

**Die Bedeutung der Spinozerebellären Ataxie Typ 23 (SCA23) für Ataxie-Patienten
aus Deutschland: Screening auf Mutationen im *Prodynorphin*-Gen (*PDYN*)**

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

vorgelegt von Harenberg, Levke Gyde
aus Eckernförde

Gießen 2015

Aus dem Institut für Humangenetik
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Standort Gießen

Leiter: Prof. Dr. med. Ulrich Müller

Gutachter:

Apl. Prof. Dr. rer. nat. Dagmar Nolte

Gutachter:

Prof. Dr. med. Manfred Kaps

Tag der Disputation:

13. Oktober 2015

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Spinozerebelläre Ataxien	2
1.1.1. Genetik der spinozerebellären Ataxien	4
1.1.2. Klinik der spinozerebellären Ataxien	7
1.2. Spinozerebelläre Ataxie Typ 23 (SCA23)	9
1.2.1. Genetik der SCA23	10
1.2.2. Klinik und Pathologie der SCA23	13
1.2.3. Mögliche Pathomechanismen der SCA23	15
1.3. Aufgabenstellung	16
2. Materialien und Methoden	18
2.1. Materialien	18
2.1.1. Geräte	18
2.1.2. Chemikalien	19
2.1.3. Kits	20
2.1.4. Enzyme	20
2.1.5. Primer zur Amplifikation der <i>PDYN</i> -Exons	21
2.1.6. Verbrauchsmaterialien	21
2.1.7. Computerprogramme	22
2.1.8. Puffer und Lösungen	22
2.2. Methoden	23
2.2.1. DNA-Extraktion aus Blut	23
2.2.2. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	24
2.2.3. Gelelektrophorese	27
2.2.3.1. Analytisches Agarose-Gel	28
2.2.3.2. Präparatives Agarose-Gel	29
2.2.4. Herstellung des Größenstandards pUC/Dde I	31
2.2.5. Reinigen der PCR-Produkte	31
2.2.5.1. DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen	31
2.2.5.2. Reinigungskit	32
2.2.5.3. Exo-SAP	33
2.2.6. Didesoxy-Sequenzierung	34

Inhaltsverzeichnis

2.2.7. Reinigen der Sequenzier-Reaktionen für die Kapillarelektrophorese	36
2.2.8. Datenbanken zur Auswertung der Sequenziererergebnisse	37
2.2.8.1. Datenbank Ensembl genome browser	37
2.2.8.2. Datenbank Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP)	38
3. Ergebnisse	39
3.1. Patientenkollektiv	39
3.2. Sequenzanalyse des <i>Prodynorphin</i> -Gens	40
3.2.1. Exon 1 (nicht codierend)	41
3.2.2. Exon 2 (nicht codierend)	42
3.2.3. Exon 3	42
3.2.4. Exon 4	43
3.2.5. Krankheitsauslösende Mutationen	49
4. Diskussion	50
4.1. SCA23	50
4.2. Varianten im <i>Prodynorphin</i> -Gen	53
4.3. Pathogenese der SCA23	55
4.4. Molekulare Testung auf SCA23	57
4.4.1. Problematik der molekularen Testung	58
4.5. Ausblick	59
5. Zusammenfassung	60
6. Summary	61
7. Abkürzungsverzeichnis	62
8. Abbildungsverzeichnis	66
9. Tabellenverzeichnis	67
10. Literaturverzeichnis	68
11. Ehrenwörtliche Erklärung zur Dissertation	76
12. Danksagung	77

1. Einleitung

Der Begriff „Ataxie“ beschreibt eine Beeinträchtigung der Koordination und Bewegungsabläufe. Im Vordergrund stehen dabei eine progressive Gangunsicherheit sowie eine mangelnde Koordination der Extremitäten, der Sprache und der Augenbewegungen (Bird, 2012).

Die Ataxien werden in drei Gruppen unterteilt: hereditäre Ataxien, nicht-hereditäre / sporadische degenerative Ataxien und erworbene Ataxien (Klockgether et al., 2011). Um zwischen einer erworbenen und einer genetisch bedingten Ataxie zu unterscheiden, sind der Krankheitsverlauf sowie die Familienanamnese von großer Bedeutung. Ein progressiver Verlauf mit symmetrischem Befall spricht für eine genetisch bedingte Ataxie. Eine positive Familienanamnese erhärtet den Verdacht (Klockgether, 2008). Bei den hereditären Ataxien werden den autosomal dominant vererbten Ataxien (ADCAs) die autosomal rezessiven hereditären Ataxien gegenübergestellt. Die spinocerebellären Ataxien (SCAs) bilden die größte Gruppe der dominant vererbten Ataxien (Bird, 2012).

Zu den erworbenen Ataxien zählen Ataxien in Folge von Alkoholmissbrauch, Vergiftungen, Vitaminmangel oder chronischen ZNS-Infektionen sowie Ataxie als paraneoplastisches Syndrom oder im Rahmen autoimmunologischer Prozesse (Klockgether et al., 2011).

Außerhalb der spinocerebellären Ataxien gibt es weitere dominant vererbte Ataxien, deren häufigste Vertreter die dentatorubrale-pallidolysiale Atrophie (DRPLA) sowie die episodische Ataxie Typ 1 und 2 (EA1, EA2) sind. Bei Patienten mit einer entsprechenden Familienanamnese sollten auch diese Ataxieformen differentialdiagnostisch in Betracht gezogen werden (Paulson, 2009).

Die häufigsten Vertreter der rezessiv vererbten Ataxien sind die Friedreich Ataxie (FRDA) und die Ataxia teleangiectasia (AT). Die Ataxia teleangiectasia ist durch einen frühen Krankheitsbeginn und einen meist kurzen Krankheitsverlauf gekennzeichnet. Bei der Friedreich Ataxie handelt es sich um die häufigste Ataxie des Kindesalters. Der Krankheitsbeginn und der Krankheitsverlauf sind variabler, sodass zwischen der früh

einsetzenden und der selteneren spät einsetzenden Friedreich Ataxie unterschieden wird (Jayadev et al., 2013).

Außerdem gibt es X-chromosomal vererbte Ataxien und Ataxien im Rahmen von mitochondrialen Dysfunktionen (Bird, 2012).

Die spinozerebellären Ataxien gehören zu den neurodegenerativen Erkrankungen. Im Vordergrund stehen degenerative Veränderungen im Zerebellum, die unterschiedliche Strukturen betreffen können. So können beispielsweise die Purkinje-Zellen, die Granulosazellschicht oder die tiefen Kleinhirn-Kerne betroffen sein. Häufig sind zusätzlich extrazerebelläre Strukturen des zentralen Nervensystems und in einigen Fällen auch Strukturen des peripheren Nervensystems betroffen. Bei den meisten spinozerebellären Ataxien sind Affektionen des Hirnstamms zu finden (Paulson, 2009).

1.1.Spinozerebelläre Ataxien

Bei den spinozerebellären Ataxien (SCAs) handelt es sich um eine heterogene Gruppe von autosomal dominant vererbten Erkrankungen, denen eine progressive Degeneration des Zerebellums sowie seiner afferenten und efferenten Verbindungen zugrunde liegt. In den meisten Fällen handelt es sich um olivopontozerebelläre Atrophien (Taroni et al., 2004). Häufig sind zusätzlich weitere Strukturen des zentralen Nervensystems, wie die Basalganglien, Hirnstammkerne, Pyramidenbahn, Columna posterior und Vorderhorn des Rückenmarks, sowie periphere Nerven betroffen (Teive, 2009). Dabei liegen den einzelnen Subtypen typische Befallsmuster zugrunde (Taroni et al., 2004).

Spinozerebelläre Ataxien treten mit einer Häufigkeit von 2,7 pro 100000 Einwohner auf (Ruano et al., 2014). Bedingt durch den Gründereffekt sind die Prävalenzen der unterschiedlichen Subtypen regional sehr unterschiedlich (Manto 2005). Die weltweit häufigsten Subtypen sind SCA3, SCA2, SCA6 und SCA1 (Ruano et al., 2014).

Einleitung

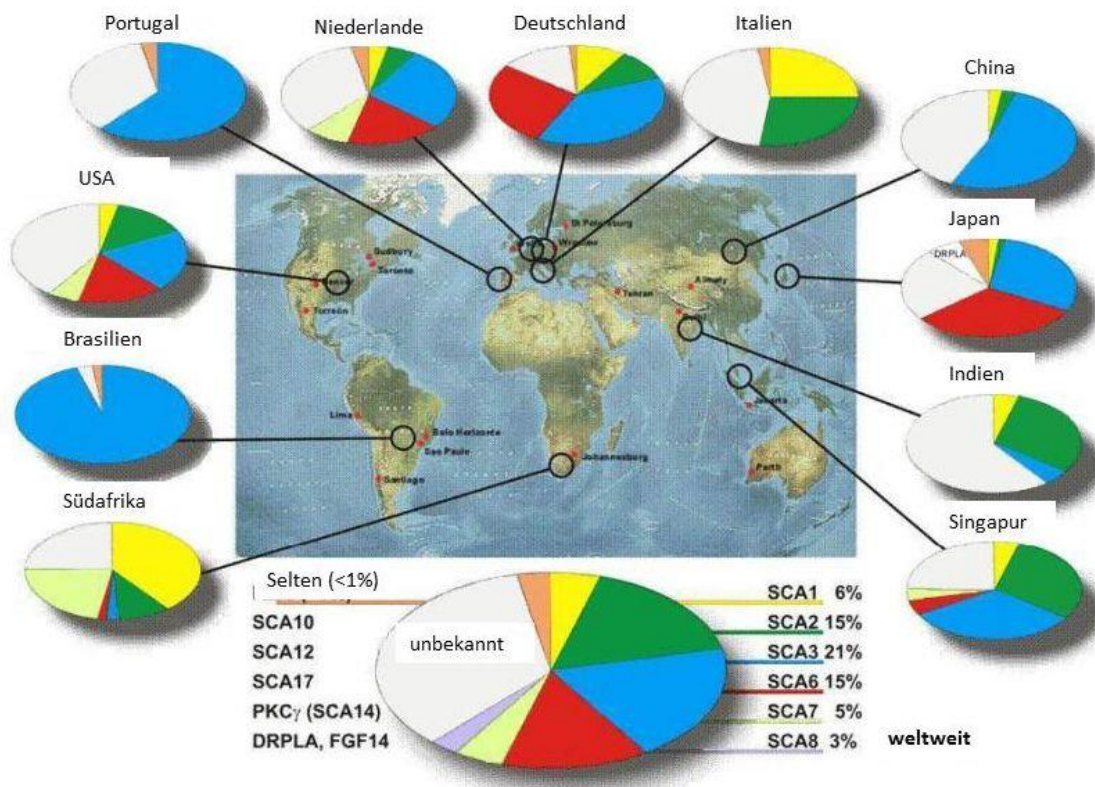


Abbildung 1.1: Verteilung der spinocerebellären Ataxien weltweit (modifiziert nach Bird, 2012)

Bis vor einigen Jahren wurden die spinocerebellären Ataxien klinisch anhand des Befallsmusters nach Harding in vier Typen unterteilt. Typ 1 umfasst eine klinisch heterogene Gruppe und ist charakterisiert durch zerebelläre Ataxie in Kombination mit Ophthalmoplegie, Optikusatrophie, Demenz, extrapyramidalen Zeichen und Muskelatrophie. Bei Typ 2 liegt zusätzlich zur Ataxie eine Degeneration der Retina vor, die von Ophthalmoplegie, Demenz oder extrapyramidalen Symptomen begleitet sein kann. Typ 3 beschreibt eine rein zerebelläre Ataxie mit spätem Krankheitsbeginn und Typ 4 beschreibt zusätzlich zur Ataxie das Vorkommen von Myoklonien und Taubheit (Harding, 1982). Da es sich aber um eine heterogene Gruppe von Erkrankungen handelt, bei denen die Symptome zwischen den Individuen sehr unterschiedlich sein können, wurde diese Klassifikation aufgegeben. Heute werden die spinocerebellären Ataxien nach ihrer genetischen Ursache klassifiziert (Paulson, 2009). Die Zahl der bekannten SCAs ist in den letzten Jahren ständig gestiegen. Zurzeit sind 37 genetisch unterschiedliche Formen bekannt, die in der Reihenfolge ihrer Entdeckung nummeriert sind (Seidel et al., 2012, Smeets et al., 2014).

1.1.1. Genetik der spinozerebellären Ataxien

Die spinozerebellären Ataxien können in drei genetische Kategorien eingeteilt werden:

- Repeat-Expansionen in codierenden oder nicht-codierenden Genabschnitten, z. B. CAG-Expansionen
- Ataxien bedingt durch Punktmutationen
- Ataxien bedingt durch Deletionen, Insertionen und Duplikationen

Der größte Teil der spinozerebellären Ataxien kommt durch CAG-Trinukleotidexpansionen zustande. Diese Ataxien werden auch als Polyglutamin-Ataxien bezeichnet. Zu diesen Ataxien zählen die SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7 und SCA17 (Nolte et al., 2006). Die Trinukleotidexpansionen variieren häufig in ihrer Größe und werden deshalb als dynamische Mutationen bezeichnet. Häufig vergrößern sich die Expansionen von einer Generation zur nächsten. Dabei führen größere Expansionen zu einer schwereren und früher einsetzenden Erkrankung, während kurze Expansionen eine spät einsetzende Erkrankung mit einem umschriebenen Symptommuster verursachen. Dieses Phänomen wird als Antizipation bezeichnet (Rüb et al., 2013).

Expansionen in den nicht-codierenden Genabschnitten führen zu Dysregulationen der Genexpression oder Problemen beim Spleißen (Dueñas, 2006). Außerdem wurde RNA-Toxizität und eine Aggregation der mutierten Proteine beobachtet (Verbeek et al., 2011). Zu dieser Gruppe zählen die SCA8, SCA10 und SCA12.

Punktmutationen oder Deletionen wurden erst deutlich später als die Trinukleotidexpansionen als Ursache für spinozerebelläre Ataxien entdeckt. Sie können zu einer Dysfunktion auf Proteinebene führen. Häufig kommt es zu Veränderungen in den Glutamat- und Calcium-Signalwegen (Verbeek et al., 2011). Sie sind deutlich seltener als die spinozerebellären Ataxien, denen ein Repeat-Expansionsmechanismus zugrunde liegt (Nolte et al., 2006).

Der Phänotyp von Patienten mit Expansionsataxien unterscheidet sich häufig von dem

Phänotyp von Patienten, deren Ataxie auf einer konventionellen Mutation beruht. Konventionelle Mutationen führen häufig zu einer langsam progredienten, rein zerebellären Ataxie. Sie verlaufen nur in seltenen Fällen fulminant. Polyglutamin-Expansionen verlaufen progressiv und unterscheiden sich oft intrafamiliär bezüglich des Krankheitsbeginns und der Krankheitsschwere. Meist ist das gesamte Nervensystem von den degenerativen Vorgängen betroffen (Durr, 2010).

Tabelle 1.1: SCA-Typen: Lokalisation, Gen und Mutationsmechanismus

SCA	Lokalisation	Gen	Mutationsmechanismus
SCA1	6p23	<i>ATXN1</i>	CAG-Expansion
SCA2	12q24.1	<i>ATXN2</i>	CAG-Expansion
SCA3	14q21	<i>ATXN3</i>	CAG-Expansion
SCA4	16q22.1	<i>SCA4</i>	unbekannt
SCA5	11q13	<i>SPTBN2</i>	Punktmutation, inframe Deletion
SCA6	19p13	<i>CACNA1A</i>	CAG-Expansion
SCA7	3p21.1-p12	<i>ATXN7</i>	CAG-Expansion
SCA8	13q21	<i>ATXN8/ATXN8OS</i>	CTG-Expansion, untranslatiert
SCA9	unbekannt	unbekannt	unbekannt
SCA10	22q13.31	<i>ATXN10</i>	ATTCT-Expansion, untranslatiert
SCA11	15q15.2	<i>TTBK2</i>	Punktmutation, Frameshift-Mutation
SCA12	5q32	<i>PPP2R2B</i>	CAG-Expansion, untranslatiert
SCA13	19q13.33	<i>KCNC3</i>	Punktmutation
SCA14	19q13.4	<i>PRKCG</i>	Punktmutation, inframe Deletion
SCA15	3p26.1	<i>ITPR1</i>	Punktmutation, Deletion
SCA16	3p26.1	<i>ITPR1</i>	Punktmutation, Deletion
SCA17	6q27	<i>TBP</i>	CAA/CAG-Expansion
SCA18	7q22-q32	unbekannt	unbekannt
SCA19	1p21-q21	<i>KCND3</i>	Deletion, Punktmutation
SCA20	11q12.2-11q12.3	unbekannt	260kB-Duplikation
SCA21	1p36.33-p36.32	<i>TMEM240</i>	Punktmutation
SCA22	1p21-q21	<i>KCND3</i>	Punktmutation, Deletion

Einleitung

SCA23	20p13	<i>PDYN</i>	Punktmutation, Deletion
SCA24	unbekannt	unbekannt	unbekannt
SCA25	2p21-p13	unbekannt	unbekannt
SCA26	19p13.3	<i>EEF2</i>	Punktmutation
SCA27	13q34	<i>FGF14</i>	Punktmutation, Frameshift-Mutation
SCA28	18p11	<i>AFG3L2</i>	Punktmutation
SCA29	3p26	unbekannt	unbekannt
SCA30	4q34.3-q35.1	unbekannt	unbekannt
SCA31	16q21	<i>BEAN1</i>	TGGAA-Expansion
SCA32	7q32-q33	unbekannt	unbekannt
SCA33	unbekannt	unbekannt	unbekannt
SCA34	6p12.3-q16.2	unbekannt	unbekannt
SCA35	20p13	<i>TGM6</i>	Punktmutation
SCA36	20p13	<i>NOP56</i>	GGCCTG-Expansion
SCA37	1p32	unbekannt	unbekannt
SCA38	6p	<i>ELOVL5</i>	Punktmutation

Tabelle modifiziert nach Bird, 2012, Matilla-Dueñas et al., 2013, Delplanque et al., 2014, Di Gregorio et al., 2014

Bevor mit der genetischen Testung begonnen wird, müssen potentiell behandelbare Ursachen für die Ataxie, wie beispielsweise Vitamin B 12-Mangel, ausgeschlossen werden (Shakkottai et al., 2013). Zurzeit gibt es konventionelle Tests für die häufigsten Formen der spinocerebellären Ataxien (SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA8, SCA10, SCA12, SCA17). Mit diesen Tests werden 50 % – 60 % der spinocerebellären Ataxien identifiziert. Außerdem gibt es Tests für einige seltenere Formen (SCA5, SCA11, SCA13, SCA14, SCA27, SCA28). Die molekulare Testung sollte in mehreren Schritten vorgenommen werden, wobei mit den häufigsten Ataxien (SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7) begonnen werden sollte (Bird, 2012). Bei der Anwendung der Gentests muss beachtet werden, dass ein positives Ergebnis die Erkrankung zwar bestätigt, ein negatives Ergebnis jedoch eine spinocerebelläre Ataxie als Krankheitsursache nicht ausschließen kann. Die spinocerebellären Ataxien sind zurzeit nicht heilbar. Ein Gentest kann aber eine definitive Diagnose liefern und bietet somit die

Möglichkeit den Patienten über seine Prognose und das genetische Risiko für Familienmitglieder aufzuklären (Paulson, 2009).

1.1.2. Klinik der spinozerebellären Ataxien

Bei den meisten Patienten beginnt die Erkrankung mit Gleichgewichtsstörungen und zerebellärer Ataxie. Typische Zeichen einer zerebellären Ataxie sind Dysmetrie, Intentionstremor, Reboundphänomene, ein breitbasiger Stand und Gangstörungen, insbesondere bei Richtungswechseln (Klockgether, 2008).

