

Aus dem Department für Diagnostische Labormedizin der  
Universität Tübingen

Institut für Medizinische Genetik und angewandte Genomik

**Untersuchung des Einflusses von Polymorphismen als  
modifizierender Faktor  
der Spinozerebellären Ataxie Typ 3**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhardt Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Dieterle, Miriam Christina**

**2020**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler  
1. Berichterstatter: Professor Dr. O. Rieß  
2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Willmann  
  
Tag der Disputation: 09.10.2019

Für meine Eltern und meine Geschwister,  
die mich immer unterstützt haben.

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	6
Tabellenverzeichnis.....	8
Formelverzeichnis .....	10
Abkürzungsverzeichnis .....	11
1. Einleitung.....	12
1.1 Spinozerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3).....	12
1.2 Nukleozytoplasmatischer Transport.....	19
1.3 Fragestellung .....	20
2. Material und Methoden.....	22
2.1 Material .....	22
2.1.1 Chemikalien .....	22
2.1.2 Kits.....	23
2.1.3 Puffer .....	23
2.1.4 Verbrauchsmaterialien .....	23
2.1.5 Geräte.....	24
2.1.6 Softwares.....	24
2.1.7 DNA Proben.....	25
2.1.8 Oligonukleotide .....	25
2.2 Methoden .....	27
2.2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion .....	27
2.2.2 Primer- und Sondendesign .....	29
2.2.3 High-Resolution Melting (HRM) .....	31
2.2.4 Sanger-Sequenzierung.....	36
2.2.5 Statistische Auswertung.....	42

3. Ergebnisse .....	44
3.1 Etablieren von Typisierungsassays.....	45
3.1.1 Etablierung eines Typisierungsassays für den SNP rs713982 im <i>Ran-binding-Protein-1</i> -Gen ( <i>RANBP1</i> ).....	47
3.1.2 Etablierung eines Typisierungsassays für den SNP rs12809335 im <i>Importin-8</i> -Gen ( <i>IPO8</i> ) .....	50
3.1.3 Etablierung eines Typisierungsassays für den SNP rs62084683 im <i>Karyopherin-<math>\alpha</math>2</i> -Gen ( <i>KPNA2</i> ) .....	53
3.1.4 Etablierung eines Typisierungsassays für den SNP rs7146310 im <i>Importin-4</i> -Gen ( <i>IPO4</i> ) .....	56
3.1.5 Etablierung eines Typisierungsassays für den SNP rs4794016 im <i>Karyopherin-<math>\beta</math>1</i> Gen ( <i>KPNB1</i> ) .....	61
3.1.6 Etablierung eines Typisierungsassays für den SNP rs34647 im <i>Transportin-1</i> -Gen ( <i>TNPO1</i> ) .....	66
3.2 Einfluss des SNP rs2426109 im <i>Chromosome-Segregation-1-like</i> -Gen ( <i>CSE1L</i> ) auf das Erkrankungsalter von SCA3-Patienten .....	70
3.2.1 Etablierung eines Typisierungsassays für den SNP rs2426109 im <i>CSE1L</i> -Gen .....	71
3.2.2 Schmelzkurvenanalyse und Genotypisierung für den SNP rs2426109 im <i>CSE1L</i> -Gen.....	72
3.2.3 Einfluss der Genotypen von rs2426109 im <i>CSE1L</i> -Gen auf das Erkrankungsalter von SCA3-Patienten .....	76
3.3 Einfluss des SNP rs11618521 im <i>Karyopherin-<math>\alpha</math>3</i> -Gen ( <i>KPNA3</i> ) auf das Erkrankungsalter von SCA3-Patienten.....	81
3.3.1 Etablierung eines Typisierungsassays für den SNP rs11618521 im <i>KPNA3</i> -Gen .....	82
3.3.2 Schmelzkurvenanalyse und Genotypisierung für den SNP rs11618521 im <i>KPNA3</i> -Gen .....	83
3.3.3 Einfluss der Genotypen von rs11618521 im <i>KPNA3</i> -Gen auf das Erkrankungsalter von SCA3-Patienten .....	85
3.4 Zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse.....	90

4. Diskussion .....	91
4.1 Auswahl der Gene und Einzelnukleotidpolymorphismen .....	93
4.2 Stärken und Schwächen der angewandten Methoden .....	95
4.3 Rs2426109 im <i>Chromosome-Segregation-1-like-Gen (CSE1L)</i> .....	99
4.4 Rs11618521 im <i>Karyopherin-<math>\alpha</math>3-Gen (KPNA3)</i> .....	102
5. Zusammenfassung .....	106
6. Literaturverzeichnis .....	107
6.1 Internetquellen .....	120
7. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift .....	122
Danksagung.....	123

