). Sie wird von MutationTaster als pathogen bewertet und hat mögliche Auswirkungen auf das Spleißen von *ELOVL4*. Die Variante führt gemäß MutationTaster zur Generierung bzw. Aktivitätserhöhung kryptischer Splicing-Akzeptor- und -Donordomänen in direkter Umgebung (wenige bp) der Variante. Diese Effekte beeinflussen die in MutationTaster integrierten Scores marginal. Eine klassische

Spleißmutation (Veränderung der Sequenz der Intron-Exon-Übergänge) ist aufgrund der Lokalisation der Variante (308 bp entfernt der nächsten Spleißstelle zwischen Intron 5 und Exon 6) unwahrscheinlich. In der Literatur sind pathogene tiefe intronische Varianten von mehr als 100 bp Abstand zur nächsten konservierten Spleißstelle bei vielen Erkrankungen beschrieben (Vaz-Drago, et al., 2017). Ein Beispiel stellt die Variante c.5999-277G>A dar, die bei Patienten mit einer milden Form der Hämophilie A beschrieben wurde (Chang, et al., 2019). Solche intronische Varianten können über Generierung kryptischer Splicing-Akzeptor- und -Donordomänen zum Einschluss von Pseudo-Exons führen oder die Bindung von Spleiß-Regulatoren beeinflussen. Im Fall des oben genannten Beispiels führt c.5999-277G>A zu alternativem Spleißen und dem Einschluss eines Pseudo-Exons in die Proteinsequenz von Faktor 8 (Chang, et al., 2019). Weitere bioinformatische Analysen der Variante c.*32G>C und die Sequenzierung von cDNA des Patienten 642 könnten Aufschluss über ein mögliches hier vorliegendes beeinträchtigt Spleißen von ELOVL4 geben.

Mehrere Sequenzvarianten in *ELOVL4* sind durch große Sequenzierungsprojekte identifiziert worden. Die häufigsten drei konnten in dieser Arbeit mit überwiegend ähnlichen MAF, im Vergleich mit der europäischen Bevölkerung, nachgewiesen werden. Es handelt sich um Varianten in Exon 6, bei denen es zum Austausch einer Aminosäure in ELOVL4 kommt (p.Met299Val, p.Ile267Thr, p.Glu272Gln). Die Varianten wurden allesamt von bioinformatischen Vorhersagewerkzeugen als benigne klassifiziert. Alle Varianten befinden sich entweder hinter der siebten TM und somit nahe des im Zytoplasma der Zelle liegenden C-Terminus oder direkt am Übergang von der siebten TM dorthin. Demnach scheinen alle bisher bekannten Missense-Varianten jenseits der letzten TM des ELOVL4-Proteins toleriert zu werden.

4.2.3 Neu identifizierte Variante unklarer klinischer Signifikanz in Exon 6

Bei einer Patientenprobe (Nr. 975) konnte eine bisher unbekannt Sequenzvariante in Exon 6 auf einem Allel nachgewiesen werden. Es handelt sich um einen Nukleotidaustausch von Cytosin zu Guanin an Position 751 der codierenden Sequenz (c.751C>G). Die Transversion bedingt einen Aminosäureaustausch von Leucin zu Valin (p.Leu251Val). Gemäß dem von Ozaki et al. erarbeiteten Proteinmodell befindet sich die Substitution innerhalb der siebten TM von ELOVL4 (s. Abbildung 3.13, S. 53) (Ozaki,

et al., 2015). Die Variante ist weder im 1000 Genomes Project, noch in der ExAC-Datenbank beschrieben.

Drei *in silico* Analysewerkzeuge konnten zur Berechnung der möglichen pathogenen Effekte der Variante auf das ELOVL4-Protein verwendet werden. Die Ergebnisse sind uneindeutig. MutationTaster bewertet die Variante als krankheitsverursachend bzw. wahrscheinlich schädlich. Wohingegen PolyPhen-2 und PROVEAN sie als benigne und neutral bewerten. In einer Studie aus dem Jahr 2015 erzielten Duarri et al. bei der Analyse möglicher pathogener Effekte bekannter und neuer Varianten im bei SCA13 veränderten *KCNC3*-Gen ähnlich widersprüchliche Ergebnisse. *In silico* Analysen bewerteten bekannte krankheitsverursachende Varianten als benigne; andere neu identifizierte und als benigne klassifizierte Varianten stellten sich in funktionellen Analysen als beeinträchtigend auf die Proteinfunktion heraus (Duarri, et al., 2015). Bioinformatische Vorhersagen bieten Anhaltspunkte in der Bewertung der Variante, können allein aber keine endgültige Aussage über die mögliche Pathogenität von p.Leu251Val machen.

Ein Vergleich von orthologen Proteinen mittels des Ensembl Genome Browsers ergibt eine generelle hohe Übereinstimmung der humanen ELOVL4-Aminosäuresequenz mit ELOVL4 in Primaten (96,4 %), Nagetieren (93,5 %) und anderen höheren Säugetieren (Laurasiatheria, 92,2 %) (Howe, et al., 2021). Es zeigt sich, dass die Sequenz der Fettsäure-Elongase 4 evolutionär hochkonserviert ist. Sie entwickelt sich langsamer, als unter neutraler Gendrift zu erwarten ist. Die hohe Konservierung wurde zuvor bereits von mehreren Autoren beschrieben (Lagali, et al., 2003; Mandal, et al., 2004).

Alignment-Analysen des Bereiches um die Aminosäure Leucin an Position 251 und die in MutationTaster eingebetteten Scores (phyloP / phastCons) bestätigen, dass es sich bei Leucin um eine konservierte Aminosäure handelt. Sequenzänderungen in konservierten Bereichen eines Proteins werden in der Regel schlecht toleriert. Leucin findet sich bei allen untersuchten Spezies mit Ausnahme des Huhns (*Gallus gallus*), welches – analog zur Variante – Valin an Position 251 des orthologen ELOVL4-Proteins besitzt (s. Abbildung 3.12, S. 52). Jedoch zeigt die gesamte ELOVL4-Aminosäure-Sequenz des Huhns eine geringere Übereinstimmung mit dem menschlichen ELOVL4 (76 %) und ist weniger stark konserviert.

Leucin und Valin besitzen ähnliche physikalisch-chemische Eigenschaften. Beide Aminosäuren sind mittelgroß und hydrophob. Sie unterscheiden sich durch die Position

einer Methylgruppe im Aminosäurerest. Vermutlich kann ihre Substitution besser toleriert werden als der fehlerhafte Einbau einer polaren, sauren oder basischen Aminosäure in eine hydrophobe TM. Mit p.Leu168Phe ist bereits eine pathogene Variante in ELOVL4 beschrieben, bei der es innerhalb einer TM zum Austausch einer unpolaren Aminosäure durch eine weitere kommt (s. Kapitel 4.2.1). Jedoch könnten hier sterische Effekte durch die mit Phenylalanin neu eingeführte aromatische Phenylgruppe auf die TM innerhalb ELOVL4 eine Rolle spielen.

Gemäß den Guidelines der ACMG zur Interpretation von Sequenzvarianten, sind zwei moderate und ein unterstützendes Pathogenitätskriterium erfüllt (s. Kapitel 3.8). Demzufolge ist die Variante als **Variante unklarer klinischer Relevanz** (Klasse 3) einzuordnen (Richards, et al., 2015). Gerade ihre Abwesenheit in Sequenzierungsdatenbanken und die Lage in einer funktionellen Proteindomäne sprechen für eine mögliche Pathogenität der Variante. Eine umfassendere Beurteilung könnte noch mit Angaben zum Geno- sowie Phänotyp der Eltern erreicht werden, um eine *de novo* Entstehung der Variante zu belegen. Die Nachprüfung dieses Kriteriums ist jedoch nicht mehr möglich, da beide Elternteile bereits verstorben sind (s.u.).

Bei der Probe 975 handelt es sich um eine 1949 geborene Patientin, die seit dem 50. Lebensjahr an einem progredienten spinocerebellären Syndrom leidet. Außerdem ist bei ihr ein Torticollis (Schiefhals) nach links beschrieben. Zum Zeitpunkt ihrer klinischen Vorstellung im Alter von 62 Jahren (ca. zehn Jahre nach Auftreten der neurologischen Symptomatik) bestand bei ihr zunächst der Verdacht auf eine Friedreich-Ataxie oder SCA, welcher sich in der molekulargenetischen Diagnostik des *FXN*-Gens sowie der Loci für die oben genannten SCA nicht bestätigte. Als Abgrenzung zu einem paraneoplastischen Syndrom wurden onkoneurale Antikörper und einige Tumormarker (CEA, CA 19-9, CA 125, CA 15-3, NSE, CYFRA 21-1) bestimmt, deren Befund negativ ausfiel.

Als Vorerkrankungen sind bei ihr eine Arthrose, Glaukome beidseits (bds.), arterielle Hypertonie sowie ein Nikotinabusus bekannt. Die Familienanamnese stellt sich als nicht wegweisend bezüglich neurologischer Erkrankungen dar. Die Patientin hat zwei noch lebenden Schwestern und selbst zwei Kinder. Ihre Mutter starb mit 70 Jahren, der Vater mit 55 Jahren an einem Apoplex.

Die durchschnittliche Erstmanifestation der neurologischen Symptomatik bei SCA34 variiert je nach Quelle und weist auch innerhalb einer Familie Schwankungen auf. So

liegt das mittlere Ersterkrankungsalter der franko-kanadischen Familie bei 51 Jahren mit einer Spanne von 32 bis 72 Jahren (Cadieux-Dion, et al., 2014), während es bei den zwei japanischen Familien bei 34 Jahren lag (13–56 Jahre) (Ozaki, et al., 2015). Es ist demnach nicht auszuschließen, dass der Vater der Patientin ebenfalls Träger der Variante war und sich die Erkrankung erst ab einem Alter von 55 Jahren manifestiert hätte. Das Ersterkrankungsalter von 50 Jahren der Patientin passt in das klinische Bild von SCA34.