Die meisten Ataxieformen sind nicht auf das Zerebellum beschränkt. Sehr häufig finden sich Affektionen des Hirnstammes und des Rückenmarks. Auch Affektionen der Basalganglien, des Kortex oder peripherer Nerven sind möglich (Klockgether, 2008). Eine Affektion des Hirnstammes kann zum Verlust von Motoneuronen und somit zu Atrophie der Zunge, Schwäche der Gesichtsmuskeln oder Faszikulationen führen. Eine Affektion der Motoneuronen im Kortex führt zu Spastik und Hyperreflexie. Kommt es zu Degenerationen an den peripheren Nerven, kann es sowohl zu sensorischen als auch zu motorischen Ausfällen kommen. Bei einigen Formen der spinozerebellären Ataxien können die Basalganglien betroffen sein, was sich in generalisierter Dystonie und Bradykinesie äußert (Paulson, 2009).

Die spinozerebellären Ataxien eines genetischen Subtypes können sich sehr variabel manifestieren (Rossi et al., 2014). Außerdem gibt es viele Überlappungen zwischen den klinischen Phänotypen, sodass es nicht möglich ist, von der Klinik eines Patienten auf die Diagnose zu schließen (Manto, 2005). Eine Ausnahme bildet die SCA7, bei der die Ataxie von einem Visusverlust begleitet wird (Schöls et al., 2004).

Der Krankheitsbeginn kann innerhalb einer SCA-Form stark variieren. Dies gilt besonders für die Formen, denen eine Trinukleotidexpansion zugrunde liegt. Die Erkrankungen verlaufen progressiv, sodass die Patienten nach durchschnittlich 15 Jahren an den Rollstuhl gebunden sind. Im Durchschnitt versterben die Patienten 20 bis 25 Jahre nach Krankheitsbeginn (Klockgether, 2008).

Tabelle 1.2: Klinischer Phänotyp der spinozerebellären Ataxien

SCA	Klinischer Phänotyp
SCA1	Ataxie, Pyramidenbahnzeichen, Neuropathie, Dysphagie, Restless-Legs-Syndrom
SCA2	Ataxie, verlangsamte Sakkaden, Neuropathie, Restless-Legs-Syndrom
SCA3	Ataxie, Pyramidenbahnzeichen, Ophthalmoplegie, Neuropathie, Dystonie, Restless-Legs-Syndrom
SCA4	Ataxie, sensorische Neuropathie
SCA5	Rein zerebelläre Ataxie
SCA6	Rein zerebelläre Ataxie
SCA7	Ataxie, Ophthalmoplegie, Visusverlust
SCA8	Ataxie, sensorische Neuropathie, Spastik
SCA9	Ataxie, Ophthalmoplegie, Pyramidenbahnzeichen, extrapyramidale Symptome
SCA10	Ataxie, Epilepsie
SCA11	Rein zerebelläre Ataxie
SCA12	Ataxie, Tremor
SCA13	Ataxie, mentale Retardierung
SCA14	Ataxie, Myoklonie, Dystonie, Sensibilitätsverlust
SCA15	Rein zerebelläre Ataxie
SCA16	Rein zerebelläre Ataxie
SCA17	Ataxie, Dystonie, Chorea, Demenz, psychiatrische Auffälligkeiten
SCA18	Ataxie, sensorische Neuropathie, Muskelatrophie
SCA19	Ataxie, Myoklonie, kognitive Beeinträchtigungen
SCA20	Ataxie, Dysphonie
SCA21	Ataxie, Parkinsonismus
SCA22	Ataxie, Myoklonie, kognitive Beeinträchtigungen
SCA23	Ataxie, sensorische Neuropathie, Pyramidenbahnzeichen
SCA24	Ataxie, Pyramidenbahnzeichen, sensomotorische Polyneuropathie, sakkadische Intrusionen
SCA25	Ataxie, sensorische Neuropathie

SCA26	Rein zerebelläre Ataxie
SCA27	Ataxie, Tremor, mentale Retardierung
SCA28	Ataxie, Ophthalmoparese, Pyramidenbahnzeichen
SCA29	Ataxie, Dystonie, kognitive Defizite
SCA30	Rein zerebelläre Ataxie
SCA31	Rein zerebelläre Ataxie
SCA32	Ataxie, kognitive Defizite, Azoospermie
SCA34	Ataxie, subkutane Ablagerungen, Hyporeflexie
SCA35	Ataxie, okuläre Dysmetrie, Tremor, Hyperreflexie, Torticollis, verminderte Propriozeption
SCA36	Ataxie, Spastik, Faszikulationen, Muskelatrophie
SCA37	Ataxie, dysmetrische vertikale Sakkaden
SCA38	Rein zerebelläre Ataxie

Angaben zusammengefasst nach Klockgether et al., 2011, Seidel et al., 2012, Jakobi et al., 2013, Serrano-Munuera et al., 2013, Di Gregorio et al., 2014

Eine Therapie, die den Zelluntergang verhindert oder den Krankheitsverlauf verlangsamt, gibt es zurzeit nicht. Einige Symptome, wie zum Beispiel Parkinsonismus oder Tremor, können symptomatisch behandelt werden (Schöls et al., 2004). Viele Patienten profitieren von Physiotherapie und der Versorgung mit Hilfsmitteln (Jakobi et al., 2013).

1.2. Spinozerebelläre Ataxie Typ 23 (SCA23)

2004 konnte anhand einer Kopplungsanalyse der Genlocus der spinozerebellären Ataxie Typ 23 auf der Chromosomenregion 20p13-p12.3 identifiziert werden (Verbeek et al., 2004). Dieser Bereich ist 18,2 cM groß, was 6 Mb entspricht, und enthält 97 bekannte Gene (Verbeek, 2008). Als primäre Kandidatengene wurden Gene mit codierenden CTG- oder CAG-Repeat-Abschnitten untersucht. Anschließend wurden weitere Kandidatengene untersucht, die aufgrund ihrer Funktion oder neuronaler Expression ausgewählt wurden. Als auch in diesen Genen keine Mutation gefunden wurde, wurden anhand eines Protein-Protein-Interaktions-Netzwerkes zusätzliche Kandidatengene

ausfindig gemacht (Verbeek, 2008, Lim et al., 2006). 2010 wurden Punktmutationen im *Prodynorphin*-Gen (*PDYN*-Gen) als Ursache der SCA23 identifiziert (Bakalkin et al., 2010).

Das *PDYN*-Gen codiert für das Prodynorphin, welches ein Vorläuferprotein für die opioiden Neuropeptide α -Neoendorphin, Dynorphin A und Dynorphin B ist (Bakalkin et al., 2010). *PDYN* besteht aus vier Exons (1 – 4) und drei Introns (A, B, C). Es sind sieben unterschiedliche Spleiß-Varianten für *PDYN* bekannt (Nikoshkov et al., 2005).

Die SCA23 ist eine sehr seltene Ataxieform. In den Niederlanden wurden zwei SCA23-Familien und zwei sporadische Fälle von SCA23 entdeckt (Bakalkin et al., 2010). Im Rahmen großer SCA23-Screenings in China, den USA, Großbritannien, Frankreich und Nordafrika wurden nur ein Patient mit einer bereits beschriebenen SCA23-Mutation und fünf Patienten mit möglichen neuen *PDYN*-Mutationen gefunden (Liu et al., 2012, Fogel et al., 2012, Fawcett et al., 2012, Jezierska et al., 2013). In einem Screening von 314 deutschen Ataxiefamilien konnte bei keinem Patienten eine SCA23-verursachende Mutation nachgewiesen werden (Schicks et al., 2011). Diesen Untersuchungen zufolge kann davon ausgegangen werden, dass Mutationen im *PDYN*-Gen für etwa 0,1 % der Ataxiefälle verantwortlich sind (Fawcett et al. 2012, Jezierska et al., 2012).

1.2.1. Genetik der SCA23

Das *PDYN*-Gen besteht aus vier Exons. Exon 1 und 2 codieren für die 5'-untranslatierte Region, während Exon 3 und 4 für das Protein Prodynorphin codieren. Prodynorphin ist ein Vorläufermolekül für die opioiden Peptide α -Neoendorphin, Dynorphin A und Dynorphin B und kann unterschiedlich prozessiert werden. Das Prodynorphin wird zuerst in α -Neoendorphin und Big-Dynorphin gespalten. Das Big-Dynorphin wird wiederum in Dynorphin A 1 – 17 und Dynorphin B 1 - 13 gespalten. Aus dem Dynorphin A 1 – 17 kann das Dynorphin A 1 – 8 gebildet werden. Anstelle des Big-Dynorphin kann Dynorphin B 1 – 29 gebildet werden, was zu Dynorphin B 1 – 13 prozessiert werden kann (Schwarzer, 2009).

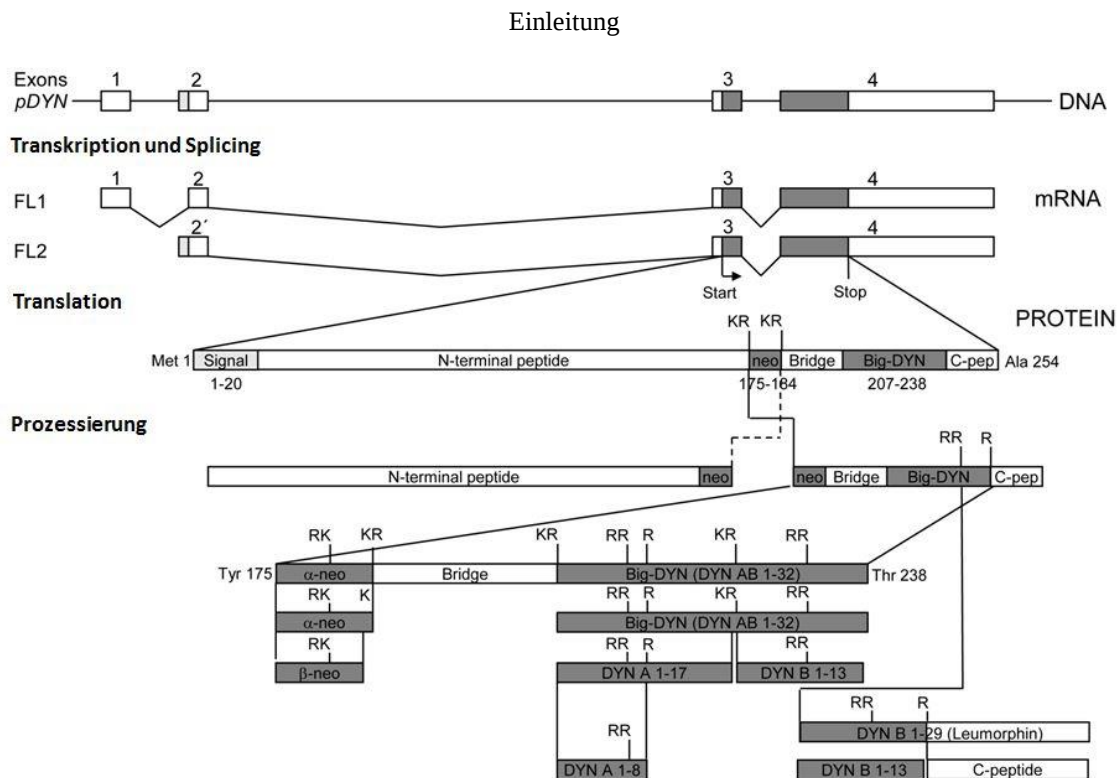


Abbildung 1.2: Transkription, Translation und Prozessierung von *PDYN* (modifiziert nach Schwarzer, 2009)

(FL1 und 2: Full length mRNA Variante 1 und 2; neo: Neoendorphin; DYN: Dynorphin)

Bakalkin et al. haben 2010 vier Missense-Mutationen in Exon 4 des *PDYN*-Gens entdeckt (Bakalkin et al., 2010). Mittlerweile wurden fünf weitere Varianten beschrieben, die möglicherweise auslösend für spinocerebelläre Ataxien sind (Fawcett et al., 2012, Jezierska et al., 2013).

c.65G>A (p.C22Y)

Anstelle eines Guanins findet sich ein Adenin in der cDNA-Sequenz an Position 65. Die Mutation liegt in Exon 3 des *PDYN*-Gens. Laut den Bioinformatik-Programmen PolyPhen2 (genetics.bwh.harvard.edu/pph2/) und SIFT (sift.jcvi.org) schädigt die Mutation die Proteinfunktion (Fawcett et al., 2012).

c.414G>T (p.R138S)

Diese Mutation liegt in der nicht-opioiden Domäne des *PDYN*-Gens und beeinflusst möglicherweise die Prozessierung. Durch eine G>T Transversion an cDNA-Position 414 wird auf Proteinebene Arginin durch Serin ersetzt. Diese Veränderung hat laut

Bioinformatik-Programmen keine Auswirkung auf die Proteinstruktur. Es entsteht aber eine potentielle Phosphorylierungsstelle (Bakalkin et al., 2010).

c.616C>T (p.R206C)

An cDNA-Position 616 findet sich bei dieser Mutation ein Thymin anstelle eines Cytosins. Dadurch wird die Aminosäure Arginin durch Cystein ersetzt. Auswirkungen auf die Prozessierung von PDYN in Opioid-Peptide konnten nicht nachgewiesen werden (Jezierska et al., 2013).

c.617G>A (p.R206H)

Bei dieser Missense-Mutation findet sich an cDNA-Position 617 ein Adenin anstelle eines Guanins, was auf Proteinebene zum Einbau der Aminosäure Histidin anstelle von Arginin führt. Diese Mutation führt zu erhöhten Dynorphin-A-, Dynorphin-B- und Leu-Enkephalin-Mengen (Jezierska et al., 2013).

c.632T>C (p.L211S)

Bei dieser Mutation liegt anstelle eines Thymins an cDNA-Position 632 ein Cytosin vor. Dadurch wird die Aminosäure Leucin durch Serin ersetzt. Dieser Austausch findet an Position 211 der Aminosäuresequenz des Prodynorphins statt und hat möglicherweise einen schädigenden Einfluss auf die Proteinstruktur und –funktion. Auch hier entsteht eine mögliche Phosphorylierungsstelle (Bakalkin et al. 2010).

c.634C>T (p.R212W)

Hier wird durch den Ersatz eines Cytosins durch Thymin an Position 634 in der codierenden Sequenz die Aminosäure Arginin durch Tryptophan ersetzt. Diese Veränderung an 6. Stelle des Dynorphin A kann ebenfalls die Proteinstruktur und Proteinfunktion schädigen (Bakalkin et al., 2010).

c.643C>T (p.R215C)

Bei dieser Mutation liegt an cDNA-Position 643 anstelle eines Cytosins ein Thymin vor. Auch diese Veränderung hat einen möglichen schädigenden Einfluss auf die Struktur und Funktion des Dynorphin A. An AS-Position 215 wird ein Arginin durch ein Cystein ersetzt (Bakalkin et al., 2010).

c.658-659delGT (p.W220GfsX33)

Bei dieser Mutation handelt es sich um eine Deletion der Basen Guanin und Tyrosin an cDNA-Position 658 und 659, was zu einem 33 Aminosäuren langen Frameshift mit anschließendem Stopp-Codon führt. Davon sind die letzten vier Aminosäuren des Dynorphin A betroffen und es kommt zu einem Verlust des Dynorphin B (Jezierska et al., 2013).

c.680G>A (p.G227D)

An cDNA-Position 680, in dem für Dynorphin B codierenden Abschnitt, liegt bei dieser Mutation ein Adenin anstelle eines Guanins vor. Dadurch wird an AS-Position 227 Asparaginsäure statt Glycin eingebaut. Es konnten erhöhte Mengen für die Prozessierung von Dynorphin A, Dynorphin B und Leu-Enkephalin nachgewiesen werden (Jezierska et al., 2013).

1.2.2. Klinik und Pathologie der SCA23

Klinisch präsentiert sich die SCA23 als spät einsetzende, langsam progrediente, rein zerebelläre Ataxie. Im Vordergrund steht die Gangataxie. Außerdem weisen die Patienten eine Ataxie der Gliedmaßen, Dysarthrie, verlangsamte Sakkaden, okuläre Dysmetrie und einen verminderten Vibrations- und Positionssinn auf (Verbeek et al., 2004). Einige Patienten zeigen eine Polyneuropathie, Pyramidenbahnzeichen, Tremor und Parkinsonismus (Bakalkin et al., 2010). Bei einem Patienten wurden epileptische Anfälle beschrieben (Fawcett et al., 2012).

Tabelle 1.3: Klinik der unterschiedlichen Mutationen der SCA23

Mutation	Krankheitsbeginn (Jahre)	Gang-ataxie	Dysarthrie	Störungen der Okulomotorik	Sonstige Symptome
p.C33Y	22	+	+	+	Epileptische Anfälle, Hyperreflexie
p.R138S	50	+	+/-	+/-	Sensorische Neuropathie, Hyperreflexie, Babinski-Zeichen bei einigen Patienten positiv
p.R206C	50	+	+	+	Tremor, Hyperreflexie
p.R206H	15	+	+	+	Kognitive Einschränkung, psychiatrische Symptome, Gedächtnisstörungen, Taubheit, Hyperreflexie
p.L211S	73	+	+/-	+	Parkinsonismus, Polyneuropathie, Pyramidenbahnzeichen
p.R212W	54	+	+	-	Kopf- und Extremitätentremor
p.R215C	48	+/-	+	+/-	Posturaler Tremor, Tremor von Kopf und Armen, als Kind motorisch ungeschickt
p.W220GfsX33	45	+	+	-	Tremor des Kopfes, Hyperreflexie, Katarakt
p.G227D	54	+	-	-	Hyperreflexie

+ = vorhanden, +/- = nicht bei allen Individuen vorhanden, - = nicht vorhanden

Angaben zusammengefasst nach Fawcett et al., 2012, Verbeek et al., 2004, Bakalkin et al., 2010 und Jezierska et al., 2013

In der neuropathologischen Untersuchung war das Gewicht des Gehirns vermindert und makroskopisch fand sich eine das Großhirn, Kleinhirn, den Hirnstamm und das Rückenmark umfassende Atrophie. Besonders stark ausgeprägt war die Atrophie in der frontotemporalen Region, im Vermis, an der Basis pontis sowie im Rückenmark (Verbeek et al., 2004).

Mikroskopisch konnten ein Verlust der Purkinje-Zellschicht sowie eine Gliose und ein Verlust an Myelin in der umgebenden weißen Substanz nachgewiesen werden. In einigen Neuronen der Substantia nigra wurden intranukleäre Einschlüsse entdeckt, die als Marinesco-Körperchen identifiziert wurden (Verbeek et al., 2004).

1.2.3. Mögliche Pathomechanismen der SCA23

Das Prodynorphin ist vor allem in Hippocampus, Amygdala, Hypothalamus, Striatum und Rückenmark lokalisiert (Schwarzer, 2009). Im Zerebellum kommt es nur in sehr geringen Konzentrationen vor, wobei das Prodynorphin und die Dynorphine A und B hauptsächlich in den Purkinje-Zellen lokalisiert sind (Bakalkin et al., 2010). Die Dynorphine sind in die Regulation von Lernprozessen, Gedächtnisbildung, Emotionen, Stress und Schmerz involviert (Schwarzer, 2009). Außerdem spielen sie eine Rolle bei Epilepsie (Loacker et al., 2007), Alkoholismus (Taqi et al., 2011), Heroin- und Kokainabhängigkeit (Clarke et al., 2012) und Depression (Knoll et al., 2010).

Die Mutationen p.R206C, p.R206H, p.L211S, p.R212W, p.R215C und p.W220GfsX33 liegen in dem codierenden Bereich für Dynorphin A (AS 1 – 17) (Watanabe et al., 2012, Jezierska et al., 2013).