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Zusammenhang zwischen Erkrankungsalter und CAG-Repeatanzahl .	17
Abb. 2 Etablieren eines Typisierungsassays für den SNP rs713982 im Gen <i>RANBP1</i> .....	49
Abb. 3 Etablieren eines Typisierungsassays für den SNP rs12809335 im Gen <i>IPO8</i> .....	51
Abb. 4 Schematische Darstellung der ausgewählten Primer zur Etablierung eines Typisierungsassays für den SNP rs62084683 im Gen <i>KPNA2</i> .....	54
Abb. 5 Etablieren eines Typisierungsassays für den SNP rs62084683 im Gen <i>KPNA2</i> . .....	55
Abb. 6 Etablieren eines Typisierungsassays für den SNP rs7146310 im Gen <i>IPO4</i> .....	57
Abb. 7 Genotypisierung des Patientenkollektivs für den SNP rs7146310 im Gen <i>IPO4</i> .....	58
Abb. 8 Schematische Darstellung der Sonde R913 zur Genotypisierung der Patientenproben für den SNP rs7146310 im Gen <i>IPO4</i> .....	59
Abb. 9 Anwendung der Sonde R913 zur Genotypisierung der Patientenproben für den SNP rs7146310 im Gen <i>IPO4</i> .....	60
Abb. 10 Etablieren eines Typisierungsassays für den SNP rs4794016 im Gen <i>KPNB1</i> .....	62
Abb. 11 Genotypisierung des Patientenkollektivs für den SNP rs4794016 im Gen <i>KPNB1</i> .....	64
Abb. 12 Anwendung der Sonde R920 zur Genotypisierung der Patientenproben für den SNP rs4794016 im Gen <i>KPNB1</i> .....	65
Abb. 13 Etablieren eines Typisierungsassays für den SNP rs34647 im Gen <i>TNPO1</i> . .....	67
Abb. 14 Schmelzkurven und PCR-Produkt im HRM des Typisierungsassays für den SNP rs34647 im Gen <i>TNPO1</i> .....	68
Abb. 15 Genotypisierung der Patientenproben für den SNP rs34647 im Gen <i>TNPO1</i> .....	69
Abb. 16 Etablieren eines Typisierungsassays für den SNP rs2426109 im Gen	

<i>CSE1L</i> .....	71
Abb. 17 Schmelzkurvenanalyse des Typisierungsassays für den SNP rs2426109 im Gen <i>CSE1L</i> .....	72
Abb. 18 Genotypisierung des Patientenkollektivs für den SNP rs2426109 im Gen <i>CSE1L</i> .....	75
Abb. 19 Statistische Analyse des SNP rs2426109 im Gen <i>CSE1L</i> .....	80
Abb. 20 Etablieren eines Typisierungsassays für den SNP rs11618521 im Gen <i>KPNA3</i> .....	82
Abb. 21 Ausgewählter Bereich der Schmelzkurvenanalyse zur Genotypisierung des Patientenkollektivs für den SNP rs11618521 im Gen <i>KPNA3</i> . .....	83
Abb. 22 Genotypisierung des Patientenkollektivs für den SNP rs11618521 im Gen <i>KPNA3</i> .....	84
Abb. 23 Statistische Analyse des SNP rs11618521 im Gen <i>KPNA3</i> .....	89



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Ansatz der PCR im Thermo Cyclor.....	27
Tabelle 2 Programm der Touchdown-PCR im Thermo Cyclor .....	28
Tabelle 3 Ansatz der PCR im Light Cyclor .....	32
Tabelle 4 High-Resolution Melting Program im Light Cyclor .....	33
Tabelle 5 Ansatz der Hot-Start-PCR .....	37
Tabelle 6 Programm der Hot-Start-Touchdown-PCR im Thermo Cyclor.....	37
Tabelle 7 Zusammensetzung des Thermo Cycling Mixes für die Sanger-Sequenzierung .....	41
Tabelle 8 Thermo Cycling Programm für die Sanger-Sequenzierung .....	41
Tabelle 9 Übersicht der untersuchten Einzelnukleotidpolymorphismen. ....	46
Tabelle 10 Charakteristika des SNP rs713982 im Gen <i>RANBP1</i> .....	48
Tabelle 11 Zusammenfassende Betrachtung der Analyse des SNP rs713982 im Gen <i>RANBP1</i> .....	48
Tabelle 12 Charakteristika des SNP rs12809335 im Gen <i>IPO8</i> .....	50
Tabelle 13 Zusammenfassende Betrachtung der Analyse des SNP rs12809335 im Gen <i>IPO8</i> .....	52
Tabelle 14 Charakteristika des SNP rs62084683 im Gen <i>KPNA2</i> .....	53
Tabelle 15 Zusammenfassende Betrachtung der Analyse des SNP rs62084683 im Gen <i>KPNA2</i> .....	54
Tabelle 16 Charakteristika des SNP rs7146310 im Gen <i>IPO4</i> .....	56
Tabelle 17 Zusammenfassende Betrachtung der Analyse des SNP rs7146310 im Gen <i>IPO4</i> .....	59
Tabelle 18 Charakteristika des SNP rs4794016 im Gen <i>KPNB1</i> .....	61
Tabelle 19 Zusammenfassende Betrachtung der Analyse des SNP rs4794016 im Gen <i>KPNB1</i> .....	63
Tabelle 20 Charakteristika des SNP rs34647 im Gen <i>TNPO1</i> .....	66

Tabelle 21 Zusammenfassende Betrachtung der Analyse des SNP rs34647 im Gen <i>TNPO1</i> .....	69
Tabelle 22 Charakteristika des SNP rs2426109 im Gen <i>CSE1L</i> .....	70
Tabelle 23 Ansatz der PCR mit gemischter DNA im Light Cycler.....	74
Tabelle 24 Zusammenfassende Betrachtung der Analyse des SNP rs2426109 im Gen <i>CSE1L</i> .....	79
Tabelle 25 Effektzusammenfassung der Regressionsanalyse für den Einfluss des SNP rs2426109 im Gen <i>CSE1L</i> auf das Erkrankungsalter von Patienten mit SCA3.....	79
Tabelle 26 Charakteristika des SNP rs11618521 im Gen <i>KPNA3</i> .....	81
Tabelle 27 Zusammenfassende Betrachtung der Analyse des SNP rs11618521 im Gen <i>KPNA3</i> .....	88
Tabelle 28 Effektzusammenfassung der Regressionsanalyse für den Einfluss des SNP rs11618521 im Gen <i>KPNA3</i> auf das Erkrankungsalter von Patienten mit SCA3.....	88
Tabelle 29 Zusammenfassende Betrachtung der untersuchten SNPs und der dafür etablierten Typisierungsassays.....	90