In der klinisch-neurologischen Untersuchung vom Jahr 2014 stellt sich die Patientin mit deutlich sakkadierter Blickfolge, horizontalen und vertikalen Blickrichtungsnystagmen sowie leicht- bis mittelschwerer Dysarthrie vor. Es bestehen keine Dysphagie oder sonstige Hirnnervenbeteiligung. Der Visus ist bds. unauffällig. Außer einem milden Torticollis nach links ist die sonstige Muskulatur unauffällig in Tonus und Trophik. Halteversuche sind sicher von der Patientin ausführbar. Sie besitzt einen mäßiggradig ataktisches Gangbild. Der Romberg-Versuch ist positiv, Finger-Nase-Versuch sowie Knie-Hacke-Versuch bds. leicht- bis mäßiggradig dysmetrisch und ataktisch. Die Prüfung der Dysdiadochokinese fällt bds. positiv aus, mit Betonung der linken Seite. Im Finger-Finger-Versuch zeigt sich eine diskrete Hypo- und Hypermetrie. Es bestehen jedoch weder Rumpfataxie noch Tremor. Im SARA-Score erreicht die Patientin über einen Zeitraum von drei Jahren stets konstante Werte von ca. 12 (maximale Ataxie: 40). Diese sind mit einer moderaten Beeinträchtigung von Alltagsaktivitäten und einer moderaten Gangataxie, die den Einsatz eines Rollators oder Gehstockes notwendig macht, zu vereinbaren (Kim, et al., 2011).

Die Symptomatik der Patientin deckt sich mit der klinischen Präsentation von SCA34. Okulomotorische Störungen und Dysarthrie sind Merkmale, die bei nahezu allen Betroffenen in unterschiedlicher Ausprägung beschrieben wurden. Ebenso ist das Leitsymptom von SCA34, die Gang- und Extremitätenataxie, bei der Patientin vordergründig.

Ihr Reflexstatus ist unauffällig. Diesbezüglich bietet SCA34 ein heterogenes Bild: sowohl Hyporeflexie (Cadieux-Dion, et al., 2014; Bourque, et al., 2018), Hyperreflexie oder positive Babinski-Zeichen (Ozaki, et al., 2015; Xiao, et al., 2019) als auch keine Veränderung der Muskelsehnenreflexe wurden bei Betroffenen beschrieben (Bourassa, et al., 2015). Bei der Patientin besteht eine Pallhypästhesie am Großzehengrundgelenk bds. und der Tuberositas Tibiae bds. von 2/8. Störungen des Vibrationsempfindens an den Händen oder der Oberflächensensibilität sind nicht zu ermitteln. Bislang wurde nur bei

zwei SCA34-Erkrankten mit der c.504G>C Variante von einer Pallhypästhesie und Polyneuropathie berichtet (Beaudin, et al., 2020). Einige weitere in der Literatur inkonstant beschriebene Symptome wie vegetative Störungen (Ozaki, et al., 2015) und kognitive bzw. psychiatrische Beteiligung (Beaudin, et al., 2020) sind bei der oben genannten Patientin nicht bekannt.

Bei allen beschriebenen SCA34 Fällen wurde in der kraniellen Bildgebung cerebelläre und pontine Atrophie bei Betroffenen nachgewiesen. Eine MRT-Untersuchung der Patientin aus dem Jahr 2009 hatte eine Kleinhirn-Atrophie mit Betonung des inferioren Vermis gezeigt. Bei sieben der untersuchten Patienten der franko-kanadischen Familie betraf die Atrophie ebenfalls den Vermis stärker als die cerebellären Hemisphären (Cadieux-Dion, et al., 2014). Auffälligkeiten des Pons, wie das von Ozaki et al. beschriebene *Hot-cross-bun-sign* kamen bei der Patientin nicht zur Darstellung.

Von aktuellen oder zurückliegenden Hautveränderungen im Sinne einer Erythrokeratodermie bei ihr ist nichts bekannt. Jedoch spricht deren Abwesenheit nicht gegen SCA34. Es wurden einige Varianten beschrieben, bei denen es zu keiner (Ozaki, et al., 2015; Xiao, et al., 2019) oder milderer Hautbeteiligung kam (Beaudin, et al., 2020). Weiterführende Untersuchungen der Patientin, wie eine dermatologische Untersuchung incl. Hautbiopsien sowie die Bestimmung der Level der VLCFA im Serum, stellen einen sinnvollen nächsten Schritt in der klinischen Diagnosesicherung dar.

SCA34 präsentiert sich von Fall zu Fall und abhängig vom genauen genetischen Defekt unterschiedlich. Insbesondere innerhalb einer Familie mit der gleichen Variante gibt es Schwankungen bezüglich Erkrankungsbeginn, Symptomatik und Schwere. Die Klinik der Patientin 975 teilt viele Aspekte der bereits beschriebenen Fälle und passt gut in das bisherige Bild der Erkrankung. Zusammengenommen ergibt die Variante ENST00000369816.5:c.751C>G eine durchaus plausible Erklärung für die Symptomatik der Patientin. Es könnte sich um eine weitere SCA34 auslösende pathogene Variante des *ELOVL4*-Gens handeln.

4.2.4 ELOVL4 im Tiermodell

ELOVL4 elongiert gesättigte und mehrfach ungesättigte ULCFA (Agaba, et al., 2008) abhängig vom Gewebetyp (gesättigte ULCFA in Haut und Gehirn, mehrfach ungesättigte ULCFA in der Retina) (Agaba, 2016). Im Gehirn von Mäusen synthetisiert ELOVL4 hauptsächlich gesättigte ULCFA einer Länge von 28 und 30 C-Atomen, welche innerhalb

von Sphingolipiden vorkommen und sich zu hohen Konzentrationen in Membranen synaptischer Vesikel finden (Hopiavuori, et al., 2018). Ungesättigten und gesättigten ULCFA werden neben Gewebsspezifität außerdem unterschiedliche Eigenschaften bezüglich Membranstabilität bzw. -fluidität zugeschrieben (Ben Gedalya, et al., 2009; Hopiavuori, et al., 2019). Sequenzveränderungen in *ELOVL4* könnten demnach die Aktivität der Fettsäure-Elongase in einen der beiden Wege (gesättigte/ungesättigte ULCFA) beeinflussen und so zu der beschriebenen breiten phänotypischen Variabilität führen (Agaba, 2016).

Bisher wurden etliche *in vitro* und *in vivo* Studien zur Untersuchung der Funktion von *ELOVL4* durchgeführt. Sowohl homozygote *Elov14*-Knock-out-Mäuse (Nullallel, *Elov14^{-/-}*) als auch homozygote STGD3-Knock-in-Mäuse (*Elov14^{del/del}*), welche die für Morbus Stargardt typische 5-bp-Deletion (797–801_AACTT) auf beiden Allelen besitzen, zeigen schwere Hautanomalien und sterben innerhalb weniger Stunden nach der Geburt an einer Störung der epidermalen Wasser-Permeabilitätsbarriere (Vasireddy, et al., 2007; Li, et al., 2007). Eine Analyse der Hautlipide bestätigte den generellen Verlust der gesättigten ULCFA ($C \geq 28$) in der Epidermis der *Elov14*-defizienten Mäuse. Vor allem die in der Epidermis einzigartigen ω -O-Acylceramide fehlten völlig. Dabei handelt es sich um ω -hydroxylierte und mit Linolsäure (C18:2n-6) veresterte gesättigte ULCFA am Ceramid-Grundgerüst, die Bestandteil der extrazellulären lamellenartigen Lipidmatrix des Stratum corneums sind (Sassa & Kihara, 2014).

Um die Rolle von *ELOVL4* weiter zu untersuchen, wurde in einem ähnlichen Mausmodell einerseits die 5-bp-Deletion (797–801_AACTT) in homozygoter Form eingeführt, zusätzlich jedoch auch ein Wildtyp-*ELOVL4*-Minigen, das unter der Kontrolle eines Hautzellen-spezifischen Promotors steht und somit in der Haut betreffender Tiere exprimiert wird (Hopiavuori, et al., 2018). So konnten Dehydratation und Versterben der Tiere direkt nach Geburt verhindert werden. Die Mäuse überlebten zunächst, zeigten jedoch ab Tag 19 ein schweres neurologisches Erkrankungsbild mit Krampfanfällen und verstarben anschließend. Der Verlust der gesättigten ULCFA im Gehirn und der begleitende gestörte Vesikeltransport in Neuronen kann für den neurologischen Phänotyp verantwortlich gemacht werden (Hopiavuori, et al., 2018).

Es wurde bislang keine homozygote Vererbung von STGD3-Allelen beim Menschen berichtet. Jedoch konnten Hopiavuori und Mitarbeiter im oben dargestellten Mausmodell den von Aldahmesh, et al. (2011) und Mir, et al. (2014) beim Menschen beschriebenen

Phänotyp rekapitulieren, welcher auf homozygote Nonsense-Mutationen in *ELOVL4* zurückgeht. Es handelt sich um ein schweres, schon früh in der Entwicklung auftretendes, neuro-kutanes Krankheitsbild.