Bei den Mutationen p.L211S, p.R212W und p.G227D konnten im Tiermodell deutlich erhöhte Dynorphin A-Spiegel nachgewiesen werden (Bakalkin et al., 2010). Bei den Mutationen p.R206H und p.G227D konnte im Zellversuch eine vermehrte Prozessierung des Prodynorphins in Dynorphin A, Dynorphin B und Leu-Enkephalin dargestellt werden. Es ist bekannt, dass Dynorphin A zytotoxisch auf Neurone wirkt (Hauser et al., 1999). Dieser Effekt wird durch non-opioide Mechanismen

hervorgerufen. Vermutet wird eine Wirkung über Glutamatrezeptoren (Hauser et al., 2005) oder durch eine Aktivitätserhöhung von säuresensitiven Ionenkanälen (Sherwood et al., 2009).

Für die Mutationen p.R212W und p.R215C konnte in Untersuchungen an Neuronenkulturen ein deutlich höherer toxischer Effekt als durch Wildtyp-Dynorphin A belegt werden. Außerdem wurden Veränderungen in der Expression von Proteinen gefunden, die an der Neuroprotektion, Apoptose und Signaltransduktion beteiligt sind (Bakalkin et al., 2010).

Für nozizeptive non-opioide Wirkungen konnte eine stärkere Potenz von mutiertem Dynorphin A im Vergleich zu Wildtyp-Dynorphin A festgestellt werden. Dabei ist die nozizeptive Wirkung bei Vorliegen der Mutation p.R212W am stärksten (Watanabe et al., 2012).

Von Dynorphinen ist bekannt, dass sie zu Porenbildung in der Plasmamembran (Hugonin et al., 2006) und vermehrtem Calcium-Einfluss (Hugonin et al., 2008) führen können. Für die Mutationen p.R212W und p.R215C konnte ein solcher Effekt belegt werden. Dabei korreliert die Stärke der Porenbildung mit dem Ausmaß der Neurotoxizität (Madani et al., 2011).

Als Ursache für den Verlust der Purkinje-Zellen werden zwei mögliche Ursachen diskutiert. Zum einen eine Dysfunktion des Glutamatsystems durch Veränderungen der Genexpression und zum anderen eine direkte toxische Wirkung durch akkumulierende Prodynorphine (Bakalkin et al., 2010), die möglicherweise zu Porenbildung in der Zellmembran führt (Madani et al., 2011).

1.3. Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit wurde die DNA von 40 Patienten mit einer autosomal dominant vererbten, spät einsetzenden spinozerebellären Ataxie auf das Vorliegen einer Mutation im *PDYN*-Gen untersucht. Im Unterschied zu anderen Studien zur SCA23

Einleitung

wurde ein Teil der Patienten auch auf Mutationen in den nicht codierenden Exons 1 und 2 untersucht. Die Patienten wurden zuvor auf die spinocerebellären Ataxien Typ 1, 2, 3, 6, 7, 13, 14, 17 und 28 negativ getestet. Ziel der Arbeit ist es, eine Aussage über die Häufigkeit der SCA23 in einer derart vorausgewählten Kohorte zu treffen.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Geräte

Tabelle 2.1: Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Analysenwaage	Lab Style 5001	Mettler-Toledo, Ohio, USA
Elektrophorese-Kämme		Keutz, Reiskirchen
Elektrophorese-Kammer	Horizon 58	Life Technologies, Carlsbad, USA
Gelschlitten		Keutz, Reiskirchen
Heizblock	DRI-Block DB 3	Keutz, Reiskirchen
Pipetten	10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl	HTL, Warschau, Polen Gilson, Middleton, USA
Spannungsquelle		Biometra, Göttingen
Thermocycler	PTC 200	MJ Research, St. Bruno, Kanada
Tischzentrifuge	Biofuge pico	Heraeus, Hanau
UV-Illuminator	Macro Vue UV-25	Hoefer, Holliston, USA
Vortex	Reax 2000	Heidolph, Schwabach
Wasserbad		GFL, Burgwedel
Zentrifuge	Multifuge 3 L – R	Heraeus, Hanau

2.1.2. Chemikalien**Tabelle 2.2: Chemikalien**

Chemikalie	Hersteller
Betain 5 M	Sigma – Aldrich, St. Louis, USA
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Puffer H für Restriktionsenzyme	Roche, Risch, Schweiz
EDTA	Sigma – Aldrich, St. Louis, USA
Ethidiumbromid 250 µl/ml	Roth, Karlsruhe
Formamid	Applied Biosystems, Warrington, UK
Gelagarose	Inno-Train, Kronberg
Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 100 mM	Promega Madison, USA
PCR Buffer 10 x	Qiagen, Hilden
Sephadex G – 50 Superfine	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Sucrose	Sigma – Aldrich, St. Louis, USA
Tris-HCl	Sigma – Aldrich, St. Louis, USA
Trisma-Base	Sigma – Aldrich, St. Louis, USA
Xylencyanol	Serva, Heidelberg

2.1.3. Kits

Tabelle 2.3: Kits

Kit	Hersteller
Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Austin, USA
Qiagen DNA Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Plasmid Kit	Qiagen, Hilden
straightPCR OLS Kit	OMNI Life Science, East Taunton, USA

2.1.4. Enzyme

Tabelle 2.4: Enzyme

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

2.1.5. Primer zur Amplifikation der *PDYN*-Exons**Tabelle 2.5: Primer zur Amplifikation der *PDYN*-Exons**

Primer	Hersteller
Ex 1F 5'-CGTCTGTGCTCTGACTGCTC-3'	Sigma – Aldrich, St. Louis, USA
Ex 1R 5'-GCCTCCTAACTGTAACACCT-3'	Sigma – Aldrich, St. Louis, USA
Ex 2F 5'-CCCAGTCGAGATCCATTG-3'	Sigma – Aldrich, St. Louis, USA
Ex 2R 5'-TCCCAGCTGCCAACAGAG-3'	Sigma – Aldrich, St. Louis, USA
Ex 3F 5'-GCTGTGGGCAGGAGTTAGAG-3'	Sigma – Aldrich, St. Louis, USA
Ex 3R 5'-GCCATCTATAGGGCAGGACA-3'	Sigma – Aldrich, St. Louis, USA
Ex 4F 5'-CAGGGCTTAGCAGTGGC-3'	Sigma – Aldrich, St. Louis, USA
Ex 4R 5'-GAGAGATAGGCTGGGCTTG-3'	Sigma – Aldrich, St. Louis, USA

2.1.6. Verbrauchsmaterialien**Tabelle 2.6: Verbrauchsmaterialien**

Materialien	Hersteller
Auffangröhrchen	Qiagen, Hilden
Eppendorf-Gefäße Safe Lock Tubes	Eppendorf, Hamburg
Mikrotiterplatten und Deckel	Eppendorf, Hamburg
Multiwell-Streifen	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen ep TIPS	Eppendorf, Hamburg
Säulenfilter	Qiagen, Hilden

2.1.7. Computerprogramme

Tabelle 2.7: Computerprogramme

Programm	Hersteller
SeqScape Version 2.5	Applied Biosystems, Foster City, USA

2.1.8. Puffer und Lösungen

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

270 g Trisma-Base
137,5 g Borsäure
100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
H₂O ad 2500 ml
pH auf 8,2 – 8,4 einstellen

1x TBE (Tris-Borat-EDTA-Puffer)

200 ml 10xTBE
1800 ml H₂O

10x Probenpuffer

40 g Sucrose
10 ml 10xTBE
0,25 g Bromphenolblau
0,25 g Xylene Cyanol
TBE ad 100 ml

Nukleotidmix

380 µl 10 mM Tris-HCl

5 µl dATP (100 mM)

5 µl dCTP (100 mM)

5 µl dGTP (100 mM)

5 µl dTTP (100 mM)

2.2. Methoden

2.2.1. DNA-Extraktion aus Blut

Um DNA für eine Amplifikation und die anschließende Sequenzierung nutzen zu können, musste sie aus EDTA-Blut extrahiert werden. Dazu wurde das Qiagen DNA Blood Mini Kit entsprechend den Vorgaben des Herstellers eingesetzt:

In ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß wurden 20 µl Proteinase K gegeben. 200 µl der Blutprobe und 200 µl Lysepuffer AL wurden hinzugegeben. Der Ansatz wurde 10 Sekunden lang auf dem Vortex gemischt. Anschließend wurde das Eppendorf-Gefäß im Wasserbad 10 Minuten lang bei 52 °C inkubiert.

Nach der Inkubation wurden 200 µl Ethanol absolut zugegeben. Das Gemisch wurde wieder 10 Sekunden auf dem Vortex gemischt und dann auf einen Säulenfilter gegeben. Der beladene Säulenfilter wurde eine Minute lang bei 8000 rpm zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation war die DNA an die Fritte des Säulenfilters gebunden. Das Eluat wurde gemeinsam mit dem Auffangröhrchen verworfen. Der Säulenfilter wurde auf ein neues Auffangröhrchen gesteckt. Es wurden 500 µl Puffer AW 1 (Waschpuffer 1) zugegeben. Durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette wurden die Blutbestandteile, die sich am Rand der Fritte befanden, gelöst. Danach wurde eine Minute lang bei 8000 rpm zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurde das Auffangröhrchen samt Eluat verworfen. In dem

Eluat befanden sich das Hämoglobin und weitere Zellbestandteile. Da das Hämoglobin die Amplifikation der DNA stören würde, musste es aus dem Ansatz entfernt werden. Der Säulenfilter wurde auf ein neues Auffangröhrchen gesteckt und es wurden 500 µl Puffer AW 2 (Waschpuffer 2) hinzu pipettiert. Anschließend wurde drei Minuten lang bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Flüssigkeit, die sich noch am Rand des Säulenfilters befand, wurde mit einer Pipette entfernt. Das Eluat wurde abgegossen und es wurde noch einmal eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert, um auch die letzten Flüssigkeitsreste aus dem Ansatz zu entfernen.

Danach wurde die Säule auf ein beschriftetes 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gesetzt und es wurden 200 µl Puffer AE (Elutionspuffer) hinzugefügt. Es wurde eine Minute lang bei 13000 rpm zentrifugiert, um die DNA aus der Fritte zu lösen. Nach der Zentrifugation befand sich die DNA im Eluat. Die Filtersäule konnte verworfen werden.

Die extrahierte DNA lag danach in einer Konzentration von ca. 25 - 30 µg/ml vor und wurde bei 4 °C gelagert.

2.2.2. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR dient der Amplifizierung spezifischer DNA-Sequenzen zwischen zwei flankierenden Primern in vitro (Löffler et al., 2006).

Für eine PCR werden zunächst Primer, Oligonukleotide definierter Sequenzen, benötigt. Die Sequenzen der Primer sind komplementär zu Sequenzabschnitten aus den flankierenden Bereichen der Exons, sodass sich die Primer in gegenläufiger Richtung an die DNA anlagern. Die verwendeten Primer dürfen nicht zu kurz sein, um eine unspezifische Hybridisierung zu vermeiden. Zudem darf der C-G-Gehalt nicht zu niedrig sein, damit sie bei der Polymerisation nicht dissoziieren. Binden die Primer nun an ihre Zielsequenzen, kann der dazwischenliegende Sequenzbereich amplifiziert werden (Saiki, 1988).

Für die Synthese des Sequenzabschnittes zwischen den Primern wird eine Polymerase

benötigt. Durch die Verwendung der thermostabilen Taq-Polymerase (Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus*) kann die PCR automatisiert ablaufen (Chien et al., 1976). Das Temperatur-Optimum der Taq-Polymerase liegt bei 72 °C. Sie übersteht die Erhitzungen auf 94 °C, die benötigt werden, um die DNA in ihre Einzelstränge aufzuspalten, und es können 30 bis 35 Zyklen hintereinander ablaufen (Pingoud et al., 2002).

Außerdem werden Desoxynukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) in den Ansatz gegeben, die von der Taq-Polymerase in die neu synthetisierten DNA-Stränge eingebaut werden.

Die PCR besteht aus drei Schritten:

- | | |
|-----------------|---|
| Denaturierung: | Durch Erhitzen auf 94 °C wird die DNA in ihre Einzelstränge aufgetrennt. |
| Annealing: | Die Primer lagern sich an den komplementären Bereich des Einzelstranges an. Die Annealing-Temperatur wird für die jeweiligen Primer optimiert und liegt meist zwischen 55 und 60 °C |
| Polymerisation: | Die DNA-Synthese erfolgt bei 72 °C. |

Diese Schritte wiederholen sich in mehreren Zyklen, wobei der DNA-Gehalt in jedem Zyklus verdoppelt wird. So kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung der Zielsequenz (Saiki et al., 1988).

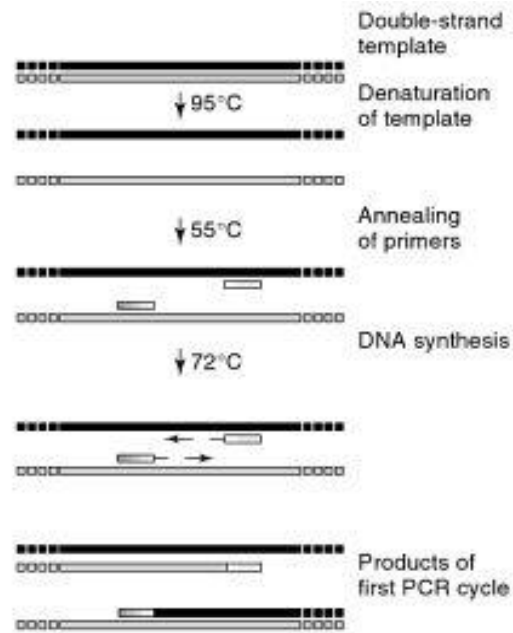


Abbildung 2.1: Ablauf einer PCR (Mc Pherson et al., 2006)

Tabelle 2.8: PCR-Amplifizierung der PDYN-Exons

Exon	Größe PCR-Produkt	Größe des Exons	PCR-Bedingungen			Besonderheit
Exon 1	417 bp	147 bp	initiale Denaturierung	94 °C	3'	
			Denaturierung	94 °C	30''	
			Annealing	60 °C	30''	
			Polymerisation	72 °C	45''	
			letzte Polymerisation	72 °C	2'	
Exon 2	347 bp	60 bp	initiale Denaturierung	94 °C	3'	
			Denaturierung	94 °C	30''	
			Annealing	58 °C	30''	
			Polymerisation	72 °C	45''	
			letzte Polymerisation	72 °C	2'	
Exon 3	397 bp	148 bp	initiale Denaturierung	94 °C	3'	Betain 1 M
			Denaturierung	94 °C	30''	
			Annealing	60 °C	30''	
			Polymerisation	72 °C	45''	
			letzte Polymerisation	72 °C	2'	
Exon 4	898 bp	636 bp	initiale Denaturierung	94 °C	3'	Betain 1 M, Reinigung des PCR- Produktes mit Exo-SAP
			Denaturierung	94 °C	30''	
			Annealing	58,5 °C	30''	
			Polymerisation	72 °C	45''	
			letzte Polymerisation	72 °C	2'	

Für die PCR-Amplifizierung der *PDYN*-Exons wurde folgender Mastermix verwendet:

Tabelle 2.9: Pipettierschema für den Mastermix für 4 Proben

Reagenz	Menge [µl]
10 x Puffer	20
Nukleotid-Mix 100 mM	40
(Betain 5 M)	(20)
forward Primer 5 pmol/µl	3
reverse-Primer 5 pmol/µl	3
Taq-Polymerase 5 u/l	1,8
H ₂ O	ad 200

In ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß wurde jeweils 1 µl der zu amplifizierenden DNA und 50 µl Mastermix gegeben. Danach wurden die Eppendorf-Gefäße in den Thermocycler gestellt und es wurden 35 Zyklen unter den oben genannten Bedingungen (s. Tabelle 8) durchgeführt.

Die PCR-Produkte wurden anschließend mittels eines analytischen Agarose-Gels auf ihren DNA-Gehalt und mögliche Störbanden untersucht (s. 2.2.3.1.). Danach wurden die PCR-Produkte entweder direkt gereinigt (s. 2.2.4.) oder bis zur Reinigung bei - 20 °C aufbewahrt.

2.2.3. Gelelektrophorese

Mittels Gelelektrophorese wurden die PCR-Produkte auf Reinheit, Molekülgröße und DNA-Gehalt geprüft.

Agarose ist ein Polysaccharid aus roten Meeresalgen, das ein dreidimensionales Netzwerk mit von der Agarosekonzentration abhängigen unterschiedlich großen Poren bildet. Die DNA kann in das Gel eingebracht werden. Wird nun eine elektrische Spannung angelegt, wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren durch das Gel zur

Anode. Durch die Poren des Gels wird die Wanderung für die größeren Nukleinsäuren erschwert, sodass sich die unterschiedlich großen Nukleinsäuren nach ihrer Größe auftrennen (Knoop et al., 2006). In Abhängigkeit von der Konzentration der Agarose kann deren Vernetzungsgrad und damit die Größe der Poren in dem Gel variiert werden. In einem 1 %iges Agarose-Gel beträgt die durchschnittliche Porengröße 150 nm und eignet sich zur Auftrennung von Nukleinsäuren von bis zu 7 kb Größe.

Um die Nukleinsäuren sichtbar zu machen, wird Ethidiumbromid verwendet. Das Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basenpaare und ist unter UV-Licht stark fluoreszierend (Pingoud et al., 2002). Mit einem UV-Illuminator kann die DNA in dem Gel sichtbar gemacht werden.

2.2.3.1. Analytisches Agarose-Gel

Die analytischen Agarose-Gele dienen der Erfolgskontrolle der PCR. Mithilfe dieses Verfahrens konnte die Menge an enthaltener DNA sowie freier Primer und Nukleotide abgeschätzt werden. Außerdem wurden so mögliche Störbanden detektiert.

Für ein 1 %iges analytisches Agarose-Gel wurden 1,0 g Agarose abgewogen und in einen 250 ml Erlenmeyer-Kolben gefüllt. Dieser wurde mit 1 x TBE-Puffer auf 100 ml aufgefüllt und in der Mikrowelle erhitzt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte und die Flüssigkeit klar war. Nach kurzem Abkühlen wurden 15 µl Ethidiumbromid-Lösung zugegeben und der Ansatz wurde gemischt. Die Flüssigkeit wurde anschließend in den zuvor mit Klebeband abgeklebten Gelschlitten gegossen. Ein Kamm mit kleinen Taschen wurde eingesetzt und das Gel wurde auf Luftblasen überprüft, die gegebenenfalls beseitigt wurden. Nach circa 30 Minuten war das Gel gebrauchsfertig. Anschließend wurden der Kamm und die Klebebänder entfernt und das Gel wurde in die Elektrophorese-Kammer gelegt und vollständig mit 1 x TBE-Puffer bedeckt.

Von jedem 50 µl PCR-Ansatz wurden 3 µl des PCR-Produktes auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Um das Volumen besser handhaben zu können, wurden zu den 3 µl PCR-Produkt 7 µl H₂O gegeben. Außerdem wurden 1,5 µl 10x Probenpuffer zugegeben.

Dieser sorgt zum einen durch das Gewicht der enthaltenen Sucrose dafür, dass die Probe in die Geltasche sinkt und so in die Gelmatrix gelangt. Zum anderen färbt das enthaltene Bromphenolblau die Probe an, sodass kontrolliert werden kann, wie weit sich die Probe in dem Gel aufgetrennt hat. Durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette wurde der Ansatz gemischt.

Danach wurden die Proben in die Geltaschen pipettiert. Um die Länge der PCR-Produkte bestimmen zu können, wurden 5 µl des Größenstandards pUC /Dde I (s. 2.2.4.) aufgetragen.