## Formelverzeichnis

Formel 1 Berechnung der Allelfrequenz für den SNP rs2426109 für das häufigere Allel: $G = p$ mit Hilfe des Hardy-Weinberg-Gesetzes.....	76
Formel 2 Berechnung der Allelfrequenz für den SNP rs2426109 für das seltenere Allel: $C = q$ mit Hilfe des Hardy-Weinberg-Gesetzes.....	76
Formel 3 Berechnung der nach Hardy-Weinberg erwarteten Anzahl von Patienten mit G/G für den SNP rs2426109 im untersuchten Patientenkollektiv abhängig von der ermittelten Allelfrequenz. ....	77
Formel 4 Berechnung der nach Hardy-Weinberg erwarteten Anzahl von Patienten mit C/G für den SNP rs2426109 im untersuchten Patientenkollektiv abhängig von der ermittelten Allelfrequenz. ....	77
Formel 5 Berechnung der nach Hardy-Weinberg erwarteten Anzahl von Patienten mit C/C für den SNP rs2426109 im untersuchten Patientenkollektiv abhängig von der ermittelten Allelfrequenz. ....	77
Formel 6 Überprüfung der Verteilung der Genotypen des SNP rs2426109 auf das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht mit dem Chi-Quadrat-Test.....	77
Formel 7 Berechnung der Allelfrequenz für den SNP rs11618521 für das häufigere Allel: $C = p$ mit Hilfe des Hardy-Weinberg-Gesetzes.....	85
Formel 8 Berechnung der Allelfrequenz für den SNP rs11618521 für das seltenere Allel: $T = q$ mit Hilfe des Hardy-Weinberg-Gesetzes.....	85
Formel 9 Berechnung der nach Hardy-Weinberg erwarteten Anzahl von Patienten mit C/C für den SNP rs11618521 im untersuchten Patientenkollektiv in Abhängigkeit von der ermittelten Allelfrequenz .....	86
Formel 10 Berechnung der nach Hardy-Weinberg erwarteten Anzahl von Patienten mit C/T für den SNP rs11618521 im untersuchten Patientenkollektiv in Abhängigkeit von der ermittelten Allelfrequenz .....	86
Formel 11 Berechnung der nach Hardy-Weinberg erwarteten Anzahl von Patienten mit T/T für den SNP rs11618521 im untersuchten Patientenkollektiv in Abhängigkeit von der ermittelten Allelfrequenz.. ....	86
Formel 12 Überprüfung der Verteilung der Genotypen des SNP rs11618521 auf das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht mit dem Chi-Quadrat-Test.....	86
Formel 13 Formel für das prädiktive Erkrankungsalter.....	88

## Abkürzungsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNG</b>	<b>BEDEUTUNG</b>
A	Adenin
APOE	Apolipoprotein E
ATXN	Ataxin
Bp	Basenpaare
C	Cytosin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
G	Guanin
HRM	High-Resolution Melting
IPO	Importin
KPNA	Karyopherin- $\alpha$
KPNB	Karyopherin- $\beta$
MJD	Machado-Joseph-Disease
NES	Nuclear Export Signal
NLS	Nuclear Localisation Signal
NPC	Nuclear Pore Complex
PCR	Polymerase Chain Reaction
RANBP	Ran-Binding-Protein
SCA3	Spinozerebelläre Ataxie Typ 3
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus (Single Nucleotide Polymorphism)
T	Thymin
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TSP	Transkriptionsstartpunkt
TV	Transkriptionsvariante
UTR	Untranslatierte Region

## **1. Einleitung**

### **1.1 Spinozerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3)**

Die Spinozerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3) ist eine weltweit verbreitete, neurodegenerative Polyglutaminerkrankung, die zu den erblichen Formen der Ataxien zählt. Von einem erblichen Hintergrund wird ausgegangen, sobald mehrere Familienmitglieder betroffen sind (Riess et al., 2001). Allgemein betrachtet, umfasst die Gruppe der erblichen Ataxien eine große Anzahl unterschiedlicher Subtypen. Diese haben eine strukturierte Einteilung gefunden, welche auf der Genetik der Erkrankungen basiert (Harding, 1982). Die verschiedenen Ataxieformen unterscheiden sich in Pathoanatomie, Symptomen, klinischem Erscheinungsbild und Genetik.