Kürzlich wurden erste Daten eines Tiermodells einer mit SCA34-assoziierten Variante publiziert. Agaba und Mitarbeiter führten bei einer Mauslinie die Variante c.736T>G (p.W246G) ein, die beim Menschen für SCA34 ohne EKV verantwortlich gemacht wird (Ozaki, et al., 2015). Homozygote SCA34-Knock-in-Mäuse überlebten und waren fruchtbar, zeigten jedoch eine EKV sowie reduzierte Spiegel von gesättigten ULCFA in der Epidermis (Agaba, et al., 2020). Desweiteren hatten die Mäuse ein funktionelles Defizit (v.a. der Stäbchenzellen) in der Elektretinographie. Anatomische Analysen und die Anzahl der Fotorezeptorzellen ergaben keinen Anhalt für eine Neurodegeneration der Retina. Auch waren die retinalen Level der mehrfach ungesättigten ULCFA im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen nicht beeinflusst. Die heterozygoten SCA34-Knock-in-Mäuse zeigten phänotypisch keinen Unterschied zum Wildtyp und gleichen somit den für die Variante heterozygoten humanen SCA34 Patienten, bei denen es ebenfalls zu keiner dermalen oder retinalen Pathologie kommt (Ozaki, et al., 2015). Zusammenfassend unterstützt die Studie die Annahme, dass die Variante c.736T>G selektiv die Synthese der gesättigten ULCFA beeinträchtigt, was zu einer gestörten Funktion der Retina und Haut führt, während die Biosynthese ungesättigter ULCFA, die für das Überleben der Photorezeptoren erforderlich sind, erhalten bleibt. (Agaba, et al., 2020)

4.3 ELOVL-Proteinfamilie

Die sieben bei Säugern bekannten Fettsäure-Elongasen (ELOVL1–7) der ELOVL-Proteinfamilie sind für die Verlängerung von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren im Körper verantwortlich. Sie besitzen unterschiedliche Substratspezifität sowie Gewebsexpression, katalysieren spezielle Schritte in der Biosynthese der VLCFA oder arbeiten multifunktional (Ohno, et al., 2010; Guillou, et al., 2010).

Die ELOVL-Proteinfamilie spielt eine wichtige Rolle bei der Funktion des ZNS, der epidermalen Wasserbarriere, dem Fettmetabolismus sowie der Fertilität. Bislang wurden in *ELOVL1*, -4, -5 und -7 humanpathogene Varianten beschrieben, welche vor allem mit neurologischen Erkrankungen assoziiert sind. (Deak, et al., 2019)

ELOVL1 elongiert gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäuren mit einer Länge von 20–26 C-Atomen und wird ubiquitär im Körper exprimiert (Ohno, et al., 2010). Eine

autosomal-dominante *de novo* Variante im *ELOVL1*-Gen wurde kürzlich bei zwei nicht verwandten Patienten im Kindes- und Jugendalter mit Hyperkeratose, Ichthyose, spastische Paraplegie, Nystagmus, Hochtonschwerhörigkeit und Optikusatrophy identifiziert (Mueller, et al., 2019). Es finden sich Parallelen zu dem von Aldahmesh et al. und Mir et al. beschriebenen neuro-ichthyotischen Syndrom, welches durch rezessive Varianten im *ELOVL4*-Gen verursacht wird (Aldahmesh, et al., 2011; Mir, et al., 2014).

Neben diesem neuro-kutanen Syndrom und den zuvor bereits diskutierten SCA34- sowie STGD3-assoziierten Varianten in *ELOVL4*, konnte kürzlich ein Bezug der Fettsäure-Elongase 4 zu einer Erkrankung des metabolischen Formenkreises hergestellt werden. Tao et al. wiesen im peripheren Blut von Patienten mit Adipositas-assoziiierter Kardiomyopathie eine Hochregulierung von *ELOVL4* im Vergleich zu gesunden Kontrollen nach. Die bioinformatische Analyse zeigte hierbei, dass die *ELOVL4* Expressionslevel mit denen des ebenfalls hochregulierten Interleukin-33 (IL-33) positiv korrelieren (Tao, et al., 2020). Die Rolle von *ELOVL4* in der Pathophysiologie der Adipositas-assoziierten Kardiomyopathie gilt es weiterhin zu untersuchen.

Bei SCA38 handelt es sich um die zweite spinocerebelläre Ataxie, die auf Sequenzänderungen in einer Fettsäure-Elongase zurückgeht. Ursächlich sind Missense-Varianten im *ELOVL5*-Gen, welches für die Fettsäure-Elongase 5 codiert (Di Gregorio, et al., 2014). Sie verlängert hauptsächlich mehrfach ungesättigte Fettsäuren von 18–20 C-Atomen auf eine Länge von 22 C-Atome (Ohno, et al., 2010). *ELOVL5* ist ubiquitär im Körper exprimiert, findet sich im Kleinhirn jedoch hauptsächlich in Purkinje-Zellen (Di Gregorio, et al., 2014). Betroffene leiden unter einer rein cerebellären Form der SCA. Di Gregorio et al. konnten im Serum von Erkrankten signifikant verringerte Konzentrationen von Arachidonsäure (C20:4) und Docosahexaensäure (C22:6), zwei direkten Produkten der Fettsäure-Elongase 5, feststellen. In einer Studie aus dem Jahr 2017 hat die orale Substitution von Docosahexaensäure bei SCA38-Patienten eine Verbesserung der klinischen Symptomatik und des cerebellären Hypometabolismus bewirkt (Manes, et al., 2017). Bei SCA38 kommt es, analog zu SCA34, zu einer intrazellulären Fehllokalisation des aberranten *ELOVL5* (Di Gregorio, et al., 2014; Beaudin, et al., 2020). Ob und in welchem Umfang SCA38 und SCA34 weitere Ähnlichkeiten bzgl. des Pathomechanismus aufweisen ist noch nicht klar, könnte jedoch im Hinblick auf die Entwicklung gemeinsamer Therapieoptionen hilfreich sein.

Es wurde bisher kein direkter kausaler Zusammenhang zwischen *ELOVL7* und einer menschlichen Erkrankung festgestellt. In einer Studie aus dem Jahr 2018 konnte eine Assoziation einer SNV in *ELOVL7* mit einem früh beginnendem Parkinson-Syndrom festgestellt werden (Li, et al., 2018).

4.4 Empfehlungen zur molekulargenetischen Testung auf SCA34

SCA34 ist in der Gruppe der SCA ein seltener Subtyp und wurde bisher nur in wenigen Familien weltweit beschrieben. Von einer isolierten Testung des *ELOVL4*-Gens bei Ataxie-Patienten ist deshalb abzuraten. Bei klinischem Verdacht auf cerebelläre Ataxie mit zusätzlich zurückliegenden und/oder gegenwärtigen Hautveränderungen kann eine direkte Einzelgentestung von *ELOVL4* erwogen werden. Außerdem ist die isolierte Testung als Mutationsnachweis in Familien indiziert, wo bereits ein Patient mit SCA34 diagnostiziert wurde. Es macht Sinn, die Sequenzierung zunächst mit Exon 4 und 6 zu beginnen, da bislang alle SCA34 assoziierten Varianten dort beschrieben wurden.

Aktuell erfolgt die molekulargenetische Diagnostik bei klinischem Verdacht auf eine autosomal-dominante Ataxie im Rahmen einer Stufendiagnostik. Zuerst wird auf die häufigsten SCA-Loci getestet. Es handelt sich um die Polyglutamin-SCA (SCA1-3, SCA6–7, SCA17 und DRPLA) (van de Warrenburg, et al., 2014). Bei einem negativen Ergebnis werden in einem zweiten Schritt seltenere Subtypen, wie z.B. die durch Punktmutationen verursachten SCA (s. Tabelle 1.1, S.7), untersucht. Dieses Vorgehen hat sich aus ökonomischen Gründen bewährt. Eine Testung auf SCA34 ist eine sinnvolle Ergänzung der bisherigen Stufendiagnostik und sollte im Rahmen dieser erfolgen.

Next Generation Sequencing (NGS) konnte in den letzten Jahren zur Identifikation zahlreicher neuer SCA-Typen beitragen (Sullivan, et al., 2019). Es bietet die Möglichkeit, ganze Exome und Genome in immer kürzerer Zeit und zu sinkenden Kosten zu sequenzieren. In diagnostischen Panels kann die Analyse etlicher Zielgene gleichzeitig erfolgen. Vor allem in der erweiterten Diagnostik der seltenen SCA-Subtypen bietet NGS eine zeit- und kostensparende Alternative zu klassischen Sequenzierungs-Techniken. Limitationen dieser Short-Read-Methode liegen in der Detektion von Repeat-Verlängerungen. Daher ist die Fragmentlängenanalyse der erste Schritt und diagnostische Goldstandart in der Erkennung der Trinukleotid-SCA. Einige neuentwickelte Long-Read-Sequenzierungstechniken, wie die Single-Molecule-Real-Time-(SMRT)-Sequenzierung (Roberts, et al., 2013) oder die Oxford-Nanopore-Sequenzierungstechnologie (Deamer,

et al., 2016), könnten die Schwächen des NGS in diesem Bereich in Zukunft kompensieren (Sullivan, et al., 2019; Mantere, et al., 2019).

Eine genetische Testung macht in vielen Fällen trotz der limitierten therapeutischen Optionen Sinn. Die gesicherte Diagnose einer SCA gibt vielen Patienten Klarheit über die Prognose und ermöglicht es, informierte Entscheidungen über die Lebens- und Familienplanung zu treffen (Sandford & Burmeister, 2014).

4.5 Ausblick

Die Anzahl von Ataxie-Patienten ohne identifizierte genetische Ursache nach gründlicher molekulargenetischer Diagnostik ist hoch. In großen Studien konnte der Anteil undiagnostizierter Patienten z.B. für Portugal von 36 % (Coutinho, et al., 2013) und Japan von 37 % (Tsuji, et al., 2008) bestimmt werden. Vermutlich lässt sich diese hohe Zahl auf konventionelle Mutationen zurückführen (Sailer & Houlden, 2012). Heute mag sich die Datenlage durch neue Sequenzierungstechniken wie dem NGS und den damit neu identifizierten SCA-Subtypen verändert haben. Dennoch bleibt es Aufgabe zukünftiger Studien, die genetische Ätiologie vieler Ataxien zu klären und deren geno- und phänotypische Einordnung in die Gruppe der SCA vorzunehmen.