Das Gel wurde nun bei 30-40 mA etwa 30 Minuten laufen gelassen, bis sich die Proben gut aufgetrennt hatten. Dann wurden die DNA-Fragmente auf einem UV-Illuminator sichtbar gemacht und analysiert. Zur Dokumentation wurde das Gel für das Laborbuch fotografiert.

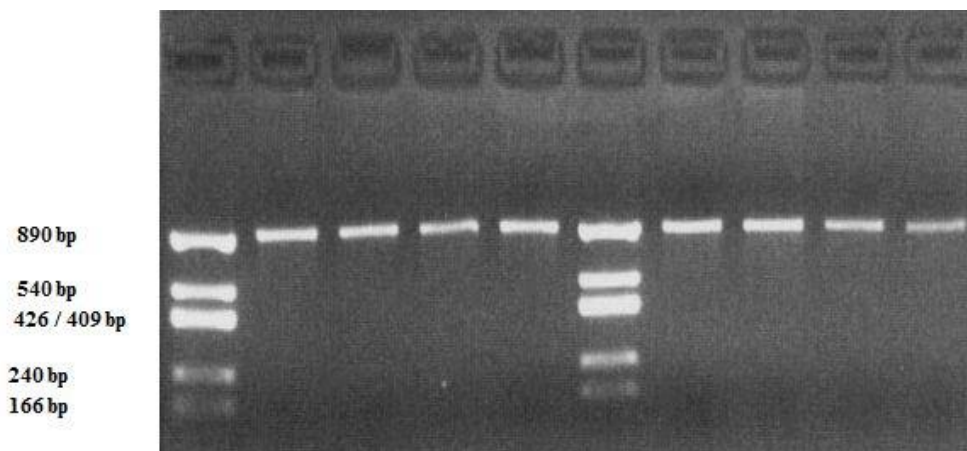


Abbildung 2.2: Analytisches Gel (Spuren 1, 6: Größenstandard pUC/DdeI, Spuren 2 – 5 und 7 – 10: Proben der PCR-Produkte von Exon 4)

2.2.3.2. Präparatives Agarose-Gel

Die Gellösung des 1 %igen präparativen Gels unterschied sich nicht von der Gellösung des analytischen Gels. Auch hier wurden nach kurzem Abkühlen 15 µl Ethidiumbromid zugefügt. Das Gel wurde in den abgeklebten Schlitten gegossen. Es wurde jedoch ein

Kamm mit großen Taschen eingesetzt. Das Gel wurde auf Luftblasen überprüft und es wurde gewartet, bis das Gel ausgehärtet war. Dann wurden der Kamm und die Klebebänder entfernt. Das Gel wurde in die Elektrophorese-Kammer gelegt und mit 1 x TBE-Puffer bedeckt.

Für das präparative Gel wurden die PCR-Produkte mit jeweils 1/10 Volumenteil 10 x Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden in die großen Taschen aufgetragen. In die kleine Tasche wurde 5 µl des Größenstandards pUC/Dde I pipettiert.

Nachdem sich die Proben bei 30 - 40 mA aufgetrennt hatten, wurden sie auf dem UV-Illuminator analysiert und fotografiert. Anschließend wurden die gesuchten Gelbanden aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und die DNA wurde extrahiert (s. 2.2.5.1.). Da die freien Nukleotide und Primer schneller durch das Gel gelaufen sind als die amplifizierten DNA-Sequenzen, befanden sie sich nicht in den ausgeschnittenen Gelbanden. Die DNA musste also nur von den Bestandteilen des Gels und von dem interkalierten Ethidiumbromid gereinigt werden.

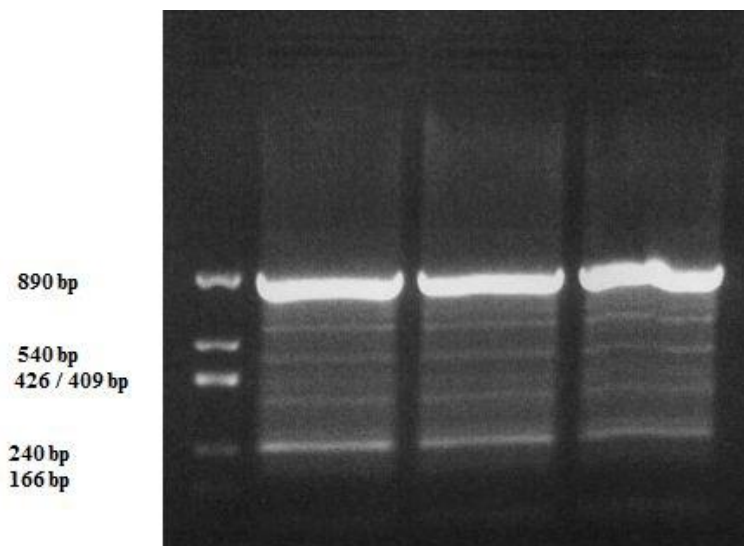


Abbildung 2.3: präparatives Gel (Spur 1: Größenstandard pUC/DdeI, Spuren 2 – 4 PCR-Produkte von Exon 4)

2.2.4. Herstellung des Größenstandards pUC/Dde I

Die pUC-DNA wurde mit dem Qiagen Plasmid Kit präpariert. Dazu wurde entsprechend der Angaben des Herstellers vorgegangen. Anschließend wurde die DNA mit Dde I verdaut:

10 µl der pUC-DNA wurden in ein Reaktionsgefäß gegeben. Danach wurden 10 µl Puffer H und 4 - 5 µl des Enzyms Dde I hinzugefügt. Der Ansatz wurde über drei Stunden im Hybridisierungssofen bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Volumen mit H₂O auf 100 µl aufgefüllt.

So sind 6 DNA-Fragmente entstanden, die 166 bp, 240 bp, 409 bp, 426 bp, 540 bp und 890 bp groß sind. Die 409 bp- und 426 bp-Fragmente wurden unter den in dieser Arbeit verwendeten Elektrophoresebedingungen nicht komplett aufgetrennt, sodass eine gemeinsame Bande zu sehen war.

2.2.5. Reinigen der PCR-Produkte

Um die PCR-Produkte sequenzieren zu können, müssen sie von freien Primern und freien Nukleotiden gereinigt werden, weil diese sonst die Sequenzierungs-Reaktion stören würden. Dazu wurden drei unterschiedliche Methoden verwendet.

2.2.5.1. DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen

Wenn das PCR-Produkt in einem präparativen Agarose-Gel aufgetrennt wurde, musste die DNA anschließend wieder aus dem Gel extrahiert werden. Dazu wurde das „QIAquick Gel Extraction Kit“ benutzt.

Die gesuchte Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten. Anschließend wurde das Gelstück gewogen und das dreifache Volumen des Gelstückes von Puffer QG hinzugegeben. Dann wurde 10 Minuten lang bei 50 °C inkubiert, bis sich die Gelstücke

komplett aufgelöst hatten.

Das zuvor gemessene einfache Gelvolumen wurde an Isopropanol hinzugegeben und auf dem Vortex gemischt. Der Ansatz wurde auf einen Säulenfilter pipettiert, der sich in einem 2 ml Auffangröhrchen befand. Es wurde eine Minute lang bei 13000 rpm zentrifugiert.

Das Eluat wurde mit dem Auffangröhrchen verworfen und der Säulenfilter wurde auf ein neues Auffangröhrchen gestellt. Es wurden 0,75 ml Puffer PE (Waschpuffer) zugegeben und es wurde eine Minute lang bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und anschließend wurde nochmals bei 13000 rpm eine Minute lang zentrifugiert.

Nach diesem Schritt wurde das Auffangröhrchen mit dem Eluat verworfen und die Filtersäule wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Es wurden 50 µl Puffer EB (Elutionspuffer) hinzugegeben, um die DNA zu eluieren. Der Ansatz wurde eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Anschließend befand sich die gereinigte DNA in dem Eppendorf-Gefäß.

Die DNA-Fragmente wurden bei - 20 °C gelagert.

2.2.5.2. Reinigungskit

Um die PCR-Produkte im Anschluss an die PCR aufzureinigen, wurde das „straightPCR-OLS-Kit“ von OMNI Life Science entsprechend den Vorgaben des Herstellers verwendet.

Die Filtersäule wurde in ein Auffangröhrchen gesteckt. Auf die Filtersäule wurden 500 µl Puffer BB (Bindepuffer) gegeben. Das PCR-Produkt wurde hinzu pipettiert und durch mehrmaliges Aufziehen der Pipette mit dem Puffer gemischt. Der Ansatz wurde zwei Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert. Die DNA wurde so an die Fritte gebunden. Anschließend wurde das Eluat gemeinsam mit dem Auffangröhrchen verworfen und der

Säulenfilter wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt.

Es wurden 50 µl Puffer EB (Elutionspuffer) auf die Filtermitte gegeben, um die DNA wieder von der Fritte zu lösen. Der Ansatz wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend eine Minute lang bei 6000 rpm zentrifugiert. Danach befand sich das gereinigte PCR-Produkt im Eppendorf-Gefäß und der Säulenfilter konnte verworfen werden.

Die gereinigten PCR-Produkte wurden bei - 20 °C gelagert.

2.2.5.3. Exo-SAP

Exo-SAP besteht aus den Enzymen Exonuklease I (Exo) und Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP). Die Exonuklease I baut freie Primer ab. Die Shrimp Alkaline Phosphatase spaltet Nukleotidtriphosphate zu Nukleosiden und Phosphat. So können die freien Primer und Nukleotidtriphosphate während der Sequenzierung nicht interferieren.

Der Ansatz wurde zuerst für 15 min bei 37 °C inkubiert, da dies das Temperaturoptimum der Enzyme ist (Bell, 2008). Anschließend wurden die Enzyme 15 min lang bei 80 °C inaktiviert.

Es wurden abhängig von der Stärke der Gelbanden des PCR-Produktes 3 - 5 µl DNA-Fragment in 0,2 ml-Streifen gegeben. 0,4 µl Exo-SAP wurden hinzugefügt. Im Thermocycler wurde der Ansatz unter oben beschriebenen Bedingungen inkubiert.

Nach der Inkubation wurde mit dem Ansatz direkt die Sequenzierungs-Reaktion angesetzt.

2.2.6. Didesoxy-Sequenzierung

Die Didesoxy-Sequenzierung nach Sanger beruht auf dem Kettenabbruch neu synthetisierter DNA-Stränge an spezifischen Stellen. Der Kettenabbruch wird durch 2'-3'-Didesoxynukleotide herbeigeführt. Wird ein solches Nukleotid in den DNA-Strang eingebaut, kann aufgrund der fehlenden Hydroxyl-Gruppe an der 3'-Position des Zuckers die Synthese nicht fortgesetzt werden (Sanger et al., 1977).

Der Reaktionsansatz für die Didesoxy-Sequenzierung ähnelt dem Reaktionsansatz einer PCR. Bei der Cycle-Sequenzierung wird die DNA-Synthese mittels Taq-Polymerase im Thermocycler durchgeführt. Es gibt jedoch zwei Unterschiede. Zum einen wird nur ein Primer pro Ansatz zugegeben, sodass von dem doppelsträngigen Template nur jeweils ein Strang amplifiziert wird. Zum anderen werden zusätzlich zu den Desoxynukleotiden spezifisch fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide hinzugegeben. Die Didesoxynukleotide werden ebenso effizient in den wachsenden DNA-Strang eingebaut wie die Desoxynukleotide. Es werden also nach dem Zufallsprinzip entweder Desoxynukleotide oder Didesoxynukleotide eingebaut. So kommt es an verschiedenen Stellen zum Kettenabbruch und es entstehen unterschiedlich lange DNA-Stränge, die alle mit einem spezifischen Didesoxynukleotid enden (Blackwell, 2006).

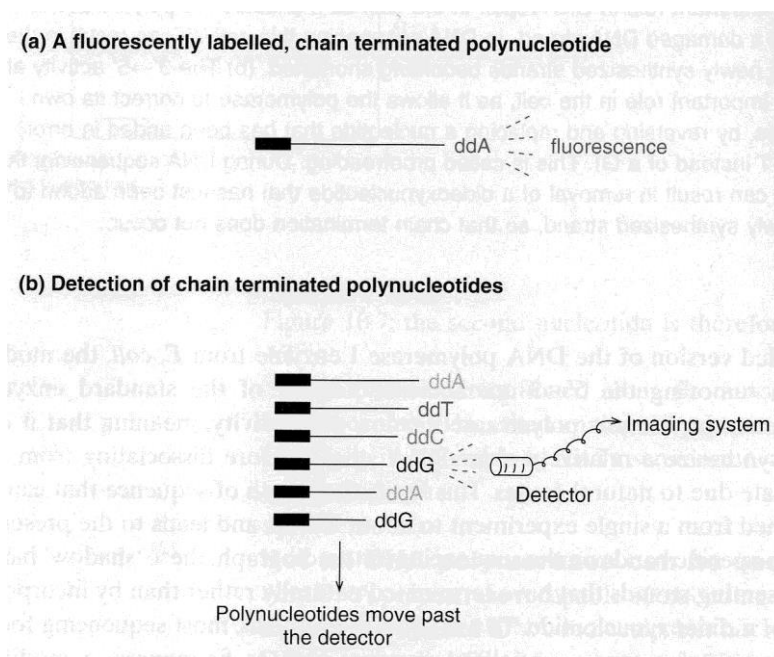


Abbildung 2.4: Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden (Brown 2006)

Die unterschiedlich langen Stränge werden über chromatographische Kapillarsysteme mittels Kapillarelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt und über Laser-induzierte Fluoreszenzdetektion vom ABI-Sequencer eingelesen (Pingoud et al., 2002). Die Ergebnisse einer Sequenzierung können als Elektropherogramm graphisch dargestellt werden.

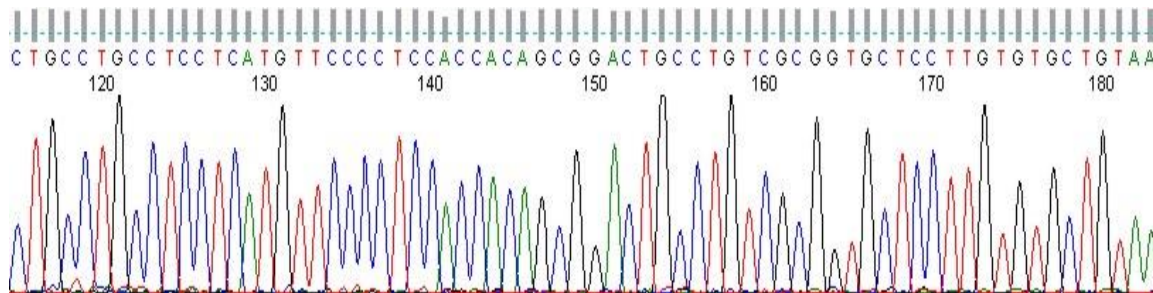


Abbildung 2.5: Exemplarisches Elektropherogramm (Ausschnitt)

Dargestellt ist ein Ausschnitt aus der Sequenzierung von Exon 3 an der DNA des Patienten 793.1 (jeder farbliche Ausschlag steht für eine spezifische Base: grün: Adenin, blau: Cytosin, schwarz: Guanin, rot: Thymin)

Für die Sequenzierung wurden die zuvor gereinigten PCR-Produkte der *PDYN*-Exons verwendet. Es wurde jeweils ein Ansatz für den Forward-Primer und ein Ansatz für den Reverse-Primer angesetzt. Die Ansätze wurden in 0,2 ml Streifen wie folgt pipettiert:

Tabelle 2.10: Pipettierschema für die Didesoxy-Sequenzierung

Reagenz	Menge [µl]
DNA-Fragment	3
H ₂ O bidest. steril filtriert	6,5
5x Sequenzier-Puffer	1
Forward-/Reverse-Primer 10 µM	2
ABI-Sequenziermix	2,5

Anschließend wurden im Thermocycler 25 Zyklen unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Tabelle 2.11: Sequenzier-Bedingungen der *PDYN*-Exons

Phase	Temperatur [°C]	Zeit [s]
initiale Denaturierung	96	60
Denaturierung	96	10
Annealing	60	10
Elongation	50	120

Danach wurden die Sequenzierprodukte für die Fluoreszenzdetektion aufgereinigt (s. 2.2.7.).

Die Ergebnisse der Sequenzierungen wurden mit dem Programm SeqScape Version 2.5 ausgewertet. Mit dem Programm konnten die Sequenzierungen graphisch dargestellt und direkt mit einer Referenzsequenz verglichen werden.

2.2.7. Reinigen der Sequenzier-Reaktionen für die Kapillarelektrophorese

Für das Reinigen der Sequenzier-Reaktionen wurden anstelle von Eppendorf-Gefäßen Mikrotiterplatten verwendet. In die Wells der beschrifteten Mikrotiterplatten wurden 300 µl gequollenes Sephadex G-50 gegeben. Die Platte wurde gewogen und mit einem Gegengewicht austariert. Dann wurde zwei Minuten lang bei 2100 rpm zentrifugiert. Das Eluat in der unteren Platte wurde verworfen.

Das Sephadex bildet nun eine Gelmatrix, die freie Nukleotide und Primer zurückhält. Die Platte mit dem Sephadex wurde auf eine Elutionsplatte gestellt und pro Well wurde ein Sequenzierungs-Ansatz auf das Sephadex pipettiert. Die Mikrotiterplatten wurden wieder mit einem Gegengewicht austariert und erneut zwei Minuten lang bei 2100 rpm zentrifugiert. Der gereinigte Sequenzierungs-Ansatz befand sich anschließend in den Wells der Elutionsplatte.

Das Eluat wurde in Multiwell-Streifen überführt und es wurden 10 µl deionisiertes Formamid zugegeben. Formamid verhindert die Ausbildung von Sekundärstrukturen

im Sequenzierungs-Ansatz. Sekundärstrukturen würden das Wanderungsverhalten der Nukleinsäuren während der Kapillarelektrophorese beeinflussen und so zu falschen Ergebnissen in der Sequenzanalyse führen. Der gereinigte Ansatz konnte so von dem ABI-Sequencer eingelesen werden.

2.2.8. Datenbanken zur Auswertung der Sequenzier-Ergebnisse

Um die erhaltenen Sequenzen der Patienten auswerten zu können, wurden folgende zwei Datenbanken verwendet:

2.2.8.1. Datenbank Ensembl Genome Browser

Die Sequenzen der Patienten wurden mit Referenz-Sequenzen der Datenbank Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org>) verglichen und so auf das Vorliegen einer möglichen Mutation oder Variante untersucht. Es wurde die Version Ensembl release 64 - Sep 2011 verwendet.

Ensembl ist ein gemeinsames Projekt des European Bioinformatics Institute (EBI) und des Wellcome Trust Sanger Institute (WTSI). Das Projekt wurde 1999 gestartet mit dem Ziel, die bekannten Daten über das menschliche Genom öffentlich zugänglich zu machen (<http://www.ensembl.info/about/> Stand 29.11.2012). Seitdem ist die Datenbank stetig gewachsen und umfasst mittlerweile die Genome mehrerer Wirbeltiere und ausgewählter Eukaryoten. Zudem ist Ensembl mit anderen Datenbanken verknüpft, die beispielsweise Informationen über Nukleotidpolymorphismen (dbSNP, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) oder Proteine (UniProt, <http://www.uniprot.org>) liefern (Flicek et al., 2010).

2.2.8.2. Datenbank Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP)

Um eine Aussage über die Häufigkeiten der bekannten Varianten treffen zu können, wurde die Single Nucleotide Polymorphism Database (dbSNP, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) hinzugezogen.