Genetisch kann zwischen autosomal rezessiv vererbten, X-Chromosomal vererbten und autosomal dominant vererbten Ataxien unterschieden werden (Harding, 1982). Die Spinozerebellären Ataxien gehören zu den autosomal dominant vererbten Ataxien. Oft handelt es sich bei den auslösenden Mutationen um Trinukleotidexpansionen, aber auch andere Auslöser, wie Missensemutationen (Ikeda et al., 2006) oder andere Nukleotidrepeatexpansionen (Matsuura et al., 2000) können den verschiedenen Spinozerebellären Ataxien zu Grunde liegen. Allen Subtypen gemein ist die Neurodegeneration von spinalen und zerebellären Systemen, die zu einer chronisch voranschreitenden Gangunsicherheit führt, welche das Kardinalsymptom der an den Spinozerebellären Ataxien erkrankten Patienten darstellt und namensgebend ist (Riess et al., 2001). Heutzutage sind über 40 verschiedene Spinozerebelläre Ataxien bekannt, die chronologisch nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung benannt wurden (Sun et al., 2016). Die weltweit häufigste Form der autosomal dominant vererbten Ataxien ist die SCA3 (Van De Warrenburg et al., 2002). Bisher liegen epidemiologische Daten nur für bestimmte Regionen vor, weswegen die Prävalenzen der Spinozerebellären Ataxien nicht exakt angegeben werden kann. Die erhobenen Daten deuten auf eine Prävalenz von ca. 3/100.000 aller autosomal dominant vererbten Spinozerebellären Ataxien hin (Bettencourt et al., 2008). Das Auftreten der SCA3, die auch unter dem Namen Machado-Joseph-Krankheit (MJD) bekannt ist, wurde 1972 erstmalig im Zusammenhang mit portugiesischen Familien, die von den Azoren

stammten, beschrieben (Rosenberg, et al., 1976; Spence et al., 1972). Die Prävalenz ist regional sehr unterschiedlich und mit 1 Erkrankten pro 239 Einwohner auf den Azoren am höchsten (Bettencourt et al., 2008; Lima et al., 1998). Im achtzehnten Jahrhundert besiedelten die von den Azoren stammenden Portugiesen als erste den Süden Brasiliens. Es überrascht daher nicht, dass heutzutage die höchste relative Häufigkeit der SCA3 in Rio Grande do Sul im Süden Brasiliens vorzufinden ist. Die Bewohner dieses Bundesstaates gelten als Nachfahren der azorischen Siedler. Von allen dort vertretenen autosomal dominanten Ataxien macht die SCA3 einen Anteil von 78% aus (De Castilhos et al., 2014).

Das klinische Erscheinungsbild der SCA3 ist sehr heterogen. Wie bei allen Spinocerebellären Ataxien ist der Verlauf der SCA3 progressiv. Eine Kausaltherapie oder Heilung ist bisher nicht möglich. Nach dem Auftreten erster Symptome beträgt die weitere Überlebenszeit im Mittel 21,18 Jahre (Kieling, et al., 2007). Im Schnitt erkranken die meisten Patienten im Alter von 34 bis 40 Jahren, wobei die Erkrankung im Einzelfall sehr viel früher oder später auftreten kann (Saute & Jardim, 2015; Carvalho et al., 2008; Maciel, et al, 2001).

Erste präklinische Hinweise auf den Krankheitsausbruch bei Risikopatienten liefert nach neustem Wissensstand das gezielte Untersuchen der Okulomotorik (Wu et al., 2017). Klinisch apparent wird die SCA3 am häufigsten durch eine Gangataxie, seltener durch Diplopie (Jardim et al., 2001; Riess et al., 2001). Neben der progredienten Gangataxie weisen die SCA3-Patienten oft zusätzlich Leitsymptome wie Extremitätenataxie, Dysarthrie und Nystagmus auf (Riess et al., 2001). Darüber hinaus zeigen sich je nach betroffenem neuronalem System weitere Symptome (Saute & Jardim, 2015).

Eine Einteilung in drei verschiedene Subtypen der SCA3 wird erstmals bei Rosenberg angewandt (Rosenberg, 1992). Diese werden durch die unterschiedlichen Symptome und das Erkrankungsalter klassifiziert. Neben den bereits erwähnten Leitsymptomen leiden Typ-I Patienten zusätzlich unter pyramidalen und extrapyramidalen Krankheitszeichen, wie Spastik, Dystonie, Athetosen, Rigor und Myokomien. Charakteristisch sind ein früher Krankheitsbeginn und ein schnell progredienter Krankheitsverlauf. Typ-II kommt am häufigsten vor. Bei diesem stehen die Ataxie sowie eine zusätzlich auftretende Spastik im Vordergrund

der Symptomatik. Die Erkrankung tritt hier im mittleren Alter auf. Typ-III Patienten entwickeln neben der progressiven Ataxie eine unterschiedlich stark ausgeprägte Amyotrophie, zudem kann eine Polyneuropathie auftreten. Sie erkranken am spätesten (Rosenberg, 1992).

In neueren Untersuchungen werden drei weitere Typen beschrieben. Der vierte Typ zeichnet sich durch parkinsonartige Symptome aus und ist klinisch kaum von dem L-Dopa-sensitiven Parkinson zu unterscheiden. Bislang wurde Typ-IV nur bei mehreren an SCA3 erkrankten afrikanischen Familien festgestellt, in europäischen SCA3 Familien zeigen sich nur selten parkinsonähnliche Symptome (Subramony et al., 2002; Gwinn-Hardy et al., 2001). Typ-V zeichnet sich durch das ausschließliche Auftreten einer Spastischen Paraplegie aus (D'Abreu et al., 2010). Bei Typ-VI manifestiert sich die SCA3 einzig als periphere asymmetrische Neuropathie (Van Schaik et al., 1997). Die Zuteilung der Patienten zu einem bestimmten Subtyp ist allerdings nur bedingt klinisch relevant. Dies ist nicht zuletzt dem Umstand geschuldet, dass es Überschneidungen zwischen den Subtypen gibt oder sich ein Subtyp in einen anderen umwandeln kann (Fowler, 1984).