Die Tatsache, dass spinocerebelläre Ataxien in jeglicher Hinsicht heterogen sind, ist eine Herausforderung in der Entwicklung eines Krankheitsmodells und dem Verständnis der Pathogenese. Beteiligte Gene spielen in unterschiedlichen Signalwegen und Zellfunktionen eine Rolle. Die Pathomechanismen einiger Subtypen konnten bereits aufgeklärt werden, während an anderen Stellen noch großer Forschungsbedarf besteht. Gerade die breite phänotypische Variabilität deutet stark auf das Vorhandensein von modifizierenden Faktoren hin (Sullivan, et al., 2019). Selbst unter allen von SCA34 Betroffenen gibt es klinische Unterschiede in der Schwere, dem Manifestationsalter der Ataxie sowie dem Vorhandensein von Hautläsionen und anderen Symptomen. Diese Unterschiede könnten Ausdruck der verschiedenen lokalisierten pathogenen Varianten in ELOVL4 sein und beeinflussen, wie das Enzym bei der Elongation von Fettsäuren mit anderen Proteinen interagiert (Agaba, 2016).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass SCA34 auch unter deutschen Ataxie-Patienten eine Rolle spielen könnte. In Exon 6 konnte eine potenziell pathogene Missense-Variante bei einer Patientin identifiziert werden, deren Auswirkungen auf die Fettsäure-Elongase 4

in weiteren funktionellen Analysen untersucht werden sollten. Vor allem sind mögliche Effekte auf die *ELOVL4*-Genexpression oder Enzymaktivität von Interesse.

Bislang wurden noch keine Therapiestrategien zur Behandlung von SCA34 etabliert. Ein möglicher Ansatz könnte die Substitution von VLCFA sein. Hier stellt sich das Problem, dass gesättigte VLCFA bei Raumtemperatur fest sind und daher schwer intestinal absorbiert werden können (Hopiavuori, et al., 2019). Außerdem gilt es, sollte es zukünftig eine Lösung für das Problem der intestinalen Resorption geben, noch die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Was die EKV angeht, könnte die Entwicklung von topischen Salben, die VLCFA in darunter liegende Zellschichten der Epidermis abgeben, hilfreich sein (Hopiavuori, et al., 2019). Die Applikation von Bienenwachs (enthält C30-32 VLCFA) über zwei Monate konnte bei einer Betroffenen jedoch zu keiner Verbesserung der EKV führen (Bourque, et al., 2018).

Für dominant vererbte Ataxien mit einem toxischen *Gain-of-function*-Mechanismus könnten aus den Gen-Targeting-Therapien wie RNA-Interferenz oder Antisense-Oligonukleotiden vielversprechende therapeutische Ansätze zur Stilllegung von Allelen entstehen (Parodi, et al., 2018). Studien am SCA2- und SCA3-Mausmodell bestätigten eine Herunterregulierung der ATXN2- bzw. ATXN3-mRNA, eine Abnahme des defekten Proteins im Cerebellum und zum Teil eine Verbesserung der motorischen Fähigkeiten (Scoles, et al., 2017; Moore, et al., 2017).

Ein alternativer Ansatz könnte die weitere Identifikation und Adressierung gemeinsamer Pathomechanismen der SCA-Subtypen, wie z.B. gestörte Proteinhomöostase, RNA-Toxizität und abnorme synaptische Signalübertragung, sein (Bushart, et al., 2016). Gelingt es, in der Heterogenität von beteiligten Genen, Stoffwechselwegen und Zellfunktionen gemeinsame Muster, wie z.B. Purkinjenzelldysfunktion (Klockgether & Paulson, 2011) zu erkennen, könnten Therapiestrategien für potenziell mehrere Subtypen entwickelt werden.

5. Zusammenfassung

Bei spinocerebellärer Ataxie 34 (SCA34) handelt es sich um eine seltene autosomal-dominant vererbte neurodegenerative Erkrankung. Sie zählt in die Gruppe der spinocerebellären Ataxien und wird durch Sequenzänderungen im *ELOVL4*-Gen ausgelöst. Klinisch kommt es neben der klassischen Symptomtrias von progressiver Ataxie, Dysarthrie und Nystagmus bei einigen Betroffenen zusätzlich zur Ausprägung einer Erythrokeratoderma variabilis in der Kindheit und Jugend, die mit dem Erreichen des frühen Erwachsenenalters verschwinden kann. Erste neurologische Symptome treten in variablem Alter auf und führen spät im Krankheitsverlauf zu einer Gehbeeinträchtigung. *ELOVL4* codiert für die Fettsäure-Elongase 4, ein an der Elongation langkettiger Fettsäuren beteiligtes Enzym. Bisher wurden fünf verschiedene Missense-Varianten in Exon 4 bzw. 6 beschrieben.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden 61 vorselektierte überwiegend deutsche Ataxie-Patienten auf das Vorhandensein beschriebener sowie neuer Varianten im *ELOVL4*-Gen molekulargenetisch untersucht. Alle sechs codierenden Exons und die flankierenden intronischen Bereiche wurden mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Es konnten insgesamt elf verschiedene Sequenzvarianten nachgewiesen werden. Darunter befand sich eine bisher unbekannt Transversion (c.751C>G) in Exon 6, die bei einer Studienteilnehmerin festgestellt werden konnte. Die Variante ist weder im 1000 Genomes Project noch in der ExAC-Datenbank beschrieben. Sie resultiert in der Substitution der konservierten Aminosäure Leucin zu Valin an Position 251 der Fettsäure-Elongase 4 (p.Leu251Val). Da die veränderte Aminosäure in der letzten der sieben Transmembrandomänen lokalisiert ist, lässt sich eine beeinträchtigte Funktion des Enzyms vermuten. Bei der im Jahr 1949 geborenen Patientin kam es ab dem 50. Lebensjahr zu einem progredienten spinocerebellären Syndrom mit Gangataxie, sakkadierter Blickfolge, Blickrichtungsnystagmus und Dysarthrie (SARA 12). Eine kraniale MRT zeigte eine Kleinhirnunterm-Atrophie. Über Hautveränderungen ist nichts bekannt.

Aufgrund der weltweit geringen Prävalenz von SCA34 sollte eine molekulargenetische Testung erst nach Ausschluss der häufigsten SCA-Loci und im Rahmen einer Panel-Diagnostik erfolgen.

6. Summary

Spinocerebellar ataxia 34 (SCA34) is a rare autosomal dominant inherited neurodegenerative disorder. It belongs to the group of spinocerebellar ataxias and is caused by pathogenic variants in the *ELOVL4* gene. Typical clinical features include progressive ataxia, dysarthria and nystagmus. Some patients develop an erythrokeratoderma variabilis during childhood and adolescence which tends to disappear in early adulthood. First neurological symptoms occur at variable ages and lead to walking impairment late in the course of the disease. *ELOVL4* codes for the fatty acid elongase 4, an enzyme involved in the elongation of very long-chain fatty acids. To date, there are five missense variants known, three in exon 4 and two in exon 6.

In this study, 61 preselected ataxia patients of mostly German origin were screened for known and novel variants in *ELOVL4*. All six coding exons and the flanking intronic regions were amplified by PCR and subsequently sequenced. A total of eleven variants have been found. Among those, a novel transversion (c.751C>G) in exon 6 was identified in a single patient. This variant was neither found in the 1000 Genomes Project nor in the ExAC database. It results in a substitution of a conserved leucine by valine at position 251 of the fatty acid elongase 4 (p.Leu251Val). Since the altered amino acid is located within the last of the seven transmembrane domains an impaired function of the enzyme can be assumed. The patient, born in 1949, developed a progressive spinocerebellar syndrome with gait ataxia, saccadic pursuit, directional nystagmus, and dysarthria from the age of 50 (SARA 12). A cranial MRI showed atrophy of the inferior cerebellar vermis. Nothing is known about skin lesions.

Due to the low prevalence of SCA34 worldwide molecular genetic testing should only be performed after exclusion of the most common SCA loci and in the context of panel diagnostics.

7. Abkürzungsverzeichnis

ACMG	American College of Medical Genetics and Genomics	DNA	Desoxyribonukleinsäure
ad	zu, zum oben erwähnten	EA	Episodische Ataxien
ADCA	Autosomal-dominante cerebelläre Ataxie(n)	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
AOA	Ataxie(n) mit okulomotorischer Apraxie	EKV	Erythrokeratodermia variabilis
ARCA	Autosomal-rezessive cerebelläre Ataxie(n)	ELOVL4	elongation of very long-chain fatty acids 4, Fettsäure-Elongase 4
AS	Aminosäure	<i>ELOVL4</i>	Fettsäure-Elongase-4-Gen
bp	Basenpaare	<i>Elovl4</i>	Maus Ortholog von <i>ELOVL4</i>
bds	beidseits	ER	Endoplasmatisches Retikulum
CH	Schweiz	ESP	Spanien
dATD	Desoxyadenosintriphosphat	et al.	et alii, und andere
dCTP	Desoxycytidintriphosphat	EU	Europäische Union
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-triphosphat	ExAC	Exome Aggregation Consortium
dest	destillata, einfach destilliert	F	Frankreich
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat	F	forward, vorwärts
dNTP	Desoxyribonukleosid-triphosphat	HCl	Acidum hydrochloricum, Salzsäure
DRPLA	Dentatorubro-Pallidoluisische Atrophie	ILOCA	idiopathische degenerative Ataxie(n), idiopathic late onset cerebellar ataxia
dsDNA	double-stranded DNA, doppelsträngige DNA	in silico	computersimuliert
dTTP	Desoxythymidintriphosphat	IRL	Irland

IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry	R	reverse, rückwärts
kb	Kilobasen	rpm	rotation per minute, Umdrehungen pro Minute
µg	Mikrogramm	s	siehe
µl	Mikroliter	S	Seite
µM	Mikromolar, µmol/l	SCA	spinocerebelläre Ataxie(en)
M	Molar, mol/l	SNP	single nucleotide polymorphism, Einzelnukleotid-Polymorphismus
MAF	Minor allele frequency, Allelfrequenz des selteneren Allels	SNV	single nucleotide variant, Einzelnukleotid-Variante
mM	Millimolar, mmol/l	STGD3	Morbus Stargardt Typ 3
mRNA	Messenger-RNA	TBE	TRIS-Borat-EDTA
MRT	Magnetresonanztomographie	TF	Transkriptionsfaktor
NGS	Next-Generation-Sequencing	TM	Transmembrandomäne
nm	Nanometer	ULCFA	ultra long-chain fatty acids
Nucl.	Nucleus	UTR	untranslated region, untranslatierte Region
ω	omega	UV	ultraviolett
PCR	Polymerase-chain-reaction, Polymerase-Kettenreaktion	V	Volt
pH	potentia Hydrogenii	VLCFA	very long-chain fatty acids
PL	Polen	ZNS	Zentrales Nervensystem

IUPAC Aminosäuren Buchstabencode			IUPAC Nukleotidcode	
Alanin	Ala	A	A	Adenin
Arginin	Arg	R	C	Cytosin
Asparagin	Asn	N	G	Guanin
Asparaginsäure	Asp	D	T	Thymin
Cystein	Cys	C	U	Uracil
Glutamin	Gln	Q	R	A oder G
Glutaminsäure	Glu	E	Y	C oder T
Glycin	Gly	G	S	G oder C
Histidin	His	H	W	A oder T
Isoleucin	Ile	I	K	G oder T
Leucin	Leu	L	M	A oder C
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		

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Einteilung der cerebellären Ataxien, modifiziert nach (Manto & Marmolino, 2009; Bürk, 2015).....	1
Abbildung 1.2 Globale Häufigkeit der SCA-Subtypen, nach (Bird, 2019).....	6
Abbildung 1.3 <i>ELOVL4</i> -Transkript und SCA34 assoziierte Sequenzänderungen	17
Abbildung 1.4 <i>ELOVL4</i> -Proteinschema, modifiziert nach (Ozaki, et al., 2015).....	18
Abbildung 2.1 Dreistufige PCR, modifiziert nach (Lottspeich & Engels, 2012, p. 830).....	29
Abbildung 2.2 Schema der PCR, nach Michael Goodman, in (Mullis, 1990, p. 65)	30
Abbildung 2.3 Beispielbild eines Agarosegels.....	33
Abbildung 2.4 Elektropherogramm einer Beispielsequenz in Finch TV aus Exon 6.....	38
Abbildung 3.1 Sequenzausschnitt Exon 1, <i>ELOVL4</i> (c.-236C>T)	42
Abbildung 3.2 Sequenzausschnitt Exon 1, <i>ELOVL4</i> (c.-90G>C).....	43
Abbildung 3.3 Sequenzausschnitt Intron 2, <i>ELOVL4</i> (c.289-99T>C)	44
Abbildung 3.4 Sequenzausschnitt Intron 3, <i>ELOVL4</i> (c.370-118_370-117delCCinsGA)	45
Abbildung 3.5 Sequenzausschnitt Intron 4, <i>ELOVL4</i> (c.541+60G>A).....	45
Abbildung 3.6 Sequenzausschnitt Exon 6, <i>ELOVL4</i> (c.751C>G)	46
Abbildung 3.7 Sequenzausschnitt Exon 6, <i>ELOVL4</i> (c.800T>C).....	47
Abbildung 3.8 Sequenzausschnitt Exon 6, <i>ELOVL4</i> (c.814G>C)	48
Abbildung 3.9 Sequenzausschnitt Exon 6, <i>ELOVL4</i> (c.895A>G)	48
Abbildung 3.10 Sequenzausschnitt Exon 6 / 3'-UTR, <i>ELOVL4</i> (c.*32G>C)	49
Abbildung 3.11 Sequenzausschnitt Exon 6 / 3'-UTR, <i>ELOVL4</i> (c.*142G>C)	50
Abbildung 3.12 Alignment-Analyse der Variante p.Leu251Val in MutationTaster	52
Abbildung 3.13 Variante p.Leu251Val im <i>ELOVL4</i> -Proteinschema	53

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 Übersicht der spinocerebellären Ataxien.....	7
Tabelle 1.2 Beschriebene pathogene Varianten in <i>ELOVL4</i>	20
Tabelle 2.1 Enzyme und Chemikalien.....	22
Tabelle 2.2 Kits	23
Tabelle 2.3 Primer zur Amplifizierung des <i>ELOVL4</i> -Gens.....	24
Tabelle 2.4 Verbrauchsmaterialien.....	25
Tabelle 2.5 Geräte.....	25
Tabelle 2.6 Software und Datenbanken.....	26
Tabelle 2.7 PCR-Reaktionsansätze für fünf Proben (Gesamtvolumen 200 µl).....	31
Tabelle 2.8 PCR-Bedingungen der <i>ELOVL4</i> -Exons	31
Tabelle 2.9 Sequenzier-Ansatz (pro Probe).....	36
Tabelle 2.10 Sequenzier-Bedingungen der <i>ELOVL4</i> -Exons	36
Tabelle 3.1: <i>ELOVL4</i> -Gen, -Transkript und -Protein	41
Tabelle 3.2 Nachgewiesene Varianten im <i>ELOVL4</i> -Gen.....	51

10. Literaturverzeichnis

- Adzhubei, I., Jordan, D. & Sunyaev, S., 2013. Predicting Functional Effect of Human Missense Mutations Using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet*, Issue 7, p. 7.20.
- Affymetrix, 2016. *USB Exo-SAP-IT PCR cleanup reagent*. [Online] Available at: <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/78201.1.ML> [Zugriff am 03 05 2018].
- Agaba, M.-P., 2016. Different Mutations in ELOVL4 Affect Very Long Chain Fatty Acid Biosynthesis to Cause Variable Neurological Disorders in Humans. *Adv Exp Med Biol.*, Issue 854, pp. 129-35.
- Agaba, M.-P., Brush, R.S., Mandal, N.A., Henry, K., Elliott, M.H., Anderson, R.E, 2008. Role of Stargardt-3 macular dystrophy protein (ELOVL4) in the biosynthesis of very long chain fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 105(35), pp. 12843-8.
- Agaba, M.-P., Stiles, M.A., Brush, R.S., Sullivan, M.T., Machalinski, A., Jones, K.L., Anderson, R.E., Sherry, D.M., 2020. The Elov14 Spinocerebellar Ataxia-34 Mutation 736T>G (p.W246G) Impairs Retinal Function in the Absence of Photoreceptor Degeneration. *Mol Neurobiol.*, 57(11), pp. 4735-53.
- Aldahmesh, M., Mohamed, J.Y., Alkuraya, H.S., Verma, I.C., Puri, R.D., Alaiya, A.A., Rizzo, W.B., Alkuraya, F.S., 2011. Recessive Mutations in ELOVL4 Cause Ichthyosis, Intellectual Disability, and Spastic Quadriplegia. *Am J Hum Genet.*, 89(6), pp. 745-750.
- Ambasudhan, R., Wang, X., Jablonski, M.M., Thompson, D.A., Lagali, P.S., Wong, P.W., Sieving, P.A. et al., 2004. Atrophic macular degeneration mutations in ELOVL4 result in the intracellular misrouting of the protein. *Genomics*, 83(4), pp. 615-625.
- Beaudin, M., Matilla-Dueñas, A., Soong, B.-W., Pedroso, J.L., Barsottini, O.G., Mitoma, H., Tsuji, S., Schahmann, J.D. et al., 2019. The Classification of Autosomal Recessive Cerebellar Ataxias: a Consensus Statement from the Society for Research on the Cerebellum and Ataxias Task Force. *The Cerebellum*, Issue 18, pp. 1098-125.
- Beaudin, M., Sellami, L., Martel, C., Touzel-Deschenes, L., Houle, G., Martineau, L., Lacroix, K., Lavallee, A. et al., 2020. Characterization of the phenotype with cognitive impairment and protein mislocalization in SCA34. *Neurol Genet*, 6(2), p. e403.
- Ben Gedalya, T., Loeb, V., Israeli, E., Altschuler, Y., Selkoe, D.J., Sharon, R., 2009. α -Synuclein and PolyUnsaturated Fatty Acids Promote Clathrin Mediated Endocytosis and Synaptic Vesicle Recycling. *Traffic*, 10(2), pp. 218-34.
- Bernstein, P., Tammur, J., Singh, N., Hutchinson, A., Dixon, M., Pappas, C.M., Zabriskie, N.A. et al., 2001. Diverse macular dystrophy phenotype caused by a novel complex mutation in the ELOVL4 gene. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 42(13), pp. 3331-6.