Die dbSNP ist eine öffentlich zugängliche Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) in Zusammenarbeit mit dem National Human Genome Research Institute (NHGRI). Die Datenbank wurde 1998 gegründet (Sherry et al., 1999). Sie enthält über 12 Millionen SNPs des humanen Genoms (Wheeler et al., 2007). Die Daten stammen aus dem NHLBI Exome Sequencing Project (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) und dem „1000 Genomes“ Projekt (<http://www.1000genomes.org>). Das Ziel des „1000 Genomes“ Projektes ist das Erstellen einer Datenbank, die genetische Variationen mit einer Häufigkeit von 1 % oder mehr umfasst. Dafür sollten 2500 Genome sequenziert werden (<http://www.1000genomes.org/about> Stand 11.12.2012). Mittlerweile sind 2577 Genome in der Datenbank enthalten (<http://www.1000genomes.org/about> Stand 10.12.2014).

3. Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die DNA-Proben von 40 Patienten mit dominant vererbten spinozerebellären Ataxien auf Mutationen in den vier Exons des *Prodynorphin*-Gens untersucht.

3.1. Patientenkollektiv

Es wurden 40 deutsche Patienten nach den folgenden Kriterien ausgewählt. Dabei handelte es sich um 16 weibliche und 24 männliche Patienten.

Bei der Spinozerebellären Ataxie Typ 23 (SCA23) handelt es sich um eine autosomal dominant vererbte Erkrankung. Deshalb wurden nur Patienten in das Kollektiv aufgenommen, bei denen eine dominant vererbte SCA vorliegt. Dies wurde anhand der Familienanamnese beurteilt. Bei allen untersuchten Patienten waren nahe Verwandte ebenfalls an einer SCA erkrankt. Dabei wurde beachtet, dass die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den Erkrankten mit einem autosomal dominanten Erbgang vereinbar sind.

Zudem wird die SCA23 als langsam progredient verlaufende Erkrankung beschrieben. Die untersuchten Patienten zeigen alle einen solchen Krankheitsverlauf.

Die Patienten wurden zuvor auf die spinozerebellären Ataxien Typ 1, 2, 3, 6, 7, 13, 14, 17 und 28 getestet. So konnten Mutationen in den bekannten Loci als Ursache für die Erkrankung ausgeschlossen werden.

Die verwendeten DNA-Proben wurden in der Zeit von 1997 - 2011 zur SCA-Diagnostik an das humangenetische Institut der Justus-Liebig-Universität geschickt. Im Rahmen der Aufklärung für die molekulargenetische Testung haben die Patienten zugestimmt, dass ihre DNA auch für weitere diagnostische Studien verwendet werden darf. Ein positives Votum der Ethikkommission der Justus-Liebig-Universität Gießen liegt für

diese Untersuchungen vor.

3.2. Sequenzanalyse des *Prodynorphin*-Gens

Die DNA-Proben von 40 Patienten mit dominant vererbten spinocerebellären Ataxien wurden auf Mutationen in den codierenden Exons 3 und 4 des *Prodynorphin* (*PDYN*)-Gens untersucht. Mutationen im 5'UTR-Bereich können zu Veränderungen in der Genexpression sowie zu Veränderungen in der posttranskriptionellen Regulation der mRNA führen. Deshalb wurden die nicht-codierenden Exons 1 und 2 bei 19 Patienten aus demselben Kollektiv ebenfalls auf Mutationen getestet. Da Punktmutationen in untranslatierten Exons selten zu einer Erkrankung führen, erfolgte die Beschränkung auf 19 Patienten. Die Patienten wurden nach der Menge der noch zur Verfügung stehenden DNA ausgewählt. Für die Sequenzanalyse wurden die Exons mit ihren flankierenden Bereichen mittels PCR amplifiziert und anschließend mit der Didesoxy-Methode nach Sanger sequenziert. Die Sequenzierprodukte wurden mit einem ABI-Sequencer eingelesen.

Die Ergebnisse wurden mit den Referenz-Sequenzen der Datenbank Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org>, Ensembl release 64 - Sep 2011) verglichen und so auf Veränderungen gegenüber der Wildtyp-Sequenz untersucht. Die Häufigkeitsangaben zu den Varianten stammen aus dem NHLBI Exome Sequencing Project sowie aus dem „1000 Genomes“ Projekt und wurden der Website des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) entnommen.

Die Sequenzvarianten sind nach der internationalen Nomenklatur benannt. Wird eine Sequenzvariante (SNP) an das NCBI übermittelt, bekommt der SNP eine „submitted SNP ID number (ss#)“ zugeteilt. Der SNP wird nun in das Genom eingeordnet und ihm wird eine „reference SNP ID number (rs#)“ zugeordnet. Werden mehrere SNPs dem gleichen Genort zugeordnet, werden sie zu einem „reference SNP cluster“ unter einer gemeinsamen rs-Nummer zusammengefasst (Kitts et al., 2011).

Nachfolgend sind die in der Datenbank Ensembl Genome Browser beschriebenen

Varianten aufgeführt und mit dem Auftreten im untersuchten Patientenkollektiv verglichen.

3.2.1. Exon 1 (nicht codierend)

Für das nicht-codierende Exon 1 sind drei Varianten beschrieben (Stand Dezember 2014). Für die Häufigkeit der Varianten wird die minor allele frequency (MAF) angegeben. Dieser Wert gibt an, mit welcher Häufigkeit das seltenere Allel, also das vom Wildtyp abweichende Allel, in einer Population vorkommt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Die Daten über die Häufigkeit der Allele stammen aus dem „1000 Genomes“ Projekt. Als Lokalisation wird die genomische Position der entsprechenden Base angegeben.

Tabelle 3.1: Bekannte SNPs in Exon 1 des *PDYN*-Gens

SNP	Lokalisation	Allele	Variationstyp	MAF
rs184242261	g.20 1974700	T>G	5'UTR-Variante	0,001
rs35431673	g.20 1974583	G>C	5'UTR-Variante	unbekannt
rs114320630	g.20 1974571	C>G	5'UTR-Variante	0,012

SNP, single nucleotide polymorphism; UTR, untranslated region; MAF, minor allele frequency

Die beschriebenen Varianten wurden in den 19 untersuchten DNA-Proben nicht gefunden.

3.2.2. Exon 2 (nicht codierend)

Für Exon 2 sind zwei Varianten bekannt (Stand Dezember 2014):

Tabelle 3.2: Bekannte SNPs in Exon 2 des *PDYN*-Gens

SNP	Lokalisation	Allele	Variationstyp	MAF
rs373426569	g.20 1992612	C>T	5'UTR-Variante	<0,001
rs61519908	g.20 1973231	C>G	Spleiß-Variante	0,002

SNP, single nucleotide polymorphism; MAF, minor allele frequency

Keine der beiden Varianten wurde in den 19 untersuchten DNA-Proben gefunden.

3.2.3. Exon 3

In Exon 3 sind zehn Varianten beschrieben (Stand Dezember 2014). Da es drei unterschiedliche Transkriptvarianten (s. Tabelle 3.2) des *PDYN*-Gens gibt, wird die Lokalisation der Varianten nicht auf Transkriptebezug angegeben, um Verwechslungen zu vermeiden. Stattdessen bezieht sich die Lokalisation auf die Proteinebene. Zusätzlich werden die Veränderungen in der Aminosäuresequenz aufgeführt.

Tabelle 3.3: Proteincodierende Transkriptvarianten des *PDYN*-Gens

Name	Transkript-ID	Länge (Bp)	Protein-ID	Länge (AS)	Biotyp
PDYN-002	ENST00000217305	2555	ENSP00000217305	254	codierend
PDYN-201	ENST00000539905	2526	ENSP00000440185	254	codierend
PDYN-202	ENST00000540134	2472	ENSP00000442259	254	codierend

Tabelle nach <http://www.ensembl.org>

Tabelle 3.4: Bekannte SNPs in Exon 3 des *PDYN*-Gens

SNP	Lok.	Allele	Variationstyp	AS	MAF
rs78675761	p.14	A>G	Missense-Variante	M>V	0,001
rs146598522	p.20	C>T	Missense-Variante	A>V	< 0,001
rs77727400	p.23	C>T	stille Variante	L	0,002
rs201321347	p.24	C>T	Missense-Variante	S>L	0,001
rs369559888	p.25	G>A	Missense-Variante	R>Q	< 0,001
rs377388422	p.28	G>C	Missense-Variante	L>F	< 0,001
rs199834174	p.31	G>A	Missense-Variante	V>I	0,001
rs149056587	p.36	G>T	Missense-Variante	G>C	0,001
rs370275645	p.37	C>T	Missense-Variante	P>L	< 0,001
rs59191035	p.41	A>G	Missense-Variante	N>D	0,007

SNP, single nucleotide polymorphism; Lok., Lokalisation; AS, Aminosäure; MAF, minor allele frequency

In Exon 3 wurde keine der Varianten in dem untersuchten Patientenkollektiv (40 DNA-Proben) gefunden.

3.2.4. Exon 4

Im Folgenden sind die für Exon 4 bekannten Varianten aufgeführt (Stand Dezember 2014). Die in dem untersuchten Patientenkollektiv vorhandenen Varianten wurden markiert.

Tabelle 3.5: Bekannte SNPs in Exon 4 des *PDYN*-Gens

SNP	Lok.	Allele	Variationstyp	AS	MAF
rs149872114	p.49	C>A	Nonsense-Variante	C>*	0,001
rs199609910	p.50	A>G	Missense-Variante	Q>R	< 0,001
rs368889501	p.54	G>A	stille Variante	L	< 0,001
rs139057250	p.62	C>T	stille Variante	C	< 0,001

Ergebnisse

rs371856641	p.72	T>C	Missense-Variante	S>P	< 0,001
rs200312876	p.78	C>T	stille Variante	D	< 0,001
rs201585283	p.90	G>A	Missense-Variante	G>R	0,002
rs147355936	p.91	C>T	Missense-Variante	P>S	0,001
rs368307520	p.92	A>G	Missense-Variante	Y>C	< 0,001
rs182230231	p.100	G>T	stille Variante	G	0,002
rs144485788	p.117	A>G	Missense-Variante	T>A	< 0,001
rs140611042	p.122	T>C	Missense-Variante	L>P	0,001
rs375073007	p.133	C>T	Missense-Variante	L>F	< 0,001
rs147181436	p.135	C>T	stille Variante	D>D	0,002
rs267606941	p.138	G>T	Missense-Variante	R>S	< 0,001
rs368426100	p.144	G>A	stille Variante	E	< 0,001
rs77155664	p.146	A>C	Missense-Variante	M>L	0,004
rs148113209	p.152	C>T	stille Variante	N	0,001
rs144748816	p.159	G>A	Missense-Variante	G>D	< 0,001
rs376124198	p.164	G>A	Missense-Variante	A>T	< 0,001
rs370283678	p.180	C>T	Missense-Variante	R>C	< 0,001
rs377075531	p.180	G>C	Missense-Variante	R>P	< 0,001
rs45469293	p.192	A>T	Missense-Variante	E>V	0,008
rs138795080	p.194	G>T	Missense-Variante	D>Y	< 0,001
rs6045819	p.200	T>C	stille Variante	H	0,096
rs141379855	p.209	G>A	Missense-Variante	G>D	< 0,001
rs267606940	p.211	T>C	Missense-Variante	L>S	unbekannt
rs201486601	p.212	C>T	Missense-Variante	R>W	0,001
rs138498390	p.212	G>A	Missense-Variante	R>Q	< 0,001
rs150455107	p.213	C>T	Missense-Variante	R>C	< 0,001
rs373922212	p.213	G>A	Missense-Variante	R>H	< 0,001
rs267606939	p.215	C>T	Missense-Variante	R>C	unbekannt
rs201655505	p.215	G>A	Missense-Variante	R>H	0,001

Ergebnisse

rs200037738	p.216	C>T	Missense-Variante	P>L	0,001
TMP ESP 20 1961075 1961076	p.220	GT>	Frameshift- Variante		unbe- kannt
rs151054993	p.228	>GTT	Inframe Insertion	>V	unbe- kannt
rs75861277	p.230	C>T	Missense-Variante	L>F	unbe- kannt
rs201204862	p.231	C>A	stille Variante	R	0,001
rs76243088	p.231	G>A	Missense-Variante	R>Q	< 0,001
rs376562868	p.232	C>T	Missense-Variante	R>C	< 0,001
rs150953132	p.236	G>A	stille Variante	V	< 0,001
rs112907294	p.238	A>G	Missense-Variante	T>A	0,005
rs185551108	p.239	G>A	Missense-Variante	R>Q	0,002
rs141248791	p.244	G>A	stille Variante	P	0,001

SNP, single nucleotide polymorphism; Lok., Lokalisation; AS, Aminosäure; MAF, minor allele frequency; *=Stopp-Codon

Im 3'-untranslatierten Bereich (3'UTR) von Exon 4 sind noch weitere Varianten beschrieben. Da der untranslatierte Abschnitt im Rahmen dieser Arbeit nicht sequenziert wurde, wurden die entsprechenden Varianten nicht aufgeführt.

Zwei der oben aufgeführten Varianten (rs6045819 und rs77155664) wurden im Patientenkollektiv gefunden:

rs6045819 T>C

Für die Position g.20 1961134 auf Genomebene bzw. p.200 auf Proteinebene ist als Variante ein Cytosin anstelle des Thymins beschrieben. Dadurch verändert sich das Codon CAT zu CAC. Beide Codons codieren für die Aminosäure Histidin. Es handelt sich also um eine stille Variante, sodass dieser SNP keine Auswirkungen auf die Proteinstruktur hat.

Die minor allele frequency (MAF) für die europäische Bevölkerung ist in dem „1000

Genomes“ Projekt mit 0,096 angegeben. Damit handelt es sich um die häufigste Variante des *Prodynorphin*-Gens. Existieren an einem Genort zwei Allele (Wildtypallel und Variantenallel) lassen sich die Allelfrequenzen nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz berechnen. Die Summe der Häufigkeiten des Wildtypallels (p) und des Variantenallels (q) ist $p+q=1$. Die Häufigkeit des Variantenallels ist mit 0,096 (MAF) angegeben. Für die Häufigkeit des Wildtypallels ergibt sich damit $1-0,096=0,904$. Mit Hilfe des Hardy-Weinberg-Gesetzes lassen sich aus diesen Werten die Häufigkeiten der möglichen Genotypen berechnen (Stern, 1943). Dabei muss berücksichtigt werden, dass das Hardy-Weinberg-Gesetz nur für die „ideale Population“ gilt. Das heißt die Paarungen innerhalb der Population erfolgen zufällig (Panmixie), die Population ist so groß, dass der Zufall (Gendrift) keinen relevanten Einfluss auf die Allelhäufigkeiten hat, die verschiedenen Allele dürfen keinen Selektionsvorteil oder Selektionsnachteil bedeuten und es darf weder Neumutationen noch Zu- oder Abwanderung (Migration) geben. Die Panmixie beeinflusst die Häufigkeiten der Genotypen, während die anderen Faktoren sich vor allem auf die Allelfrequenzen auswirken (Schaaf et al., 2008). Die möglichen Genotypen sind Homozygotie für die Wildtypallele (p^2), Homozygotie für die Variantenallele (q^2) und Heterozygotie (pq). Für die Häufigkeitsverteilung dieser Genotypen gilt $p^2+2pq+q^2=1$ (Stern, 1943). Damit ergibt sich eine Homozygotenfrequenz für das Wildtypallel (Genotyp T/T) von 0,817, eine Homozygotenfrequenz für das Variantenallel (Genotyp C/C) von 0,009 und eine Heterozygotenfrequenz (Genotyp T/C) von 0,174.

In dem untersuchten Patientenkollektiv waren 10 Proben heterozygot für die Allele T und C (Genotyp T/C). Dabei handelte es sich um die Proben 4.1, 32.2, 200.1, 269.1, 642.1, 669.1, 684.1, 839.1, 894.1 und 978.1. Die anderen 30 Proben waren homozygot für die Wildtyp-Allele T (Genotyp T/T). Damit lag der heterozygote Genotyp T/C mit einer Häufigkeit von 0,250 und der homozygote Wildtyp (Genotyp T/T) mit einer Häufigkeit von 0,750 vor. Diese Werte weichen von der erwarteten Häufigkeitsverteilung (s. oben) leicht ab, was aufgrund des kleinen Patientenkollektivs zu erwarten ist.

Ergebnisse

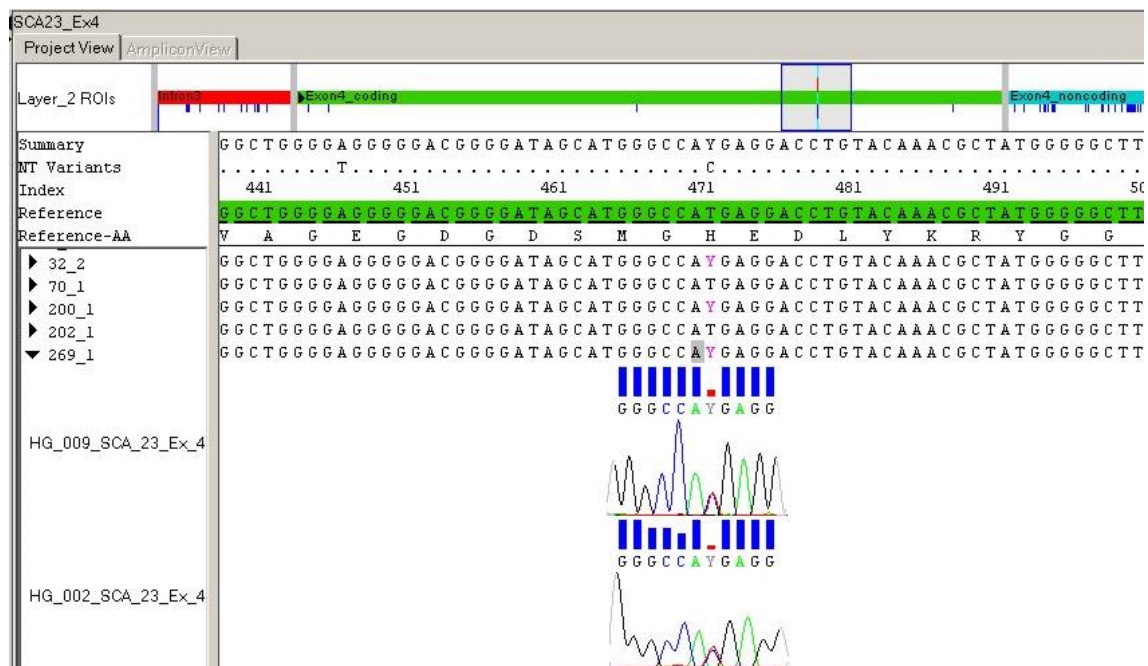


Abbildung 3.1: Ausschnitt aus der Sequenzanalyse von Exon 4 des *PDYN*-Gens der DNA-Probe 269.1. Die Auswertung erfolgte mit der Software „SeqScape“ (ABI). Dargestellt ist der für die Allele T und C heterozygote SNP (rs6045819) an Position g.20 1961134 anhand der DNA-Probe 269.1.