Bei der SCA3 handelt es sich um eine Polyglutaminerkrankung. Das wohl prominenteste Beispiel einer Polyglutaminerkrankung ist die Chorea Huntington. Darüber hinaus umfasst die Formengruppe der Polyglutaminerkrankungen die Dentatorubro-Pallidoluysische Atrophie, die Spinobulbäre Muskelatrophie Typ Kennedy und aus der Gruppe der Spinozerebellären Ataxien die SCA1, 2, 6, 7 und 17 (La Spada & Taylor, 2003). Die Chorea Huntington und die SCA3 sind die häufigsten Polyglutaminerkrankungen (Bauer & Nukina, 2009). Bis auf die Spinobulbäre Muskelatrophie Typ Kennedy, die X-chromosomal vererbt wird (Spada et al., 1991), werden alle anderen Polyglutaminerkrankungen autosomal dominant vererbt (Kawaguchi et al., 1994; Orr et al. 1993; MacDonald et al., 1993; Zhuchenko et al., 1997, Lindblad et al., 1996, Koide et al., 1999, Koide et al., 1994).

Ursache für alle Polyglutaminerkrankungen ist eine CAG-Repeatexpansion in für Proteine kodierenden Genen. Einzig bei der SCA17 können auch CAA-Triplets in der Repeatregion vorkommen (Koide et al., 1999). Die CAG-Repeatexpansion führt zu einer Polyglutaminregion im Protein. Dies hat zur Folge, dass die

betroffenen Proteine fehlgefaltet werden und Aggregate bilden. Bei den Polyglutaminerkrankungen konnten Einschlusskörper festgestellt werden, welche unter anderem aus diesen Proteinaggregaten bestehen. Diese Einschlusskörper stellen einen Marker für die Schwere der Erkrankung dar (Arrasate et al., 2004; Saudou et al., 1998; Klement et al., 1998). Proteine, die eine längere Polyglutaminregion haben, aggregieren stärker und haben eine erhöhte Zelltoxizität (Hackam et al., 1998). Vor allem Neurone des zentralen Nervensystems sind von diesem Effekt betroffen. Es kommt insbesondere zu einer spinalen Neurodegeneration, sowie Neurodegeneration in Cerebellum und Hirnstamm (Zoghbi & Orr, 1999). Die der Neurodegeneration zu Grunde liegenden Mutationen sind je nach Polyglutaminerkrankung jedoch auf unterschiedlichen Chromosomen und Genen lokalisiert. Es zeigt sich je nach betroffenem Polyglutaminprotein eine spezifische Degeneration und Dysfunktion bestimmter neuronaler Subpopulationen. Allen Polyglutaminerkrankungen gemein ist das Prinzip der Antizipation. Die CAG-Repeatanzahl nimmt über die Generationen zu, ein schwererer Krankheitsverlauf für nachfolgende Generationen ist zu erwarten (Giunti et al., 1999; Cancel et al., 1997).

Bei der SCA3 liegt die Ursache für die Neurodegeneration im *ATXN3*-Gen, das auf Chromosom 14q3.1 lokalisiert ist. Bei den Erkrankten kann die Trinukleotidexpansion (CAG) in der kodierenden Region des Gens gefunden werden, die im betroffenen Protein Ataxin3 zu einer verlängerten Polyglutaminregion in der Nähe des C-Terminus führt. Dies hat eine strukturelle Veränderung des Proteins zur Folge (Kawaguchi et al., 1994; Paulson et al., 1997). Im Gegensatz zu Gesunden, die zwischen 12 bis 43 CAG-Repeats haben, sind bei Erkrankten zwischen 51 bis 91 CAG-Repeats zu detektieren (Saute & Jardim, 2015). Die genetische Veränderung ist im Genom aller Zellen vorhanden, dennoch zeigen sich Pathologien nur im Bereich von Nervenzellen (Schmidt et al., 1998). Die besondere Sensibilität der Nervenzellen könnte möglicherweise durch deren hohen Energieverbrauch und einen von oxidativer Energie abhängigen Metabolismus bedingt sein (Schon & Manfredi, 2003).

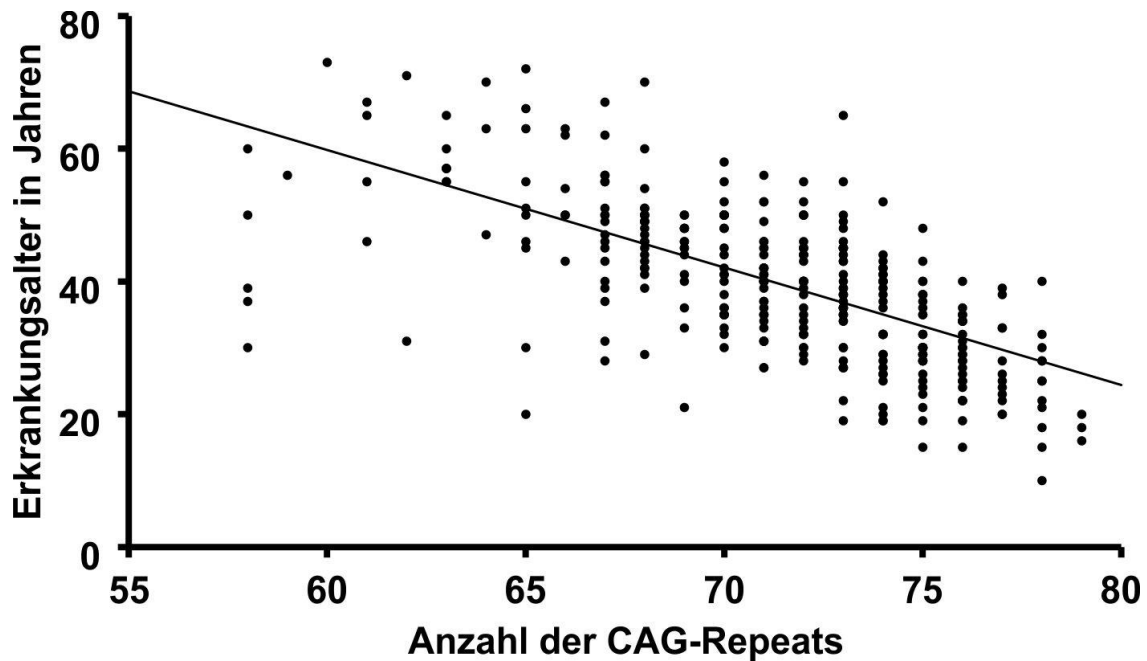
Es wird angenommen, dass sowohl der Verlust des normalen Ataxin3's als auch die Expression des mutierten Ataxin3's zur Pathogenese der SCA3 beitragen. Im