- Bird, T., 2019. Hereditary Ataxia Overview. *Gene Reviews*, Issue 1993-2019.
- Bourassa, C., Raskin, S., Serafini, S., Teive, H.A., Dion, P.A., Rouleau, G.A., 2015. A New ELOVL4 Mutation in a Case of Spinocerebellar Ataxia With Erythrokeratodermia. *JAMA Neurol.*, 72(8), pp. 942-943.
- Bourque, P., Warman-Chardon, J., Lelli, D.A., LaBerge, L., Kirshen, C., Bradshaw, S.H., Hartley, T. et al., 2018. Novel ELOVL4 mutation associated with erythrokeratodermia and spinocerebellar ataxia (SCA 34). *Neurol Genet*, 4(4), p. e263.
- Bürk, K., 2015. Ataxien. In: W. Hacke, Hrsg. *Neurologie*. 14. Hrsg. Berlin: Springer, pp. 625-643.
- Buselmaier, W. & Tariverdian, G., 2007. *Humangenetik*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag.
- Bushart, D., Murphy, G. & Shakkottai, V., 2016. Precision medicine in spinocerebellar ataxias: treatment based on common mechanisms of disease. *Ann Transl Med* 2016;4(2):25, 4(2), p. 25.
- Cadioux-Dion, M., Turcotte-Gauthier, M., Noreau, A., Martin, C., Meloche, C., Gravel, M., Drouin, C.A. et al., 2014. Expanding the clinical phenotype associated with ELOVL4 mutation study of a large French-Canadian family with autosomal dominant spinocerebellar ataxia and erythrokeratodermia. *JAMA Neurol.*, 71(4), pp. 470-475.
- Campuzano, V., Montermini, L., Moltò, M.D., Pianese, L., Cossée, M., Cavalcanti, F., Monros, E. et al., 1996. Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science*, 271(5254), pp. 1423-1427.
- Chang, C.-Y., Perng, C.-L., Cheng, S.-N., Hu, S.-H., Wu, T.-Y., Lin, S.-Y., Chen, Y.-C., 2019. Deep intronic variant c.5999-277G>A of F8 gene may be a hot spot mutation for mild hemophilia A patients without mutation in exonic DNA. *Eur J Haematol*, 103(1), pp. 47-55.
- Chinnery, P., 2014. Mitochondrial Disorders Overview. *Gene Reviews*, Issue 1993-2018.
- Choi, K.-D. & Choi, J.-H., 2016. Episodic Ataxias: Clinical and Genetic Features. *J Mov Disord*, 9(3), pp. 129-135.
- Choi, Y., Sims, G.E., Murphy, S., Miller, J.R., Chan, A.P., 2012. Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels. *PLoS ONE*, 7(10), p. e46688.
- Commission of the European Communities, 2008. *Communication on Rare Diseases: Europe's challenges*, Brussels: s.n.
- Coutinho, P. & Barbot, C., 2015. Ataxia with Oculomotor Apraxia Type 1. *GeneReviews*, Issue 1993-2020.

- Coutinho, P., Ruano, L., Loureiro, J.L., Cruz, V.T., Barros, J., A., Tuna., Barbot, C. et al., 2013. Hereditary ataxia and spastic paraplegia in Portugal: a population-based prevalence study. *JAMA Neurol*, 70(6), pp. 746-55.
- David, G., Dürr, A., Stevanin, G., Cancel, G., Abbas, N., Benomar, A., Belal, S. et al., 1998. Molecular and clinical correlations in autosomal dominant cerebellar ataxia with progressive macular dystrophy (SCA7). *Hum Mol Genet.*, 7(2), pp. 165-170.
- Deak, F., Anderson, R., Fessler, J. & Sherry, D., 2019. Novel Cellular Functions of Very Long Chain-Fatty Acids: Insight From ELOVL4 Mutations. *Front Cell Neurosci.*, 09, 13(428).
- Deamer, D., Akeson, M. & Branton, D., 2016. Three decades of nanopore sequencing. *Nat. Biotechnol*, Deamer, D., Akeson, M., and Branton, D. (2016). Three decades of nanopore, Issue 34, p. 518–524.
- Denic, V. & Weissman, J., 2007. A Molecular Caliper Mechanism for Determining Very Long-Chain Fatty Acids. *Cell*, Issue 130, pp. 663-677.
- Di Gregorio, E., Borroni, B., Giorgio, E., Lacerenza, D., Ferrero, M., Lo Buono, M.N., Ragusa, N. et al., 2014. ELOVL5 Mutations Cause Spinocerebellar Ataxia 38. *Am J Hum Genet.*, 95(2), p. 209–217.
- Donato, L., Scimone, C., Rinaldi, C., Aragona, P., Briuglia, S., D'Ascola, A., D'Angelo, R. et al., 2018. Stargardt Phenotype Associated With Two ELOVL4 Promoter Variants and ELOVL4 Downregulation: New Possible Perspective to Etiopathogenesis?. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, Issue 59, pp. 843-57.
- Duarri, A., Nibbeling, E.A.R., Fokkens, M.R., Meijer, M., Boerrigter, M., Verschuuren-Bemelmans, C.C. et al., 2015. Functional Analysis Helps to Define KCNC3 Mutational Spectrum in Dutch Ataxia Cases. *PLoS One*, 10(3).
- Durr, A., 2010. Autosomal dominant cerebellar ataxias: polyglutamine expansions and beyond. *Lancet Neurol.*, Issue 9, pp. 885-894.
- Edwards, A., Donoso, L. & Ritter, R., 2001. A novel gene for autosomal dominant Stargardt-like macular dystrophy with homology to the SUR4 protein family. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 42(11), pp. 2652-63.
- Erichsen, Koht, J., Stray-Pedersen, A., Abdelnoor, M., Tallaksen, C.M., 2009. Prevalence of hereditary ataxia and spastic paraplegia in southeast Norway: a population-based study. 132(6), pp. 1577-88.
- Fogel, B., Salamon, N. & Perlman, S., 2009. Progressive spinocerebellar ataxia mimicked by a presumptive cerebellar arteriovenous malformation. *European Journal of Radiology Extra*, 71(1), pp. e1-e2.
- Gatti, R. & Perlman, S., 2016. Ataxia-Telangiectasia. *GeneReviews*, Issue 1993-2020.
- GenDG, 2009. *Gesetz über genetische Untersuchungen bei Menschen (Gendiagnostikgesetz)*. (BGBl. I S. 2529, 3672): zuletzt durch Art. 2 Abs. 1 des Gesetzes vom 4. November 2016 (BGBl. I S. 2560) geändert worden.

- Genis, D., Ortega-Cubero, S., San Nicolás, S., Corral, J., Gardenyes, J., de Jorge, L., López, E. et al., 2018. Heterozygous STUB1 mutation causes familial ataxia with cognitive affective syndrome (SCA48). *Neurology*, 91(21), pp. e1988-e1998.
- Giroux, J.-M. & Barbeau, A., 1972. Erythrokeratoderma With Ataxia. *Arch Dermatol.*, 106(2), pp. 183-188.
- GIT Labor-Fachzeitschrift, 2017. *Polymerase-Kettenreaktion (PCR) Teil 2 Primerdesign*. [Online] Available at: <https://www.git-labor.de/file/track/15718/1> [Zugriff am 07 Mai 2018].
- Grayson, C. & Molday, R., 2005. Dominant Negative Mechanism Underlies Autosomal Dominant Stargardt-like Macular Dystrophy Linked to Mutations in ELOVL4. *J Biol Chem.*, 280(30), pp. 32521-30.
- Guillou, H., Zdravec, D., Martin, P. & Jacobsson, A., 2010. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Prog Lipid Res.*, 49(2), pp. 186-199.
- Harding, A., 1982. The clinical features and classification of the late onset autosomal dominant cerebellar ataxias. *Brain*, Issue 105, pp. 1-28.
- Harkewicz, R., Du, H., Tong, Z., Alkuraya, H., Bedell, M., Sun, W., Wang, X. et al., 2012. Essential Role of ELOVL4 Protein in Very Long Chain Fatty Acid Synthesis and Retinal Function. *J Biol Chem.*, 287(14), pp. 11469-80.
- Hopiavuori, B., Anderson, R. & Agbaga, M.-P., 2019. ELOVL4: Very long-chain fatty acids serve an eclectic role in mammalian health and function. *Prog Retin Eye Res.*, Issue 69, p. 137–158.
- Hopiavuori, B., Deák, F., Wilkerson, J.L., Brush, R.S., Rocha-Hopiavuori, N.A., Hopiavuori, A.R., Ozan, K.G. et al., 2018. Homozygous Expression of Mutant ELOVL4 Leads to Seizures and Death in a Novel Animal Model of Very Long-Chain Fatty Acid Deficiency. *Mol Neurobiol.*, 55(2), pp. 1759-1813.
- Howe, K., Achuthan, P., Allen, J., Allen, J., Alvarez-Jarreta, J., Amode, M.R., Armean, I.M. et al., 2021. Ensembl 2021. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), pp. D884-D891.
- Jackson, M., Nilsson, T. & Peterson, P., 1990. Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *EMBO J.*, Issue 9, pp. 3153-3162.
- Jakobsson, A., Westerberg, R. & Jacobsson, A., 2006. Fatty acid elongases in mammals: Their regulation and roles in metabolism. *Prog Lipid Res.*, 45(3), pp. 237-249.
- Jardim, L., Silveira, I., Pereira, M.L., Ferro, A., Alonso, I., do Céu Moreira, M., Mendonça, P. et al., 2001. A survey of spinocerebellar ataxia in South Brazil - 66 new cases with Machado-Joseph disease, SCA7, SCA8, or unidentified disease-causing mutations. *J Neurol*, 248(10), pp. 870-6.