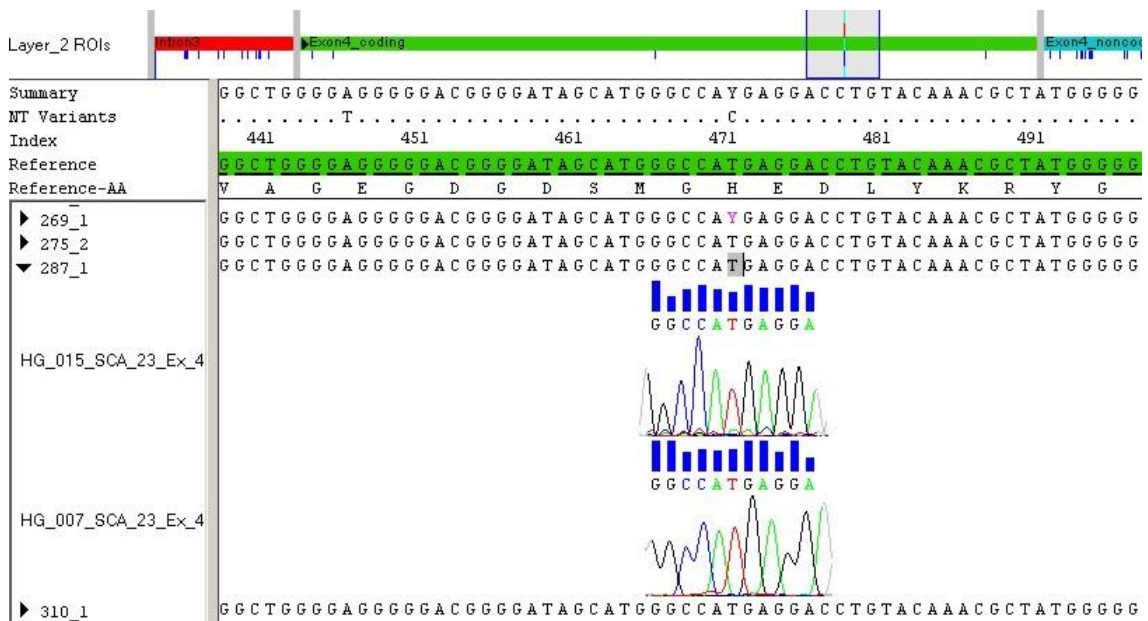


Abbildung 3.2: Ausschnitt aus der Sequenzanalyse von Exon 4 des *PDYN*-Gens der DNA-Probe 287.1. Die Auswertung erfolgte mit der Software „SeqScape“ (ABI). Dargestellt ist der homozygote SNP (Wildtyp, rs6045819) an Position g.20 1961134 anhand der DNA-Probe 287.1.

rs77155664 A>C

An Position g.20 1961298 auf Genomebene bzw. p.146 auf Proteinebene liegt anstelle eines Adenins ein Cytosin vor. Dadurch ändert sich das Codon ATG zu CTG, sodass an Position p.146 die Aminosäure Leucin anstelle von Methionin eingebaut wird. Es handelt sich also um eine Missense-Variante. Laut den Programmen PolyPhen2 (<http://www.genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) und SIFT (<http://www.sift.jcvi.org>), die den möglichen Einfluss einer Veränderung der Aminosäuresequenz auf die Proteinstruktur und -funktion berechnen, handelt es sich um eine benigne Variante.

Die minor allele frequency (MAF) liegt für die europäische Bevölkerung bei 0,004. Nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz liegt das Wildtypallel A mit einer Häufigkeit von 0,996 vor. Daraus ergeben sich eine Heterozygotenfrequenz (Genotyp A/C) von 0,008 und eine Homozygotenfrequenz für das Wildtypallel (Genotyp A/A) von 0,992.

In dem untersuchten Patientenkollektiv war die DNA-Probe 978.1 heterozygot für die Allele A und C (Genotyp A/C). Bei den anderen 39 Patienten lagen die Wildtyp-Allele homozygot vor (Genotyp A/A).

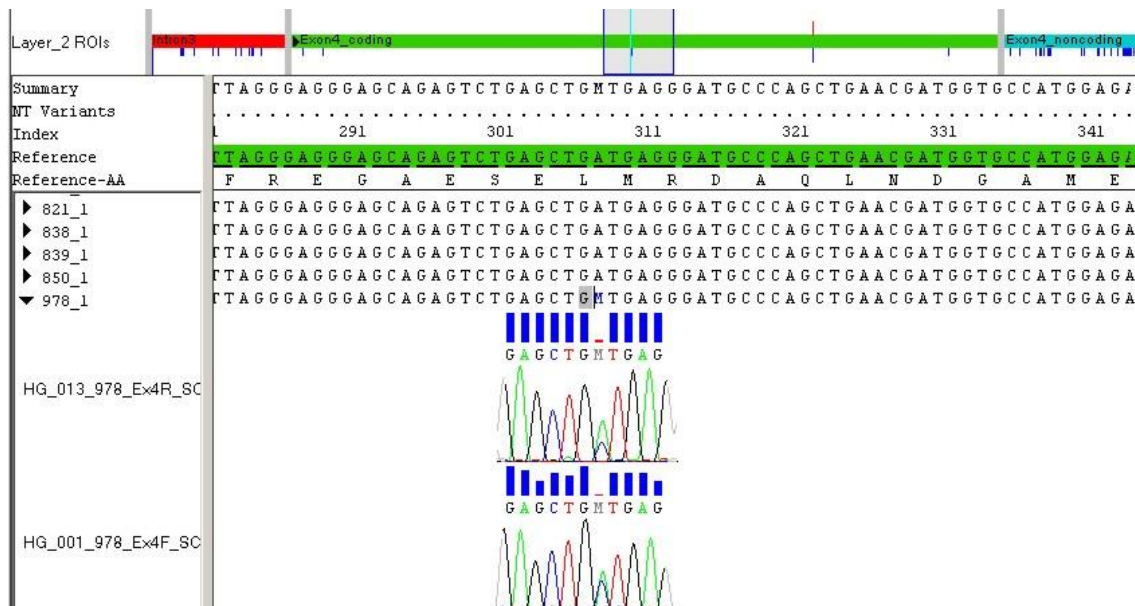


Abbildung 3.3: Ausschnitt aus der Sequenzanalyse von Exon 4 des *PDYN*-Gens der DNA-Probe 978.1. Die Auswertung erfolgte mit der Software „SeqScape“ (ABI). Dargestellt ist der für die Allele A und C heterozygote SNP (rs77155664) an Position g.20 1961298 anhand der DNA-Probe 978.1.

3.2.5. Krankheitsauslösende Mutationen

Neun unterschiedliche Mutationen im *Prodynorphin*-Gen sind als auslösend für die SCA23 in der internationalen Literatur beschrieben. Bei acht Mutationen handelt es sich um Missense-Mutationen in den codierenden Exons 3 und 4. Bei einer Mutation kommt es durch die Deletion von zwei Basen zu einem Frameshift mit vorzeitigem Stopp-Codon (Bakalkin et al., 2010, Fawcett et al., 2011, Jezierska et al., 2013).

Tabelle 3.6: Bekannte pathogene Mutationen im *PDYN*-Gen

Lokalisation	Allele	Exon	Proteinebene	Quelle
c.65	G>A	3	p.C22Y	Fawcett et al., 2011
c.414	G>T	4	p.R138S	Bakalkin et al., 2010
c.616	C>T	4	p.R206C	Jezierska et al., 2013
c.617	G>A	4	p.R206H	Jezierska et al., 2013
c.632	T>C	4	p.L211S	Bakalkin et al., 2010
c.634	C>T	4	p.R212W	Bakalkin et al., 2010
c.643	C>T	4	p.R215C	Bakalkin et al., 2010
c.658-659	del GT	4	p.W220GfsX33	Jezierska et al., 2013
c.680	G>A	4	p.G227D	Jezierska et al., 2013

In dem untersuchten Patientenkollektiv konnte keine der oben genannten Mutationen nachgewiesen werden.

Es wurde auch keine neue möglicherweise krankheitsauslösende Mutation entdeckt. Die beiden in dem Patientenkollektiv vorhandenen Varianten sind bereits bekannt und werden als benigne beschrieben. Eine SCA23 konnte somit als Ursache der Ataxie bei den untersuchten Patienten ausgeschlossen werden.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die DNA von 40 Patienten, die an einer spinocerebellären Ataxie unbekannten Ursprungs erkrankt waren, auf das Vorliegen von SCA23-typischen Mutationen untersucht. Als Ursache für die SCA23 sind Missense-Mutationen sowie eine Frameshift-Mutation im *Prodynorphin*-Gen beschrieben (Bakalkin et al., 2010, Fawcett et al., 2012, Jezierska et al., 2013). Deshalb wurden bei den vorliegenden DNA-Proben die Exons des *Prodynorphin*-Gens sequenziert, um nach möglichen Punktmutationen oder kleinen Insertionen beziehungsweise Deletionen zu suchen. Um die Wahrscheinlichkeit für das Auffinden von SCA23-verursachenden Mutationen zu erhöhen, wurden die in diese Studie eingeschlossenen Patientenproben vorausgewählt. Da es sich bei der SCA23 um eine dominant vererbte, langsam progredient verlaufende Erkrankung handelt, wurden Patienten mit einem entsprechendem Krankheitsverlauf ausgewählt. Zudem wurde das Vorliegen einer SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA13, SCA14, SCA17 oder SCA28 bei den Patienten zuvor ausgeschlossen. Das Ziel der Arbeit war es, weitere Daten über die Häufigkeit der SCA23 für mitteleuropäische Ataxiepatienten zu gewinnen und möglicherweise neue krankheitsauslösende Mutationen im *Prodynorphin*-Gen zu finden.

4.1. SCA23

Das *PDYN*-Gen ist auf Chromosom 20p13 lokalisiert und codiert für das Prodynorphin, welches das Vorläuferprotein für die endogenen Neuropeptide α -Neoendorphin, Dynorphin A und Dynorphin B ist (Akil et al., 1984, Bakalkin et al., 2010). Die Dynorphine sind bei der Regulation von Lernprozessen, Gedächtnisbildung, Emotionen, Stress und Schmerz beteiligt (Schwarzer, 2009). Außerdem sollen sie eine Rolle bei der Entstehung von Epilepsie (Loacker et al., 2007), Alkoholismus (Taqi et al., 2011), Heroin- und Kokainabhängigkeit (Clarke et al., 2012) sowie bei Depression (Knoll et al., 2010) spielen.

Bei der SCA23 handelt es sich um eine spät einsetzende, langsam progrediente, rein

zerebelläre Ataxie. Wie auch für die meisten der anderen bekannten spinozerebellären Ataxien beschrieben, sind die Symptome der SCA23 unspezifisch, was die klinische Diagnostik erschwert. Als gemeinsame Symptome zeigen die Patienten eine Gangataxie, Ataxie der Gliedmaßen, Dysarthrie, Störungen der Okulomotorik sowie einen verminderten Vibrations- und Positionssinn (Verbeek et al., 2004). Einige Patienten zeigen weitere Symptome, wie beispielsweise Polyneuropathie, Tremor, Parkinsonismus oder Hyperreflexie (Bakalkin et al., 2010, Jezierska et al., 2013). Diese Symptome sind bei den verschiedenen Patienten sehr variabel.

In dem im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patientenkollektiv wurde keine der bekannten Mutationen gefunden. Neue, unbekannte Mutationen wurden ebenfalls nicht entdeckt. Dieses Ergebnis kann mehrere Gründe haben. Zum einen handelt es sich bei der SCA23 um eine seltene Form der spinozerebellären Ataxie. In den Niederlanden wurden zwei SCA23-Familien und zwei sporadische SCA23-Fälle beschrieben (Verbeek et al., 2004, Bakalkin et al., 2010). In weiteren großen Screeninguntersuchungen an insgesamt 1751 Ataxie-Patienten in Deutschland, den USA, China, Frankreich, Großbritannien und Nordafrika, bei denen zuvor die häufigsten SCA-Typen ausgeschlossen werden konnten, wurden lediglich sechs weitere SCA23-Fälle entdeckt (Schicks et al., 2011, Fogel et al., 2012, Liu et al., 2012, Fawcett et al., 2012, Jezierska et al., 2013). Es wird davon ausgegangen, dass die SCA23 nur 0,1 % der dominant vererbten spinozerebellären Ataxien ausmacht (Fawcett et al., 2012). In einer Screening-Untersuchung an 104 deutschen Patienten mit dominant vererbter spinozerebellärer Ataxie unbekannter Ursache wurde nicht ein Patient mit einer SCA23 identifiziert (Schicks et al., 2012). Somit bestätigt die hier durchgeführte Arbeit die aktuellen Ergebnisse der anderen Arbeitsgruppen, die allesamt erst nach dem Abschluss dieser praktischen Arbeit erschienen sind, dass es sich bei der SCA23 um einen sehr seltenen Subtypen der spinozerebellären Ataxien handelt.

Eine weitere mögliche Ursache für das Nichtauffinden von *PDYN*-Mutationen kann in dem kleinen Patientenkollektiv liegen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 40 Patienten auf das Vorliegen einer SCA23 getestet. Bei der geringen Anzahl ist es statistisch gesehen unwahrscheinlich, eine Mutation zu finden. Um die Wahrscheinlichkeit für ein positives Testergebnis zu erhöhen, wurden nur Patienten in das Kollektiv

eingeschlossen, bei denen das Vorliegen einer SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA13, SCA14, SCA17 und SCA28 bereits ausgeschlossen war und deren Krankheitsverlauf dem der SCA23 entspricht. Da das klinische Bild der SCA23 sehr heterogen ist, war eine gezieltere Vorauswahl nach klinischen Symptomen schwierig (Bakalkin et al., 2010). Dennoch ist es in der Vergangenheit gelungen, an einem stellenweise identischen und von der Probenzahl vergleichbaren DNA-Pool Mutationen, z. B. verursachend für die SCA14, zu identifizieren (Nolte et al., 2007).

Bakalkin und Mitarbeiter konnten vier Missense-Mutationen im *PDYN*-Gen als Ursache für die SCA23 identifizieren: p.R138S, p.L211S, p.R212W und p.R215C (Bakalkin et al. 2010). Die Arbeitsgruppe um Fawcett entdeckte eine weitere krankheitsauslösende Missense-Mutation, p.C22Y, und Jezierska und Mitarbeiter entdeckten eine Frameshift-Mutation, p.W220GfsX33, sowie drei weitere Missense-Mutationen, p.R206C, p.R206H und p.G227D (Fawcett et al., 2012, Jezierska et al., 2013). Da es sich bei den bekannten SCA23-Mutationen ausschließlich um Punktmutationen in den codierenden Exons handelt (Bakalkin et al., 2010, Fawcett et al., 2012, Jezierska et al., 2013), wurden im Rahmen dieser Arbeit die Exons sowie die Spleißgrenzen des *Prodynorphin*-Gens sequenziert. Die Introns und die 5'UTR-Regionen des *PDYN*-Gens wurden nicht vollständig sequenziert, sodass mögliche Punktmutationen in diesen Bereichen nicht erfasst werden konnten. Da sich solche Mutationen auf das Spleißen, die Regulation der Transkription oder die posttranskriptionelle Regulation auswirken können, kommen sie als mögliche Krankheitsursache in Betracht. Ein Beispiel für derartige Mutationen sind Promotormutationen der TATA-Box oder der CACCC-Box im β -Globin-Gen, die ursächlich für die β -Thalassämie sind (Maston et al., 2006). Zudem können Gen-Rearrangements oder Makrodeletionen durch die Methode der Sequenzierung nicht dargestellt werden (Schicks et al., 2011, Liu et al., 2012). Es wäre also möglich, dass in dem Patientenkollektiv vorhandene Mutationen übersehen wurden.

4.2. Varianten im *Prodynorphin*-Gen

Eine Variante beschreibt eine Abweichung von der Wildtyp-Sequenz. In den meisten Fällen handelt es sich um einzelne Basen, die ausgetauscht sind (single nucleotide polymorphism, SNP). Die meisten Varianten führen zu keiner funktionellen Veränderung. Sie werden vom Organismus toleriert. Handelt es sich um eine krankheitsauslösende Variante, spricht man von einer Mutation (Schaaf et al., 2008). Für die Exons des *Prodynorphin*-Gens sind 59 Varianten beschrieben, die im codierenden Bereich liegen (<http://www.ensembl.org>, Stand Dezember 2014). Die meisten Varianten des *PDYN*-Gens sind so selten, dass sie eine minor allele frequency (MAF) von $< 0,01$ haben. Lediglich eine Variante (rs6045819) weist eine MAF von 0,096 auf und ist damit vergleichsweise häufig zu finden. Die Häufigkeitsangaben zu den Varianten stammen aus dem „1000 Genomes“ Projekt (<http://www.1000genomes.org>).

In dem untersuchten Patientenkollektiv konnten zwei der bekannten Varianten nachgewiesen werden. Es handelt sich dabei um Varianten aus dem codierenden Bereich von Exon 4. Neue Varianten wurden nicht entdeckt.

Die Variante rs6045819 wurde bei zehn der 40 untersuchten Patienten gefunden. Es handelt sich dabei um eine stille Variante, bei der an Position g.20 1961134 bzw. p.200 ein Thymin durch ein Cytosin ersetzt wird. Durch die Variante bleibt das Histidin an Position p.200 erhalten. Die MAF für diese Variante beträgt 0,096 (<http://www.ensembl.org>). Aufgrund der Häufigkeit dieser Variante war zu erwarten, dass sie in dem untersuchten Patientenkollektiv vorkommt. Zehn Patienten waren heterozygot für die Variante rs6045819. Das entspricht einer MAF von 0,125 und einer Heterozygotenfrequenz von 0,250 in dem untersuchten Kollektiv.

Des Weiteren war ein Patient heterozygot für die Variante rs77155664. Bei dieser Variante ist ein Adenin an Position g.20 1961298 bzw. p.146 durch ein Cytosin ersetzt. Es handelt sich dabei um eine benigne Missense-Mutation, die auf Proteinebene den Einbau eines Leucins anstelle eines Methionins zur Folge hat. Die Variante rs77155664 kommt mit einer MAF von 0,004 vor (<http://www.ensembl.org>). In dem untersuchten

Patientenkollektiv war ein Patient heterozygot für die Allele A/C, sodass die MAF im untersuchten Kollektiv 0,013 beträgt.

Die MAF weicht folglich im untersuchten Patientenkollektiv sowohl bei dieser Variante als auch bei der Variante rs6045819 von den durch das „1000 Genomes“ Projekt ermittelten Häufigkeiten ab. Das kann zum einen an der geringen Größe des Patientenkollektivs liegen. Eine weitere mögliche Ursache kann sein, dass die Häufigkeitsangaben des „1000 Genomes“ Projektes für die gesamte europäische Bevölkerung gelten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden aber nur deutsche Patienten untersucht, was eine Abweichung der Allelfrequenzen begründen kann.

Weitere Varianten wurden in dem untersuchten Patientenkollektiv nicht gefunden. Dafür gibt es mehrere mögliche Gründe. Zum einen kann es daran liegen, dass die Varianten mit einer MAF von $< 0,01$ sehr selten vorkommen. Eine weitere mögliche Ursache ist die geringe Größe des Patientenkollektivs. Bei 40 untersuchten Patienten ist es statistisch gesehen sehr unwahrscheinlich eine Variante mit einer MAF $< 0,01$ zu finden. Zudem muss berücksichtigt werden, dass die vollständigen Introns sowie der nicht codierende Bereich von Exon 4 im Rahmen dieser Arbeit nicht sequenziert wurden. Varianten aus diesen Bereichen können deshalb nicht berücksichtigt werden.

Auch wenn es sich bei der Variante rs6045819 um eine stille Variante handelt, die keine Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz hat, kann die Punktmutation aufgrund der humanen Codon usage Auswirkungen haben. Synonyme Codons werden bei verschiedenen Spezies unterschiedlich häufig verwendet. Dieses Phänomen wird als Codon usage bezeichnet (Fredrick et al., 2010). Dabei hat die Verwendung verschiedener synonymen Codons Auswirkungen auf die Expression des Gens, die Geschwindigkeit der Translation und auf die Effizienz der Proteinfaltung (Novoa et al., 2012). Cannarozzi und Mitarbeiter konnten die sogenannte Auto-Korrelation nachweisen. Das heißt, dass in einem Gen immer dasselbe Codon für eine Aminosäure codiert. Wird diese Auto-Korrelation durch Veränderungen in der Nukleinsäuresequenz aufgehoben, dauert die Translation entsprechend länger (Cannarozzi et al., 2010). Das heißt, eine stille Variante kann durch eine veränderte Expression oder Translation Auswirkungen auf die Menge des Proteinproduktes haben und so einen pathogenen

Effekt in Zellen verursachen.