Gesunden ist Ataxin3 an der Expression von Genen beteiligt, welche die Zelle vor oxidativem Stress schützen (Araujo et al., 2011; Evert et al., 2003). Bei Mutation des Ataxin3's kommt es zu einem Verlust dieser Funktion. In pontinen Neuronen von betroffenen Patienten sowie in transgenen Zellen, die das mutierte SCA3 exprimieren, konnte eine Hochregulation von Genen von Entzündungsproteinen festgestellt werden (Evert et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression des mutierten Ataxin3 eine Kaskade von Entzündungsmediatoren aktiviert, die zu einer Überexpression von Zytokinen führt (Evert et al., 2003). Dies lässt darauf vermuten, dass das mutierte Ataxin3 durch Induktion einer Entzündungsreaktion eine toxische Wirkung auf die Neurone hat.

In welchem Alter erste Krankheitssymptome auftreten wird maßgeblich durch die Länge der Trinukleotidexpansion beeinflusst. Es besteht eine negative Korrelation zwischen Anzahl der CAG-Repeats und Erkrankungsalter. Allerdings liefert die CAG-Repeatanzahl alleine keine hinreichende Aussage über das zu erwartende Erkrankungsalter. Individuell zeigen sich bei gleich langer Trinukleotidexpansion sehr unterschiedliche Erkrankungsalter (Abb. 1). Die CAG-Repeatanzahl kann also nicht der einzige modifizierende Faktor der SCA3 sein.

Wie bereits erwähnt, ist ein gemeinsames Merkmal der Polyglutaminerkrankungen die Bildung von Einschlusskörpern. Mit Ausnahme der SCA2 (Huynh et al., 2000) und der SCA6 (Ishikawa et al., 1999) finden sich diese überwiegend im Nucleus der von der Degeneration betroffenen Neurone. Auch wenn die Einschlusskörper bei der SCA2 und der SCA6 hauptsächlich im Zytoplasma der betroffenen Neurone lokalisiert sind, konnte für die SCA6 doch gezeigt werden, dass die intranukleäre Lokalisation der Polyglutaminregion entscheidend für die Pathogenese ist. Bei der SCA6 ist die die CAG-Repeatexpansion im Gen für die Untereinheit CACNA1A eines Kalziumkanals lokalisiert. Die Polyglutaminregion ist, wie auch bei der SCA3 beschrieben (Kawaguchi et al., 1994), nahe des C-Terminus lokalisiert (Ishikawa et al., 1997). Die expandierte Polyglutaminregion wirkt zytotoxisch, wenn sie in von dem Protein abgespaltet und nach intranukleär transloziert vorliegt (Kordasiewicz et al., 2006).



**Abb. 1 Zusammenhang zwischen Erkrankungsalter und CAG-Repeatanzahl** Die SCA3 ist eine autosomal dominant vererbte Polyglutaminerkrankung. Auslöser für die Erkrankung ist eine Trinukleotidexpansion im *ATXN3*-Gen. Die CAG-Repeats führen zu einer verlängerten Polyglutaminregion im Protein Ataxin3. Aufgrund der zu langen Polyglutaminregion kommt es zu einer Fehlfaltung des Proteins. Die Trinukleotidexpansion hat einen Umfang von 51 bis 91 CAG-Repeats. Zwischen Erkrankungsalter und CAG-Repeatanzahl zeigt sich eine statistische Korrelation. Patienten mit mehr CAG-Repeats erkranken tendenziell früher. Bei gleicher Anzahl an CAG-Repeats kann allerdings individuell ein sehr unterschiedliches Erkrankungsalter vorliegen.

Zwar wird angenommen, dass bei der Chorea Huntington nicht nur die nukleäre, sondern auch die zytoplasmatische Lokalisation der Polyglutaminregion eine Rolle für die Pathogenese der Erkrankung spielt (Cooper et al., 1998), dennoch konnte auch für die Chorea Huntington gezeigt werden, dass die intranukleäre Lokalisation des Proteins Huntingtin, welches die Polyglutaminregion enthält, für den Zelltod ganz entscheidend ist. Im Zellmodell wirkt das mutierte Huntingtin vor allem dann zytotoxisch, wenn es im Nucleus vorkommt (Saudou et al., 1998, DiFiglia et al., 1997).

Die Einschlusskörper sind vermutlich Ausdruck eines zellulären Abwehrmechanismus, um die für die Zelle toxische Polyglutaminregionen im Nucleus unschädlich zu machen. Darauf weist zum einen hin, dass das mutierte Huntingtin insbesondere dann den Zelltod induziert, wenn die Bildung von intranukleären Einschlusskörpern inhibiert wird (Saudou et al., 1998). Zum anderen konnten beispielsweise bei der SCA3 Abbauproteine in den intranukleären Einschluss-

körpern detektiert werden (Schmidt et al., 2002).