- Karan, G., Lillo, C., Yang, Z., Cameron, D.J., Locke, K.G., Zhao, Y., Thirumalaichary, S. et al., 2005. Lipofuscin accumulation, abnormal electrophysiology, and photoreceptor degeneration in mutant ELOVL4 transgenic mice: A model for macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 102(11), pp. 4164-4169.
- Kim, B.-R., Lim, J.-H., Lee, S.A., Park, S., Koh, S.-E., Lee, I.-S., Jung, H., Lee, J., 2011. Usefulness of the Scale for the Assessment and Rating of Ataxia (SARA) in Ataxic Stroke Patients. *Ann Rehabil Med*, Band 35, pp. 772-780.
- Kim, J. & Cho, J., 2015. Hereditary Cerebellar Ataxias: A Korean Perspective. *J Mov Disord*, 8(2), pp. 67-75.
- Klockgether, T. & Paulson, H., 2011. Milestones in ataxia. *Mov Disord*, 26(6), p. 1134–1141.
- Koeppen, A. & Mazurkiewicz, J., 2013. Friedreich Ataxia: Neuropathology Revised. *J Neuropathol Exp Neurol.*, 72(2).
- Lagali, P., Liu, J., Ambasudhan, R., Kakuk, L.E., Bernstein, S.L., Seigel, G.M., Wong, P.W. et al., 2003. Evolutionarily conserved ELOVL4 gene expression in the vertebrate retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 44(7), pp. 2841-50.
- Lebre, A.-S. & Brice, A., 2003. Spinocerebellar ataxia 7 (SCA7). *Cytogenet Genome Res*, Issue 100, pp. 154-163.
- Lee, Y.-C., Liu, C.-S., Wu, H.-M., Wang, P.-S., Chang, M.-H., Soong, B.-W., 2009. The hot cross bun' sign in the patients with spinocerebellar ataxia. *Eur J Neurol*, 16(4), pp. 513-516.
- Li, G., Cui, S., Du, J., Liu, J., Zhang, P., Fu, Y., He, Y., Zhou, H. et al., 2018. Association of GALC, ZNF184, IL1R2 and ELOVL7 With Parkinson's Disease in Southern Chinese. *Front. Aging Neurosci.*, 10(402).
- Li, W., Sandhoff, R., Kono, M., Zerfas, P., Hoffmann, V., Ding, B.C., Proia, R.L. et al., 2007. Depletion of ceramides with very long chain fatty acids causes defective skin permeability barrier function, and neonatal lethality in ELOVL4 deficient mice. *Int J Biol Sci.*, 3(2), pp. 120-128.
- Lottspeich, F. & Engels, J., 2012. *Bioanalytik*. 3. Hrsg. Berlin: Springer Spektrum.
- Mandal, Ambasudhan, R., Wong, P.W., Gage, P.J., Sieving, P.A., Ayyagari, R., 2004. Characterization of mouse orthologue of ELOVL4: genomic organization and spatial and temporal expression. *Genomics*, Issue 83, pp. 626-635.
- Manes, M., Alberici, A., Di Gregorio, E., Boccone, L., Premi, E., Mitro, N., Pasolini, M.P. et al., 2017. Docosahexaenoic acid is a beneficial replacement treatment for spinocerebellar ataxia 38. *Ann Neurol.*, 82(4), p. 615–621.
- Mantere, T., Kersten, S. & Hoischen, A., 2019. Long-Read Sequencing Emerging in Medical Genetics. *Front Genet*, 10(426).

- Manto, M. & Marmolino, D., 2009. Cerebellar ataxias. *Current Opinion in Neurology*, Issue 22, pp. 419-429.
- Matilla-Dueñas, A., 2012. The Ever Expanding Spinocerebellar Ataxias. Editorial. *Cerebellum*, 11(4), p. 821–7.
- Matilla-Dueñas, A., Ashizawa, T., Brice, A., Magri, S., McFarland, K.N., Pandolfo, M., Pulst, S.M. et al., 2014. Consensus Paper: Pathological Mechanisms Underlying Neurodegeneration in Spinocerebellar Ataxias. *Cerebellum*, 13(2), pp. 269-302.
- Maugeri, A., Meire, F., Hoyng, C.B., Vink, C., Van Regemorter, N., Karan, G., Yang, Z. et al., 2004. A novel mutation in the ELOVL4 gene causes autosomal dominant Stargardt-like macular dystrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45(12), pp. 4263-7.
- McMahon, A., Jackson, S., Woods, A. & Kedzierska, W., 2007. A Stargardt disease-3 mutation in the mouse Elov14 gene causes retinal deficiency of C32-C36 acyl phosphatidylcholines. *FEBS Lett.*, 581(28), pp. 5459-5463.
- Mir, H. Raza, S.I., Touseef, M, Memon, M.M., Khan, M.N., Jaffar, S., Ahmad, W., 2014. A novel recessive mutation in the gene ELOVL4 causes a neuro-ichthyotic disorder with variable expressivity. *BMC Med Genet.*, 15(25).
- Miyai, I., Ito, M., Hattori, N., Mihara, M., Hatakenaka, M., Yagura, H., Sobue, G. et al., 2012. Cerebellar Ataxia Rehabilitation Trial in Degenerative Cerebellar Diseases. *Neural Repair*, 26(5), pp. 515-522.
- Moore, L., Rajpal, G., Dillingham, I.T., Qutob, M., Blumenstein, K.G., Gattis, D., Hung, G. et al., 2017. Evaluation of Antisense Oligonucleotides Targeting ATXN3 in SCA3 Mouse Models. *Mol Ther Nucleic Acids*, Issue 7, pp. 200-210.
- Moreira, M.-C. & Koenig, M., 2018. Ataxia with Oculomotor Apraxia Type 2. *GeneReviews*, Issue 1993-2020.
- Mueller, N., Sassa, T., Morales-Gonzalez, S., Schneider, J., Salchow, D.J., Seelow, D., Knierim, E. et al., 2019. De Novo Mutation in ELOVL1 Causes Ichthyosis, acanthosis nigricans, Hypomyelination, Spastic Paraplegia, High Frequency Deafness and Optic Atrophy. 56(3), pp. 164-75.
- Mullis, K. B., 1990. Eine Nachtfahrt und die Polymerase-Kettenreaktion. *Spektrum der Wissenschaft*, Issue 6, pp. 60-67.
- Ng, P., Henikoff, J. & Henikoff, S., 2000. PHAT: a transmembrane-specific substitution matrix. Predicted hydrophobic and transmembrane. *Bioinformatics*, 16(9), pp. 760-6.
- Nolte, D. & Müller, U., 2006. Punktmutationen und Deletionen bei spinocerebellären Ataxien. *Neuroforum*, 12(4), pp. 260-265.
- Nolte, D., Sobanski, E., Wißen, A., Regula, J.U., Lichy, C., Müller, U., 2010. Spinocerebellar ataxia type 17 associated with an expansion of 42 glutamine residues in TATA-box binding protein gene. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 81(12), pp. 1396-1399.

- Ohno, Y., Suto, S., Yamanaka, M., Mizutani, Y., Mitsutake, S., Igarashi, Y., Sassa, T. et al., 2010. ELOVL1 production of C24 acyl-CoAs is linked to C24 sphingolipid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 107(43), pp. 18439-18444.
- OMIM, 2020. #618093 *Spinocerebellar Ataxia 48 (last edited 29.11.18)*. [Online] Available at: <https://www.omim.org/entry/618093?search=sca48&highlight=sca48> [Zugriff am 05 2020].
- Ozaki, K., Ansai, A., Nobuhara, K., Araki, T., Kubodera, T., Ishii, T., Higashi, M. et al., 2019. Prevalence and clinoradiological features of spinocerebellar ataxia type 34 in a Japanese ataxia cohort. *Parkinsonism Relat Disord.*, Band 65, pp. 238-42.
- Ozaki, K., Doi, H., Mitsui, J., Sato, N., Iikuni, Y., Majima, T., Yamana, K. et al., 2015. A Novel Mutation in ELOVL4 Leading to Spinocerebellar Ataxia (SCA) With the Hot Cross Bun Sign but Lacking Erythrokeratodermia: A Broadened Spectrum of SCA34. *JAMA Neurol.*, 72(7), pp. 797-805.
- Parodi, L., Coarelli, G., Stevanin, G., Brice, A., Durr, A., 2018. Hereditary ataxias and paraparesias: clinical and genetic update. *Curr Opin Neurol.*, 31(4), pp. 462-471.
- Paulson, H., 2009. The Spinocerebellar Ataxias. *J Neuroophthalmol.*, 29(3), pp. 227-237.
- Pfeffer, G., Blakely, E.L., Alston, C.L., Hassani, A., Boggild, M., Horvath, R., Samuels, D.C. et al., 2012. Adult-onset spinocerebellar ataxia syndromes due to MTATP6 mutations. *Neurol Neurosurg Psychiatry*, 83(9), pp. 883-6.
- Plon, S., Eccles, D.M., Easton, D., Foulkes, W.D., Genuardi, M., Greenblatt, M.S., Hogervorst, F.B. et al., IARC Unclassified Genetic Variants Working Group, 2008. Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. *Hum Mutat.*, 29(11), pp. 1282-91.
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W.W. et al., 2015. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet.Med.*, 17(5).
- Roberts, R., Carneiro, M. & Schatz, M., 2013. The advantages of SMRT sequencing. *Genome Biol*, 14(7), p. 405.
- Ruano, L., Melo, C., Silva, M. & Coutinho, P., 2014. The global epidemiology of hereditary ataxia and spastic paraplegia: a systematic review of prevalence studies. *Neuroepidemiology*, 42(3), pp. 174-183.
- Rüb, U., Schöls, L., Paulson, H., Auburger, G., Kermer, P., Jen, J.C., Seidel, K., Korf, H.-W. et al., 2013. Clinical features, neurogenetics and neuropathologie of the polyglutamine spinocerebellar ataxias type 1, 2, 3, 6 and 7. *Progress in Neurobiology*, Band 104, pp. 38-66.
- Sailer, A. & Houlden, H., 2012. Recent Advances in the Genetics of Cerebellar Ataxias. *Curr Neurol Neurosci Rep*, Band 12, pp. 227-236.