Bei der Bewertung der Varianten innerhalb des *PDYN*-Gens sollte beachtet werden, dass die exonischen Bereiche über die unterschiedlichen Spezies hinaus eine hohe Konserviertheit aufweisen (<http://www.ensembl.org>). Das lässt darauf schließen, dass Varianten in diesem Bereich weniger toleriert werden, da es sich um ein funktionell wichtiges Gen handelt.

4.3. Pathogenese der SCA23

Die Mutationen p.R206C, p.R206H, p.L211S, p.R212W, p.R215C und p.W220GfsX33 führen zu Veränderungen in der Aminosäuresequenz des Dynorphin A (Dyn A) (Jezierska et al., 2013, Bakalkin et al., 2010). Als mögliche Ursache für den Verlust der Purkinje-Zellen wird die toxische Wirkung von akkumulierendem Dyn A diskutiert. Bakalkin und Mitarbeiter konnten anhand von Zellversuchen zeigen, dass das Dyn A beim Vorliegen der Mutationen p.L211S und p.R212W zehn- bis achtzehnfach erhöht ist im Vergleich zum Wildtyp. In einem weiteren Versuch konnte gezeigt werden, dass das Dyn A bei den Mutationen p.R212W und p.R215C stärker neurotoxisch wirkt als das Wildtyp-Dyn A (Hauser et al., 1999, Bakalkin et al., 2010). Eine mögliche Ursache der Neurotoxizität ist die erhöhte Durchlässigkeit von Membranen, die durch mutiertes Dyn A ausgelöst wird und möglicherweise zu einem erhöhten Kalziumeinstrom führt. Dabei korreliert die Membrandurchlässigkeit der verschiedenen Mutationen mit dem Grad der Neurotoxizität (Madani et al., 2011). Außerdem konnte die Arbeitsgruppe um Watanabe in einem Tiermodell zeigen, dass bei der intrathekalen Injektion von mutierten Dyn A-Peptiden nicht-opioide nozizeptive Effekte deutlich stärker auftraten als bei der Injektion von Wildtyp-Dyn A-Peptiden. Diese Effekte, die unter anderem durch NMDA-Rezeptoren vermittelt werden, können ein weiterer Faktor für die Entwicklung einer spinocerebellären Ataxie sein (Watanabe et al., 2012).

Anhand einer Proteomanalyse konnten Bakalkin und Mitarbeiter außerdem zeigen, dass die Genexpression bei SCA23-Patienten verändert ist. Insbesondere Enzyme des Glutamatzyklus und Proteine, die an der Neuroprotektion, Apoptose und

Signaltransduktion beteiligt sind, werden verglichen mit gesunden Probanden über- oder unterexprimiert. Diese Veränderungen der Genexpression können ebenfalls zur Pathogenese beitragen. Die Proteine EAAT4 und Calbindin, die auch bei der SCA1 und der SCA5 unterexprimiert werden, werden auch bei SCA23-Patienten weniger gebildet (Bakalkin et al., 2010).

Derartige gemeinsame pathogene Wirkmechanismen sind wichtig, um effiziente Therapien entwickeln zu können, mit denen mehrere Subtypen der spinocerebellären Ataxie behandelt werden können. Da es sich bei den spinocerebellären Ataxien um eine sehr heterogene Gruppe von Erkrankungen handelt, für die zahlreiche Mutationen in verschiedenen Genen als Auslöser bekannt sind, sind von den jeweiligen Mutationen nur wenige Patienten betroffen. Als mögliche Therapieoptionen kommen die konventionelle Pharmakotherapie, Gentherapie oder die „Stilllegung“ von mutierten Genen mittels RNA Interferenz (RNAi) in Betracht (Ramachandran et al., 2013).

Erste Schritte in Richtung einer die verschiedenen Subtypen übergreifenden Therapie sind Kenntnisse über gemeinsame Pathomechanismen der spinocerebellären Ataxien. So führen Mutationen in funktionell sehr unterschiedlichen Proteinen häufig zu einer Aggregation der fehlgefalteten Proteine, zu einer Dysregulation der Transkription, RNA-Toxizität oder Veränderungen der synaptischen Übertragung (Smeets et al., 2014). Es finden sich beispielsweise bei den auf CAG-Trinukleotidexpansionen beruhenden Ataxien SCA1, SCA3 und SCA7 intranukleäre Inklusionen, während bei der SCA2 und SCA6 zytoplasmatische Inklusionen vorliegen (Seidel et al., 2012). Auch bei der SCA11, die durch Deletionen, Insertionen oder Punktmutationen im *TTBK2*-Gen verursacht wird, wurden Inklusionen gefunden (Houlden et al., 2007). Der zu Grunde liegende pathologische Prozess dieser Inklusionen ist noch nicht ausreichend geklärt. Es werden unterschiedliche Theorien diskutiert, die von einer direkten Toxizität durch die Inklusionen, einer Verhinderung des axonalen Transports, einer Bindung von Transkriptionsfaktoren oder einer Inhibition der zellulären Qualitätskontrolle von Proteinen ausgehen (Seidel et al., 2012). Dennoch stellen die Inklusionen einen Ansatzpunkt für eine mögliche gemeinsame Therapie dieser SCA-Subtypen dar. So gibt es bereits Ansätze die endogenen Chaperone zu induzieren, um intrazelluläre Inklusionen zu vermindern (Nagai et al., 2010).

Ein weiterer vielversprechender Therapieansatz ist die RNA Interferenz (RNAi). Bei der RNAi kann mittels Injektion einer spezifischen doppelsträngigen RNA die Expression bestimmter Gene unterdrückt werden. Die injizierte RNA bindet spezifisch an die mRNA und verhindert so die Translation des Gens (Fire et al., 1998). Xia und Mitarbeitern gelang es in einem SCA1-Mausmodell mittels RNAi die Expression des mutierten *Ataxin-1*-Gens zu supprimieren, wodurch die Bewegungskoordination der Mäuse signifikant verbessert wurde und weniger Inklusionen vorhanden waren (Xia et al., 2004). Für die Entwicklung solcher Therapieverfahren sind Kenntnisse über die mutierten Gene und die zugrunde liegende Pathogenese unabdingbar.

4.4. Molekulare Testung auf SCA23

Bevor Patienten auf das Vorliegen einer spinocerebellären Ataxie getestet werden, sollte anhand der Familienanamnese festgestellt worden sein, dass es sich um einen autosomal dominanten Erbgang handelt. Eine autosomal dominant vererbte Ataxie liegt sehr wahrscheinlich vor, wenn in der Elterngeneration eine ähnliche Krankheit vorliegt (Durr, 2010). Auch sporadisch auftretenden Ataxien kann eine SCA zugrunde liegen. Die häufigste Form von SCAs bei sporadischen Fällen ist die SCA6 (Klockgether, 2012).

Handelt es sich um eine autosomal dominant vererbte Ataxie, sollte eine Stufendiagnostik erfolgen, bei der zuerst die häufigsten Subtypen einer SCA getestet werden. Die vier häufigsten Subtypen in Deutschland sind die SCA1, SCA2, SCA3 und SCA6, die etwa 80 % aller SCAs ausmachen (Schöls et al., 2004). Sind die Untersuchungen auf die häufigen SCA-Subtypen negativ, kann die Diagnostik erweitert werden. Um das weitere Vorgehen festzulegen, sollte das Vorhandensein bestimmter klinischer Symptome berücksichtigt werden. Findet sich zusätzlich zur Ataxie ein Visusverlust, ist häufig eine SCA7 ursächlich. Bei kognitiven und psychiatrischen Störungen sowie bei Chorea liegt häufig eine SCA17 vor. Die SCA12 geht mit einem prominenten Aktionstremor einher und bei der SCA10 kann es zu epileptischen Anfällen kommen. Beginnt die Erkrankung bereits vor dem 25. Lebensjahr, sollten eine SCA13, SCA27 und SCA28 in Betracht gezogen werden. Auch geographisch-ethnische

Häufungen sollten berücksichtigt werden. So kommt in den Niederlanden und in Südafrika die SCA7 gehäuft vor. In Schottland und Finnland wird ein gehäuftes Auftreten der SCA8 beobachtet. In Mexiko und Brasilien ist die SCA10 besonders häufig. In Indien findet sich sehr oft die SCA12 und in Japan tritt die SCA31 gehäuft auf. Die wichtigsten Subtypen der selteneren SCAs in Deutschland sind die SCA5, SCA14, SCA15, SCA17 und SCA28 (Klockgether, 2012). Hat ein Patient eine positive Familienanamnese für einen bekannten SCA-Subtyp, wird dieser zuerst getestet (Bird, 2012).

Diese Arbeit unterstützt die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, dass die SCA23 durch Mutationen im *PDYN*-Gen eine seltene Ursache für die spinozerebelläre Ataxie ist, auch wenn häufige Ursachen einer spinozerebellären Ataxie bereits ausgeschlossen wurden (Bakalkin et al., 2010, Schicks et al., 2011, Fogel et al., 2012, Liu et al., 2012, Fawcett et al., 2012). Da es sich bei dem *Prodynorphin*-Gen um ein kleines Gen mit nur zwei codierenden Exons handelt und die Sequenzierung in diesem Fall nicht sehr teuer ist, wäre eine Testung auf SCA23 bei Patienten, bei denen die oben genannten Tests negativ waren, möglich. Da eine SCA23 auch bei sporadisch aufgetretenen SCA-Fällen diagnostiziert wurde (Bakalkin et al., 2010, Fogel et al., 2012, Fawcett et al., 2012), sollte eine positive Familienanamnese nicht zwingend erforderlich sein. Um weitere Kenntnisse über die Bedeutung und ursächliche Mutationen der SCA23 zu gewinnen, ist es erforderlich, weitere Ataxie-Patienten auf Mutationen im *PDYN*-Gen zu untersuchen.

4.4.1 Problematik der molekularen Testung

Da die Phänotypen der unterschiedlichen SCA-Subtypen sehr unspezifisch sind, ist eine exakte Diagnose nur mittels molekulargenetischer Testung möglich. Genetische Testungen müssen im Rahmen des Gendiagnostikgesetzes (GenDG, <http://www.gesetze-im-internet.de/gendg/index.html>) stattfinden. Ein wichtiger Punkt dieses Gesetzes ist das Recht auf informationelle Selbstbestimmung. Das heißt, der Patient hat sowohl das Recht, seine genetischen Befunde zu kennen als auch ein Recht auf Unwissen. Da es sich bei den dominant vererbten spinozerebellären Ataxien um

progrediente, degenerative Erkrankungen handelt, die nicht kausal behandelt werden können, ist eine gründliche Aufklärung des Patienten über die möglichen Folgen der Diagnostik unabdingbar.

Bei der molekulargenetischen Testung auf eine spinozerebelläre Ataxie muss immer bedacht werden, dass ein negativer Test nicht die Erkrankung an sich ausschließt, sondern nur den untersuchten Subtypen als Ursache für die Erkrankung ausschließen kann. Es werden stetig neue Gene und Mutationen für spinozerebelläre Ataxien beschrieben, sodass die Patienten auch an SCA-Subtypen erkrankt sein können, deren Genlocus noch nicht entdeckt wurde.

4.5. Ausblick

Bei einem Teil der SCA-Patienten ist die Ursache für ihre Erkrankung noch immer nicht gefunden worden. So werden in Zukunft sicherlich weitere SCA-Loci entdeckt werden, sodass die molekulare Testung zukünftig noch aufwendiger wird. Möglicherweise wird die Diagnostik der durch Punktmutationen bedingten SCAs dann nur noch über Arrays geleistet werden können.

Eine kausale Therapie für die spinozerebellären Ataxien gibt es zurzeit nicht. Auch ist es bisher nicht möglich, den Verlauf der Erkrankung zu verzögern. Um eine Therapie für die spinozerebellären Ataxien entwickeln zu können, ist es wichtig, die Pathogenese der Erkrankungen zu kennen, um mögliche Ansatzpunkte für Medikamente oder eine Gentherapie zu finden. Auch besteht die Hoffnung, über Kenntnisse der betroffenen Stoffwechselwege die unterschiedlichen Gene miteinander vernetzen zu können, um effiziente Therapien entwickeln zu können, mit denen mehrere SCA-Typen behandelt werden können. Der Mutationsnachweis ist ein erster Schritt in diese Richtung.

5. Zusammenfassung

Bei den spinozerebellären Ataxien (SCAs) handelt es sich um eine genetisch heterogene Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen, die zu einer progressiven zerebellären Ataxie - häufig in Verbindung mit weiteren neurologischen Symptomen - führen. Die spinozerebelläre Ataxie Typ 23 (SCA23) ist eine langsam progredient verlaufende Erkrankung, die autosomal dominant vererbt wird. 2010 wurden Missense-Mutationen im *Prodynorphin*-Gen (*PDYN*) als Ursache für die SCA23 identifiziert. Bisher wurden acht verschiedene Missense-Mutationen und eine Frameshift-Mutation beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wurden 40 deutsche Ataxie-Patienten mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und DNA-Sequenzierung auf Mutationen im *PDYN*-Gen untersucht. Es konnten keine Mutationen identifiziert werden, sodass das Vorliegen einer SCA23 bei den untersuchten Patienten ausgeschlossen werden konnte. Zehn Proben waren heterozygot für die Variante rs6045819 T>C und eine Probe war heterozygot für die Variante rs77155664 A>C. Beide Varianten wurden bereits beschrieben und werden als benigne eingestuft. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die SCA23 eine seltene Ursache für Ataxie bei deutschen Patienten darstellt. Dennoch sollten Patienten, bei denen andere Ursachen für eine SCA ausgeschlossen wurden, auf Mutationen im *PDYN*-Gen untersucht werden, um weitere Kenntnisse über die Bedeutung und Pathogenese der SCA23 zu gewinnen.

6. Summary

Spinocerebellar ataxias (SCAs) are a genetically heterogeneous group of neurodegenerative diseases leading to a progressive cerebellar ataxia often associated with other neurological symptoms. Spinocerebellar ataxia type 23 (SCA23) is an autosomal dominantly inherited slowly progressive disease. In 2010, missense mutations in the *prodynorphin* (*PDYN*) gene were identified as the cause of SCA23. Until now, there have been reported eight missense mutations and one frameshift mutation.

In the present survey, 40 German ataxia patients were tested for mutations in the *PDYN* gene by polymerase chain reaction (PCR) and DNA sequencing. No mutations could be identified so that SCA23 could be excluded in the patients tested. Ten samples were heterozygous for the polymorphism rs6045819 T>C and one sample was heterozygous for the polymorphism rs77155664 A>C. Both polymorphisms were already described and are classified as benign. This result suggests that SCA23 is a rare cause of ataxia in German patients. Nevertheless, patients tested negative for other causes of SCA should be examined for mutations in the *PDYN* gene to get more information about relevance and pathogenesis of SCA23.

7. Abkürzungsverzeichnis

°	Grad
'	Minute
''	Sekunde
%	Prozent
*	Stopp-Codon
A	Adenin
A	Alanin
ADCA	Autosomal-dominant vererbte Ataxie
AFG3L2	ATPase family gene 3-like 2
al.	alii
AS	Aminosäure
AT	Ataxia teleangiectasia
ATXN	Ataxin
BEAN1	Brain-expressed protein associating with Nedd4 1
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
c.	Coding DNA
C	Cystein
C	Cytosin
CACNA1A	Calcium channel voltage-dependent P/Q type alpha 1A subunit
cM	Centimorgan
D	Asparaginsäure
dATP	desoxy-Adenosintriphosphat
dbSNP	Single Nucleotide Polymorphism Database
dCTP	desoxy-Cytidintriphosphat
Dde	Desulfovibrio desulfuricans endonuclease
del	Deletion
dGTP	desoxy-Guanosintriphosphat

Abkürzungsverzeichnis

DNA	Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic acid)
DRPLA	Dentatorubrale pallidolysiale Atrophie
dTTP	desoxy-Thymidintriphosphat
Dyn	Dynorphin
E	Glutaminsäure
EA	Episodische Ataxie
EAAT4	Excitatory amino-acid transporter 4
EBI	European Bioinformatics Institute
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEF2	Eukaryotic elongation factor 2
ENSP	Ensembl protein
ENST	Ensembl transcript
Ex	Exon
Exo-SAP	Exonuklease-Shrimp Alkaline Phosphatase
F-Primer	Forward-Primer
F	Phenylalanin
FGF14	Fibroblast growth factor 14
FL	Full length mRNA
FRDA	Friedreich Ataxie
fs	Frameshift
g.	genomisch (genomic)
g	Gramm
G	Glycin
G	Guanin
GenDG	Gendiagnostikgesetz
H	Histidin
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure (Chlorwasserstoffsäure)
I	Isoleucin
ID	Identity
ITPR1	Inositol 1,4,5-triphosphate receptor 1
kb	Kilo-Basenpaare
KCNC3	Potassium voltage-gated channel subfamily C member 3

Abkürzungsverzeichnis

KCND3	Potassium voltage-gated channel subfamily D member 3
L	Leucin
Lok.	Lokalisation
M	Methionin
M	Molarität
mA	Milliampere
MAF	Minor allele frequency
Mb	Mega-Basenpaare
ml	Milliliter
mM	Millimolarität
mRNA	messenger RNA
N	Asparagin
NCBI	National Center for biotechnology information
neo	Neoendorphin
NHGRI	National Human Genome Research Institute
NHLBI	National Heart, Lung and Blood Institute
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NOP56	Nucleolar protein 5A
P	Prolin
p.	Protein
p	Wildtypallel
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase-Chain-Reaction)
PDYN	Prodynorphin
pH	Potentia hydrogenii
PPP2R2B	Protein Phosphatase 2 Regulatory Subunit B Beta
pq	Heterozygotie
PRKCG	Protein Kinase C Gamma
pUC	Plasmid University of California
Q	Glutamin
q	Variantenallel
R	Arginin
R-Primer	Reverse-Primer

Abkürzungsverzeichnis

RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid)
RNAi	RNA Interferenz
rpm	Rotationen pro Minute
rs	reference SNP ID number
s	Sekunden
S	Serin
SCA	Spinozerebelläre Ataxie
Sep	September
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SPTBN2	Spectrin beta non-erythrocytic 2
ss	submitted SNP ID number
T	Threonin
T	Thymin
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBP	TATA-binding protein
TGM6	Transglutaminase 6
TTBK2	Tau-tubulin kinase 2
USA	Vereinigte Staaten von Amerika (United States of America)
UTR	untranslatierte Region (untranslated region)
UV	Ultraviolettstrahlung
V	Valin
W	Tryptophan
WTSI	Wellcome Trust Sanger Institute
X	Stopp-Codon
Y	Tyrosin
ZNS	zentrales Nervensystem
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

8. Abbildungsverzeichnis

1. Abbildung 1.1: Verteilung der spinozerebellären Ataxien
2. Abbildung 1.2: Transkription, Translation und Prozessierung von *PDYN*
3. Abbildung 2.1: Ablauf einer PCR
4. Abbildung 2.2: Analytisches Gel
5. Abbildung 2.3: Präparatives Gel
6. Abbildung 2.4: Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden
7. Abbildung 2.5: Exemplarisches Elektropherogramm (Ausschnitt)
8. Abbildung 3.1: Ausschnitt aus der Sequenzanalyse von Exon 4 des *PDYN*-Gens
der DNA-Probe 269.1
9. Abbildung 3.2: Ausschnitt aus der Sequenzanalyse von Exon 4 des *PDYN*-Gens
der DNA-Probe 287.1
10. Abbildung 3.3: Ausschnitt aus der Sequenzanalyse von Exon 4 des *PDYN*-Gens
der DNA-Probe 978.1