Bei Personen, die nicht an der SCA3 erkrankt und die keine Träger einer CAG-Repeatexpansion im *ATXN3*-Gen sind, ist das Ataxin3 vor allem im Zytoplasma lokalisiert (Paulson et al., 1997). Vor mehreren Jahren konnten auch bei an SCA3 erkrankten Patienten intranukleäre Einschlusskörper festgestellt werden (Paulson et al., 1997, Schmidt et al., 1998). Diese bestehen unter anderem aus dem C-Terminus des Ataxin3, der die Polyglutaminregion enthält (Haacke et al., 2006). Darüber hinaus können Ubiquitin und Chaperone in den Einschlusskörpern nachgewiesen werden (Schmidt et al., 2002). Wie für die Polyglutaminerkrankungen typisch, konnte auch für die SCA3 gezeigt werden, dass die Polyglutaminregion von Ataxin3 dann toxisch wirkt, wenn sie intranukleär lokalisiert ist. Das Ataxin3 wird zunächst im Zytoplasma proteolytisch gespalten. Der N-Terminus, welcher mit Exportsignalen verknüpft ist, verbleibt im Zytoplasma. Der C-Terminus, welcher ein Nuclear Localisation Signal (NLS) enthält, aggregiert mit der Polyglutaminregion im Nucleus und liegt dort in Kombination mit Abbauproteinen vor (Antony et al., 2009; Haacke et al., 2006; Schmidt et al., 2002). Bei SCA3-Patienten können expandierte Polyglutaminregionen post mortem auch in Gehirnregionen nachgewiesen werden, die nicht unmittelbar von der Neurodegeneration betroffen sind (Yamada et al., 2001). Auffällig ist allerdings, dass die intranukleären Einschlusskörper vor allem in den von der Neurodegeneration besonders stark betroffenen Regionen auftreten (Schmidt et al., 1998). Im Tiermodell mit transgenen Mäusen konnte zunächst für Polyglutaminerkrankungen allgemein, dann auch für die SCA3 nachgewiesen werden, dass die intranukleäre Lokalisation des fehlgefalteten Proteins eine Rolle spielt (Bichelmeier et al., 2007; Jackson, et al., 2003). Mäuse, deren Ataxin3 mit einem nukleären Exportsignal verknüpft war, erkrankten später und weniger stark, als Mäuse mit derselben Anzahl von CAG-Repeats. Mäuse ohne Exportsignal hatten einen stärker ausgeprägten Phänotypen, Krankheitssymptome traten früher auf und der Tod trat schneller ein (Bichelmeier et al., 2007). Sämtliche Zeichen sprechen dafür, dass Ataxin3 bei Lokalisation im Zellkern seine Toxizität entfaltet. Daher wird angenommen, dass die Lokalisation der fehlgefalteten Proteine im Nucleus eine weitere entscheidende Einflussgröße auf Erkrankungsalter und Phänotyp bei an

SCA3 erkrankten Menschen darstellt. Das Blockieren von nukleären Transportvorgängen wurde schon mehrfach als potenzieller therapeutischer Ansatz der SCA3 erwähnt (Sowa et al., 2018; Bichelmeier et al., 2007; Yang, 2002; Jackson et al., 2003).

## **1.2 Nukleozytoplasmatischer Transport**

Der Zellkern ist das Steuerorgan der Zelle und bildet ein eigenes Kompartiment. Vom Zytoplasma wird er durch die Kernhülle getrennt, die aus einer inneren und äußeren Membran besteht (Cronshaw et al., 2002). Die Vorgänge innerhalb der Zelle erfordern allerdings einen Stoffaustausch zwischen Zytoplasma und Nucleus. Dies wird durch den Nuclear Pore Complex (NPC), auch Kernporen genannt, ermöglicht. Die Kernporen sind oktagonale Proteinkomplexe, die in die Kernhülle eingebettet sind. Heutzutage geht man davon aus, dass an der Bildung der Kernporen ca. 30 unterschiedliche Proteine unmittelbar beteiligt sind, an dem Transport durch die Membran allerdings eine weitaus höhere Zahl (Cronshaw et al., 2002).

Zwar sind aktuell Proteine bis zu einer Größe von 110-230 kDa bekannt, die durch passive Diffusion in den Zellkern hinein bzw. heraus gelangen (Popken et al., 2015; Wang & Brattain, 2007), in der Regel spielt die passive Diffusion durch den NPC aber vor allem eine Rolle für Ionen, kleine Moleküle und kleinere Proteine (Timney et al, 2016). Für große Proteine stellt der NPC einen selektiven Pfortner dar, diese Proteine werden aktiv transportiert. Der klassische Proteinimport wird durch die Heterodimere Karyopherin- $\alpha$  (KPNA), auch Importin- $\alpha$  genannt, und Karyopherin- $\beta$  (KPNB), auch Importin- $\beta$  genannt, vermittelt. Er verläuft in zwei Schritten. Im ersten, energieunabhängigen Schritt, fungiert KPNA als Adaptorprotein, es erkennt NES bzw. NLS des Substrates und bindet an dieses (Nachury et al., 1998; Radu et al., 1995). Das NLS besteht in der Regel aus einer Gruppe von basischen Aminosäuren, die sich in der primären Aminosäuresequenz befinden (Nachury et al., 1998). Importin- $\beta$  sorgt für das Andocken an die Kernhülle und den Transport durch die Kernmembran. Im Zellkern bindet Importin- $\beta$  Ran-GTP, wodurch der Komplex aus KPNA, Importin- $\beta$  und Substrat dissoziiert (Talcott & Moore, 2000). Das Substrat verbleibt im Zellkern, Importin- $\beta$  gelangt gebunden an Ran-GTP ins Zytoplasma zurück (Hieda et al., 1999), KPNA

verlässt den Nucleus nach Binden an den Exportfaktor CAS (Sun et al, 2013). Heutzutage sind mehr als 20 verschiedene Karyopherine bekannt, die am Transport in den Zellkern beteiligt sind (Christiansen & Dyrskjøt, 2013).