- Sandford, E. & Burmeister, M., 2014. Genes and Genetic Testing in Hereditary Ataxias. *Genes*, Issue 5, pp. 586-603.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A., 1977. DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS*, 74(12), pp. 5463-5467.
- Sassa, T. & Kihara, A., 2014. Metabolism of Very Long-Chain Fatty Acids: Genes and Pathophysiology. *Biomol Ther*, 22(2), pp. 83-92.
- Schmitz-Hübsch, T., du Montcel, S.T., Baliko, L., Bericano, J., Boesch, S., Depondt, C., Giunti, P., 2006. Scale for the assessment and rating of ataxia: development of a new clinical scale. *Neurobiologie*, 66(11), pp. 1717-1720.
- Schöls, L., Amoiridis, G., Büttner, T., Przuntek, H., Epplen, J.T., Riess, O., 1997. Autosomal dominant cerebellar ataxia: phenotypic differences in genetically defined subtypes?. *Ann Neurol.*, 42(6), pp. 924-932.
- Schuelke, M., 2016. Ataxia with Vitamin E Deficiency. *GeneReviews*, Issue 1993-2020.
- Schwarz, J., Cooper, D., Schuelke, M. & Seelow, D., 2014. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nature Methods*, Issue 11, p. 361–362.
- Scoles, D., Meera, P., Schneider, M.D., Paul, S., Dansithong, W., Figueroa, K.P., Hung, G., Rigo, F. et al., 2017. Antisense oligonucleotide therapy for spinocerebellar ataxia type 2. *Nature*, 544(7650), pp. 362-366.
- Seidel, K., Siswanto, S., Brunt, E.R.P., den Dunnen, W., Korf, H.-W., Rüb, U., 2012. Brain pathology of spinocerebellar ataxias. *Acta Neuropathol*, Issue 124, pp. 1-21.
- Shakkottai, V. & Fogel, B., 2013. Autosomal Dominant Spinocerebellar Ataxia. *Neurol Clin.*, 31(4).
- Sherry, D., Hopiavuori, B.R., Stiles, M.A., Rahman, N.S., Ozan, K.G., Deak, F., Agbaga, M.-P., Anderson, R.E., 2017. Distribution of ELOVL4 in the Developing and Adult Mouse Brain. *Front. Neuroanat.*, 11(38).
- Sherry, S., Ward, M.H., Kholodov, M., Baker, J., Phan, L., Smigielski, E.M., Sirotkin, K., 2001. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res*, 29(1), pp. 308-11.
- Shi, Y., Wang, J., Li, J.-D., Ren, H., Guan, W., He, M., Yan, W. et al., 2013. Identification of CHIP as a Novel Causative Gene for Autosomal Recessive Cerebellar Ataxia. *PLoS ONE*, 8(12), p. e81884..
- Steiner, T. & Diem, R., 2015. Kleinhirnfunktion und Bewegungskoordination. In: W. Hacke, Hrsg. *Neurologie*. 14. Hrsg. Berlin: Springer, pp. 52-57.
- Sullivan, R., Yau, W., O'Connor, E. & Houlden, H., 2019. Spinocerebellar ataxia: an update. *J Neurol.*, 266(2), pp. 533-44.
- Sun, Y.-M., Lu, C. & Wu, Z.-Y., 2016. Spinocerebellar ataxia: relationship between phenotype and genotype – a review. *Clinical Genetics*, Band 60, pp. 306-314.

- Synofzik, M., Schüle, R., Schulze, M., Gburek-Augustat, J., Schweizer, R., Schirmacher, A., Krägeloh-Mann, I. et al., 2014. Phenotype and frequency of STUB1 mutations: next-generation screenings in Caucasian ataxia and spastic paraplegia cohorts. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 9(57).
- Tao, J., Wang, Y., Li, L., Zheng, J., Liang, S., 2020. Critical Roles of ELOVL4 and IL-33 in the Progression of Obesity-Related Cardiomyopathy via Integrated Bioinformatics Analysis. *Front. Physiol.*, 11(542).
- The 1000 Genomes Project Consortium, Auton, A., Brooks, L.D., Durbin, R.M., Garrison, E.P., Kang, H., Korbel, J.O. et al., 2015. A global reference for human genetic variation. *Nature*, Band 526, pp. 68-74.
- The UniProt Consortium, 2017. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.*, 45(D1), pp. D158-D169.
- Thorburn, D.R., Rahman, J. & Rahman, S., 2017. Mitochondrial DNA-Associated Leigh Syndrome and NARP. *GeneReviews*, Issue 1993-2020.
- Toyoshima, Y., Onodera, O., Yamada, M., Tsuji, S., Takahashi, H., 2019. Spinocerebellar Ataxia Type 17. *GeneReviews*, Issue 1993-2020.
- Tsuji, S., Onodera, O., Goto, J., Nishizawa, M., Study Group on Ataxic Diseases, 2008. Sporadic ataxias in Japan: a population-based epidemiological study. *Cerebellum*, 7(2), pp. 189-97.
- Turcotte Gauthier, M., 2010. Etude clinique et genetique d'une nouvelle forme d'ataxie spinocerebelleuse pure associee a l'erythrokeratodermie. *M.Sc. Thesis: Univ. Montreal (Faculte de Medecine)*.
- van de Warrenburg, B., Sinke, R.J., Verschuuren-Bemelmans, C.C., Scheffer, H., Brunt, E.R., Ippel, P.F., Maat-Kievit, J.A. et al., 2002. Spinocerebellar ataxias in the Netherlands: prevalence and age at onset variance analysis. *Neurology*, 58(5), pp. 702-8.
- van de Warrenburg, B., van Gaalen, J., Boesch, S., Burgunder, J.-M., Dürr, A., Giunti, P., Klockgether, T. et al., 2014. EFNS/ENS Consensus on the diagnosis and management. *Eur J Neurol.*, 21(4), pp. 552-62.
- Vasireddy, V., Jablonski, M.M., Mandal, N.A., Raz-Prag, D., Wang, X.F., Nizol, L., Iannaccone, A. et al., 2006. Elov14 5-bp-Deletion Knock-in Mice Develop Progressive Photoreceptor Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 47(10), pp. 4558-68.
- Vasireddy, V., Uchida, Y., Salem, N., Kim, S.Y., Mandal, N.A., Reddy, G.B., Bodepudi, R. et al., 2007. Loss of functional ELOVL4 depletes very long-chain fatty acids ($\geq C28$) and the unique ω -O-acylceramides in skin leading to neonatal death. *Hum Mol Genet.*, pp. 471-482.

- Vasireddy, V., Vijayasathy, C., Huang, J., Wang, X.F., Jablonski, M.M., Petty, H.R., Sieving, P.A. et al., 2005. Stargardt-like macular dystrophy protein ELOVL4 exerts a dominant negative effect by recruiting wild-type protein into aggresomes. *Mol Vis.*, Issue 11, pp. 665-676.
- Vasireddy, V., Wong, P. & Ayyagaria, R., 2010. Genetics and molecular pathology of Stargardt-like macular degeneration. *Prog Retin Eye Res.*, 29(3), pp. 191-207.
- Vaz-Drago, R., Custódio, N. & Carmo-Fonseca, M., 2017. Deep intronic mutations and human disease. *Human Genetics*, Issue 136, p. 1093–1111.
- Velázquez Pérez, L., Cruz, G.S., Santos Falcón, N., Enrique Almaguer Mederos, L., Escalona Batallan, K., Rodríguez Labrada, R., Paneque Herrera, M. et al., 2009. Molecular epidemiology of spinocerebellar ataxias in Cuba: insights into SCA2 founder effect in Holguin. *Neurosci Lett*, 424(9), pp. 157-60.
- Waters, M., Minassian, N.A., Stevanin, G., Figueroa, K.P., Bannister, J.P., Nolte, D., Mock, A.F. et al., 2006. Mutations in voltage-gated potassium channel KCNC3 cause degenerative and developmental central nervous system phenotypes. *Nat Genet.*, 38(4), pp. 447-451.
- Weyer, A., Abele, M., Schmitz-Hübsch, T., Schoch, B., Frings, M., Timmann, D., Klockgether, T., 2007. Reliability and validity of the scale for the assessment and rating of ataxia: a study in 64 ataxia patients. *Mov Disord.*, 15 08, 22(11), pp. 1633-7.
- White, M., Gao, R., Xu, W., Mandal, S.M., Lim, J.G., Hazra, T.K., Wakamiya, M. et al., 2010. Inactivation of hnRNP K by Expanded Intronic AUUCU Repeat Induces Apoptosis Via Translocation of PKCδ to Mitochondria in Spinocerebellar Ataxia 10. *PLoS Genet.*, 6(6).
- Xiao, C., Binkley, E.M., Rexach, J., Knight-Johnson, A., Khemani, P., Fogel, B.L., Das, S. et al., 2019. A family with spinocerebellar ataxia and retinitis pigmentosa attributed to an ELOVL4 mutation. *Neurol Genet*, 5(5), p. e357.
- Zanni, G. & Bertini, E., 2011. X-linked disorders with cerebellar dysgenesis. *Orphanet J Rare Dis.*, 6(24).
- Zesiewicz, T., Wilmot, G., Kuo, S.-H., Perlman, S., Greenstein, P.E., Ying, S.H., Ashizawa, T. et al., 2018. Comprehensive systematic review summary: Treatment of cerebellar motor dysfunction and ataxia. *Neurology*, Issue 90, pp. 464-471.
- Zhang, K., Kniazeva, M., Han, M., Li, W., Yu, Z., Yang, Z., Li, Y. et al., 2001. A 5-bp deletion in ELOVL4 is associated with two related forms of autosomal dominant macular dystrophy. *Nat Genet.*, 27(1), pp. 89-93.
- Zu, T., Gibbens, B., Doty, N.S., Gomes-Pereira, M., Huguet, A., Stone, M.D., Margolis, J. et al., 2011. Non-ATG-initiated translation directed by microsatellite expansions. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 108(1), pp. 260-265.

11. Ehrenwörtliche Erklärung zur Dissertation

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

Datum

Unterschrift

12. Danksagung

Herzlich bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Dagmar Nolte für die Vergabe des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Materialien sowie die exzellente Betreuung vom ersten Tag an bis zuletzt. Ihre Unterstützung, Anleitung und zahlreiche wertvolle Anmerkungen haben entscheidend zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Mein Dank gilt den Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik der Justus-Liebig-Universität Gießen, speziell Frau Pia Winter und Frau Anika Beitler, für die Einarbeitung in die Methoden eines molekulargenetischen Labors, die freundliche Zusammenarbeit und die vielen hilfreichen Ratschläge.

Ich bedanke mich bei meiner Familie und Freunden, die mich in den letzten Jahren begleitet und ermutigt haben und schließlich bei meinem Ehemann, ohne dessen Hilfe und Unterstützung diese Arbeit nicht hätte verfasst werden können.