9. Tabellenverzeichnis

1. Tabelle 1.1: SCA-Typen: Lokalisation, Gen und Mutationsmechanismus
2. Tabelle 1.2: Klinischer Phänotyp der spinozerebellären Ataxien
3. Tabelle 1.3: Klinik der unterschiedlichen Mutationen der SCA23
4. Tabelle 2.1: Geräte
5. Tabelle 2.2: Chemikalien
6. Tabelle 2.3: Kits
7. Tabelle 2.4: Enzyme
8. Tabelle 2.5: Primer zur Amplifikation der *PDYN*-Exons
9. Tabelle 2.6: Verbrauchsmaterialien
10. Tabelle 2.7: Computerprogramme
11. Tabelle 2.8: PCR-Amplifizierung der *PDYN*-Exons
12. Tabelle 2.9: Pipettierschema für den Mastermix für 4 Proben
13. Tabelle 2.10: Pipettierschema für die Didesoxy-Sequenzierung
14. Tabelle 2.11: Sequenzier-Bedingungen der *PDYN*-Exons
15. Tabelle 3.1: Bekannte SNPs in Exon 1 des *PDYN*-Gens
16. Tabelle 3.2: Bekannte SNPs in Exon 2 des *PDYN*-Gens
17. Tabelle 3.3: Proteincodierende Transkriptvarianten des *PDYN*-Gens
18. Tabelle 3.4: Bekannte SNPs in Exon 3 des *PDYN*-Gens
19. Tabelle 3.5: Bekannte SNPs in Exon 4 des *PDYN*-Gens
20. Tabelle 3.6: Bekannte pathogene Mutationen im *PDYN*-Gen

10. Literaturverzeichnis

1. 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, Handsaker RE, Kang HM, Marth GT, McVean GA et al.(2012): An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 491(7422): 56-65.
2. Akil H, Watson SJ, Young E, Lewis ME, Khachaturian H, Walker JM (1984): Endogenous opioids: biology and function. *Annu. Rev. Neurosci.* 7: 223-55.
3. Bakalkin G, Watanabe H, Jezierska J, Depoorter C, Verschuuren-Bemelmans C, Bazov I, Artemenko KA, Yakovleva T, Dooijes D, Van de Warrenburg BPC, Zubarev RA, Kremer B, Knapp PE, Hauser KF, Wijmenga C, Nyberg F, Sinke RJ, Verbeek DS (2010): Prodynorphin mutations cause the neurodegenerative disorder spinocerebellar ataxia type 23. *Am. J. Hum. Genet.* 87(5): 593-603.
4. Bell, J (2008): A Simple Way to Treat PCR Products Prior to Sequencing Using ExoSAP-IT. *Bio Techniques* 44(6): 834.
5. Bird TD (1998, überarbeitet 2012): Hereditary Ataxia Overview. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH et al., editors: *Gene Reviews (Internet)*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle. 1993-2014.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1138/>
6. Brown T A (2006): *Gene Cloning and DNA Analysis – An Introduction*. 5th Edition. Blackwell Science Ltd.
7. Cannarozzi G, Schraudolph NN, Faty M, von Rohr P, Friberg MT, Roth AC, Gonnet P, Barral Y (2010): A role for codon order in translation dynamics. *Cell* 141(2): 355-67.
8. Chien A, Edgar DB, Trela JM (1976): Dioxynucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bacteriol.* 127(3): 1550-1557.
9. Clarke TK, Ambrose-Lanci L, Ferraro TN, Berrettini WH, Kampman KM, Dackis CA, Pettinati HM, O'Brien CP, Oslin DW, Lohoff FW (2012): Genetic association analyses of PDYN polymorphisms with heroin and cocaine addiction. *Genes Brain Behav.* 11(4): 415-23.

10. Delplanque J, Devos D, Huin V, Genet A, Sand O, Moreau C, Goizet C, Charles P, Anheim M, Monin ML, Buée L, Destée A, Grolez G, Delmaire C, Dujardin K, Dellacherie D, Brice A, Stevanin G, Strubi-Vuillaume I, Dürr A, Sablonnière B (2014): TMEM240 mutations cause spinocerebellar ataxia 21 with mental retardation and severe cognitive impairment. *Brain* 137(Pt 10): 2657-63.
11. Di Gregorio E, Borroni B, Giorgio E, Lacerenza D, Ferrero M, Lo Buono N, Ragusa N, Mancini C, Gaussen M, Calcia A, Mitro N, Hoxha E, Mura I, Coviello DA, Moon YA, Tesson C, Vaula G, Couarch P, Orsi L, Duregon E, Papotti MG, Deleuze JF, Imbert J, Costanzi C, Padovani A, Giunti P, Mailliet-Vioud M, Durr A, Brice A, Tempia F, Funaro A, Boccone L, Caruso D, Stevanin G, Brusco A (2014): ELOVL5 mutations cause spinocerebellar ataxia 38. *Am. J. Hum. Genet.* 95(2): 209-17.
12. Dueñas AM, Goold R, Giunti P (2006): Molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxias. *Brain* 129: 1357-70.
13. Durr A (2010): Autosomal dominant cerebellar ataxias: polyglutamine expansions and beyond. *Lancet Neurol.* 9: 885-94.
14. Fawcett K, Mehrabian M, Liu YT, Hamed S, Elahi E, Revesz T, Koutsis G, Herscheson J, Schottlaender L, Wardle M, Morrison PJ, Morris HR, Giunti P, Wood N, Houlden H (2012): The frequency of spinocerebellar ataxia type 23 in a UK population. *J. Neurol.* 260(3): 856-9.
15. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998): Potent and specific interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391(6669): 806-11.
16. Flicek P, Amode MR, Barrell D, Beal K, Brent S, Chen Y, Clapham P et al. (2011): Ensembl 2011. *Nucleic Acids Res.* 39: 800-6.
17. Fogel BL, Lee JY, Lane J, Wahnich A, Chan S, Huang A, Osborn GE, Klein E, Mamah C, Perlman S, Geschwind DH, Coppola G (2012): Mutations in rare ataxia genes are uncommon causes of sporadic cerebellar ataxia. *Mov. Disord.* 27(3): 442-6.
18. Fredrick K, Ibba M (2010): How the sequence of a gene can tune its translation. *Cell* 141 (2): 227-9.

19. Harding AE (1982): The clinical features and classification of the late onset autosomal dominant cerebellar ataxias. A study of 11 families, including descendants of 'the drew family of Walworth'. Brain 105: 1-28.
20. Hauser KF, Aldrich JV, Anderson KJ, Bakalkin G, Christie MJ, Hall ED, Knapp PE, Scheff SW, Singh IN, Vissel B, Woods AS, Yakovleva T, Shippenberg TS (2005): Pathobiology of dynorphins in trauma and disease. Front Biosci. 10: 216-35.
21. Hauser KF, Foldes JK, Turbek CS (1999): Dynorphin A (1-13) neurotoxicity in vitro: opioid and non-opioid mechanisms in mouse spinal cord neurons. Exp. Neurol. 160(2): 361-75.
22. Houlden H, Johnson J, Gardner-Thorpe C, Lashley T, Hernandez D, Worth P, Singleton AB, Hilton DA, Holton J, Revesz T, Davis MB, Giunti P, Wood NW (2007): Mutations in TTBK2, encoding a kinase implicated in tau phosphorylation, segregate with spinocerebellar ataxia type 11. Nat. Genet. 39(12): 1434-6.
23. Hugonin L, Vukojevic V, Bakalkin G, Gräslund A (2006): Membrane leakage induced by dynorphins. FEBS Lett. 580(13): 3201-5.
24. Hugonin L, Vukojevic V, Bakalkin G, Gräslund A (2008): Calcium influx into phospholipid vesicles caused by dynorphin neuropeptides. Biochem. Biophys. Acta 1778(5): 1267-73.
25. Jakobi H, Minnerop M, Klockgether T (2013): Genetik der spinocerebellären Ataxien. Nervenarzt 84: 137-142.
26. Jayadev S, Bird TD (2013): Hereditary ataxias: overview. Genet. Med. 15(9): 673-83.
27. Jezierska J, Stevanin G, Watanabe H, Fokkens MR, Zagnoli F, Kok J, Goas J-Y, Bertrand P, Robin C, Brice A, Bakalkin G, Durr A, Verbeek DS (2013): Identification and characterization of novel *PDYN* mutations in dominant cerebellar ataxia cases. J. Neurol. 260(7): 1807-12.
28. Klockgether T (2012): Ataxien des Erwachsenenalters. In: Diener HD, Weimar C (2012): Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Herausgegeben von der Kommission „Leitlinien“ der Deutschen Gesellschaft für Neurologie. Thieme Verlag, Stuttgart.

29. Klockgether T (2008): The clinical diagnosis of autosomal dominant spinocerebellar ataxias. *Cerebellum* 7(2): 101-5.
30. Klockgether T, Paulson H (2011): Milestones in Ataxia. *Mov. Disord.* 26(6): 1134-41.
31. Knoll AT, Carlezon WA (2010): Dynorphin, stress, and depression. *Brain Res.* 1314: 56-73.
32. Knoop V, Müller K (2006): *Gene und Stammbäume – Ein Handbuch zur molekularen Phylogenetik.* Elsevier GmbH, München.
33. Kölsch H, Wagner M, Bilkei-Gorzó A, Toliat MR, Pentzek M, Fuchs A, Kaduszkiewicz H, van den Bussche H, Riedel-Heller SG, Angermeyer MC, Weyerer S, Werle J, Bickel H, Mösch E, Wiese B, Daerr M, Jessen F, Maier W, Dichgans M (2009): Gene polymorphisms in prodynorphin (PDYN) are associated with episodic memory in the elderly. *J. Neurol. Transm.* 116(7): 897-903.
34. Lim J, Hao T, Shaw C, Patel AJ, Szabo G, Rual JF, Fisk CJ, Li N, Smolyar A, Hill DE, Barabási AL, Vidal M, Zoghbi HY (2006): A protein-protein interaction network for human inherited ataxias and disorders of Purkinje cell degeneration. *Cell* 125(4): 801-14.
35. Liu YT, Tang BS, Wang JL, Guan WJ, Shen L, Shi YT, Zhou Y, Yan XX, Xia K, Jiang H (2012): Spinocerebellar ataxia type 23 is an uncommon SCA subtype in the Chinese Han population. *Neurosci. Lett.* 528(1): 51-4.
36. Loacker S, Sayyah M, Wittmann W, Herzog H, Schwarzer C (2007): Endogenous dynorphin in epileptogenesis and epilepsy: anticonvulsant net effect via kappa opioid receptors. *Brain* 130(Pt 4): 1017-28.
37. Löffler G, Petrides P (2006): *Biochemie und Pathobiochemie.* 8. Auflage. Springer, Heidelberg.
38. Madani F, Taqi MM, Wärmländer SK, Verbeek DS, Bakalkin G, Gräslund A (2011): Perturbations of model membranes induced by pathogenic dynorphin A mutants causing neurodegeneration in human brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 411(1): 111-4.
39. Manto M U (2005): The wide spectrum of spinocerebellar ataxias (SCAs). *Cerebellum* 4: 2-6.

40. Maston GA, Evans SK, Green MR (2006): Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 7:29-59.
41. Matilla-Dueñas A, Ashizawa T, Brice A, Maqri S, McFarland KN, Pandolfo M, Pulst SM, Riess O, Rubinsztein DC, Schmidt J, Schmidt T, Scoles DR, Stevanin G, Taroni F, Underwood BR, Sánchez I (2014): Consensus paper: pathological mechanisms underlying neurodegeneration in spinocerebellar ataxias. *Cerebellum* 13(2): 269-302.
42. Mc Pherson MJ, Møller SG (2006): PCR. Second edition. Taylor and Francis Group, New York.
43. Nagai Y, Fujikake N, Popiel HA, Wada K (2010): Induction of molecular chaperones as a therapeutic strategy for the polyglutamine diseases. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 11(2): 188-97.
44. Nikoshkov A, Hurd YL, Yakovleva T, Bazov I, Marinova Z, Cebers G, Pasikova N, Gharibyan A, Terenius L, Bakalkin G (2005): Prodynorphin transcripts and proteins differentially expressed and regulated in the adult human brain. *FASEB J.* 19(11): 1543-5.
45. Nolte D, Landendinger M, Schmitt E, Müller U (2007): Spinocerebellar ataxia 14: novel mutation in exon 2 of PRKCG in a German family. *Mov. Disord.* 22: 265-7.
46. Nolte D, Müller U (2006): Punktmutationen und Deletionen bei spinocerebellären Ataxien. *Neuroforum* 4:260-5.
47. Novoa EM, Ribas de Pouplana L (2012): Speeding with control: codon usage, tRNA, and ribosomes. *Trends Genet.* 28(11): 574-81.
48. Orr HT (2012): Cell biology of spinocerebellar ataxia. *J. Cell Biol.* 197(2): 167-77.
49. Paulson HL (2009): The Spinocerebellar Ataxias. *J. Neuroophthalmol.* 29(3): 227-37.
50. Pingoud A., Urbanke C., Hoggett J., Jeltsch A (2002): *Biochemical Methods – A Concise Guide for Students and Researchers.* Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.
51. Ramachandran PV, Ignacimuthu S (2013): RNA interference – a silent but an effective therapeutic tool. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 169: 1774-89.

52. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R (2008): Biochemie. 2., aktualisierte Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
53. Rossi M, Perez-Lloret S, Doldan L, Cerquetti D, Balej J, Millar Verneti P, Hawkes H, Cammarota A, Merello M (2014): Autosomal dominant spinocerebellar ataxias: a systemic review of clinical features. *Eur. J. Neurol.* 21(4): 607-15.
54. Ruano L, Melo C, Silva MC, Coutinho P (2014): The global epidemiology of hereditary ataxia and spastic paraplegia: a systematic review of prevalence studies. *Neuroepidemiology* 42(3): 174-83.
55. Rüb U, Schöls L, Paulson H, Auburger G, Kermer P, Jen JC, Seidel K, Korf HW, Deller T (2013): Clinical features, neurogenetics und neuropathology of the polyglutamine spinocerebellar ataxias type 1, 2, 3, 6 and 7. *Prog. Neurobiol.* 104: 38-66.
56. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf S J, Higuchi R, Horn G T, Mullis KB, Erlich HA (1988): Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* 239: 487-91.
57. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biochemnistry* 74(12): 5463-7.
58. Schaaf J, Zschocke CP (2008): Basiswissen Humangenetik. Springer Medizin Verlag, Heidelberg.
59. Schicks J, Synofzik M, Beetz C, Schiele F, Schöls L (2011): Mutations in the PDYN gene (SCA23) are not a frequent cause of dominant ataxia in Central Europe. *Clin. Genet.* 80: 503-4.
60. Schöls L, Bauer P, Schmidt T, Schulte T, Riess O (2004): Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurol.* 3: 291-304.
61. Schwarzer C (2009): 30 Years of Dynorphins – New Insights on their Function in Neuropsychiatric Diseases. *Pharmacol. Ther.* 123(3): 353-70.
62. Seidel K, Siswanto S, Brunt ERP, Dunnen den W, Korf HW, Rüb U (2012): Brain pathology of spinocerebellar ataxias. *Acta Neuropathol.* 124: 1-21.

63. Serrano-Munuera C, Corral-Juan M, Stevanin G, San Nicolás H, Roig C, Corral J, Campos B, de Jorge L, Morcillo-Suárez C, Navarro A, Forlani S, Durr A, Kulisevsky J, Brice A, Sánchez I, Volpini V, Matilla-Dueñas A (2013): New Subtype of spinocerebellar ataxia with altered vertical eye movements mapping to chromosome 1p32. *JAMA Neurol.* 70(6): 764-71.
64. Shakkottai VG, Fogel BL (2013): Clinical neurogenetics: autosomal dominant spinocerebellar ataxia. *Neurol. Clin.* 31(4): 987-1007.
65. Sherry ST, Ward M, Sirotkin K (1999): dbSNP – Database for Single Nucleotide Polymorphisms and Other Classes of Minor Genetic Variation. *Genome Res.* 9: 677-9.
66. Sherwood TW, Askwith CC (2009): Dynorphin opioid peptides enhance acid-sensing ion channel 1a activity and acidosis-induced neuronal death. *J. Neurosci.* 29(45): 14371-80.
67. Slatko BE, Albright LM, Tabor S, Ju J (2001): DNA Sequencing by the Dideoxy Method. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* Chapter7: Unit7.4A.
68. Smeets CJ, Verbeek DS (2014): Cerebellar ataxia and functional genomics: Identifying the routes to cerebellar neurodegeneration. *Biochem. Biophys. Acta* 1842(10): 2030-8.
69. Stern C (1943): The Hardy-Weinberg law. *Science* 97(2510): 137-8.
70. Taqi MM, Bazov I, Watanabe H, Sheedy D, Harper C, Alkass K, Druid H, Wentzel P, Nyberg F, Yakovleva T, Bakalkin G (2011): Prodynorphin CpG-SNPs associated with alcohol dependence: elevated methylation in the brain of human alcoholics. *Addict. Biol.* 16(3): 499-509.
71. Taroni F, DiDonato S (2004): Pathways to motor incoordination: the inherited ataxias. *Nat. Rev. Neurosci.* 5(8): 641-55.
72. Teive HA (2009): Spinocerebellar Ataxias. *Arq. Neuropsiquiatr.* 67(4): 1133-42.
73. Verbeek DS (2009): Spinocerebellar Ataxia Type 23: A genetic update. *Cerebellum* 8: 104-7.
74. Verbeek DS, van de Warrenburg BPC (2011): Genetics of the Dominant Ataxias. *Semin. Neurol.* 31(5): 461-9.
75. Verbeek DS, van de Warrenburg BP, Wesseling P, Pearson PL, Kremer HP, Sinke RJ (2004): Mapping of the SCA23 locus involved in autosomal dominant cerebellar ataxia to chromosome region 20p13-12.3. *Brain* 127: 2551-7.

76. Watanabe H, Mizoguchi H, Verbeeke DS, Kuzmin A, Nyberg F, Krishtal O, Sakurada S, Bakalkin G (2012): Non-opioid nociceptive activity of human dynorphin mutants that cause neurodegenerative disorder spinocerebellar ataxia type 23. *Peptides* 35(2): 306-10.
77. Wheeler DL, Barrett T, Benson DA, Bryant SH, Canese K, Chetvernin V et al. (2007): Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res.* 35: D5-D12.
78. Xia H, Mao Q, Eliason SL, Harper SQ, Martins IH, Orr HT, Paulson HL, Yang L, Kotin RM, Davidson BL (2004): RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. *Nat. Med.* 10(8): 816-20.
79. <http://www.1000genomes.org>
80. <http://www.1000genomes.org/about> Stand 11.12.2012, Stand 10.12.2014
81. <http://www.ensembl.org>
82. <http://www.ensembl.info/about/> Stand 29.11.2012
83. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>
84. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/docs/rs_attributes.html
85. <http://www.uniprot.org>

11. Ehrenwörtliche Erklärung zur Dissertation:

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

Ort, Datum

Unterschrift

12. Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Müller für die Bereitstellung des Laborarbeitsplatzes und der Materialien bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. rer. nat. Dagmar Nolte für die Vergabe des Themas und die engagierte Betreuung. Sie stand mir während der Erstellung der Arbeit immer mit Rat und Tat zur Seite und hatte stets ein offenes Ohr. Vielen Dank für die interessanten und konstruktiven Gespräche.

Ich möchte mich bei den Mitarbeitern des humangenetischen Labors für die stete Hilfsbereitschaft bedanken. Dieser Dank gilt insbesondere Frau Sylvia Stanek für die vielen Hilfestellungen und guten Ratschläge.

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