Mutationen in regulatorischen Regionen von Genen, wie z.B. die Promotorregion, können zu einer veränderten Expression führen (Heinz et al., 2013). Aufgrund der beschriebenen Auswirkungen, die eine Ablagerung von Polyglutamin im Zellkern auf den Krankheitsverlauf haben kann, ist anzunehmen, dass eine veränderte Expression der Transportproteine zu einem veränderten Transportgeschehen führen könnte, die demnach in einem veränderten Krankheitsverlauf resultieren würde. Besonders vielversprechend ist das Protein KPNA3, das am Transport von Ataxin3 in den Zellkern beteiligt ist. Ataxin3 selbst weist NES und NLS auf (Antony et al., 2009; Macedo-Ribeiro et al., 2009). Im Maus- und Fliegenmodell zeigt sich, dass KPNA3 die Lokalisation von Ataxin3 moduliert und somit Einfluss auf Krankheitsverlauf und Neurodegeneration hat. Ein Knock-Out von KPNA3 zeigt im SCA3 Modell verminderte neurologische Symptome und einen milderen Krankheitsverlauf (Sowa et al., 2018).

### **1.3 Fragestellung**

Bei der SCA3 handelt es sich um eine autosomal dominant vererbte, neurodegenerative Erkrankung, die zur Gruppe der Polyglutaminerkrankungen gehört. Im *ATXN3*-Gen liegt eine CAG-Repeatexpansion vor. Diese führt im Genprodukt, dem Protein Ataxin3, zu einer verlängerten Glutaminregion. Bei an SCA3 erkrankten Patienten kommt es aufgrund der Polyglutaminregion zu einer Fehlfaltung von Ataxin3. Statistisch zeigt sich eine negative Korrelation zwischen Anzahl der CAG-Repeats und Erkrankungsalter (Ikeda et al., 1996). Dennoch gibt es bei gleicher CAG-Repeatanzahl individuell starke Abweichungen vom statistisch prognostizierten Erkrankungsalter. In Tierversuchen wurde nachgewiesen, dass ein Faktor, der das Erkrankungsalter und die Schwere der Erkrankung unabhängig von der CAG-Repeatanzahl beeinflusst, die Lokalisation des fehlgefalteten Ataxin3's ist. Wird das Ataxin3 in den Zellkern transportiert und bildet dort intranukleäre Einschlusskörper, erkranken die Tiere früher und weisen stärkere Symptome auf (Bichelmeier et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Lokalisation des Ataxin3's

auch beim Menschen einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf hat. Ataxin3 kommt im Gesunden vor allem im Zytoplasma vor, erst bei Erkrankten lassen sich die Ataxin3 enthaltenden intranukleären Einschlusskörper feststellen. Es wurde angenommen, dass eine Über- oder Unterexpression von Transportproteinen, die am nukleozytoplasmatischen Transport beteiligt sind, eine Veränderung der Konzentration von Ataxin3 im Nucleus bewirken würde. Aus diesem Grund wurden Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) von Transportproteinen, die am nukleozytoplasmatischen Transport beteiligt sind, untersucht. Analysiert wurden Polymorphismen von Proteinen, die sich in vorhergehenden Forschungen als besonders vielversprechend herausgestellt hatten. Es wurden SNPs gewählt, die in kodierenden oder regulatorischen Regionen von Transportproteinen des NPC lokalisiert sind und die in der europäischen Bevölkerung mit einer Allelfrequenz von mindestens 15% vorkommen. Mittels High-Resolution Melting erfolgte die Genotypisierung eines Patientenkollektivs mit insgesamt 517 DNA-Proben von SCA3-Patienten. In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt acht SNPs in Genen von am Kerntransport beteiligter Proteine auf einen Einfluss auf das Erkrankungsalter der SCA3 geprüft. Besonders vielversprechend war die Analyse von KPNA3, dessen Rolle im Zusammenhang mit der SCA3 erstmals am Menschen untersucht wurde.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

Die Eigennamen für registrierte bzw. unregistrierte Warenmarken wurden in den folgenden Materiallisten sowie im weiteren Text nicht gesondert gekennzeichnet.

#### 2.1.1 Chemikalien

CHEMIKALIE	ARTIKELNUM-MER	BEZEICHNUNG, HERSTELLER, ORT
10X FASTSTART TAQ PUFFER	12161567001	10x PCR buffer, FastStart Taq Polymerase, Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
3 M NATRIUM ACETAT	S-7899	Sigma Aldrich / Merck KGaA, Darmstadt
5X STANDARD PUFFER	B9022S	One TaqStandard Reaktion Buffer 5x, New England BioLabs, Frankfurt a.M.
10X BLUEJUICE GEL LOADING BUFFER	10816015	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
AGAROSE	50001	SeaKem LE Agarose for gel electrophoresis, Lonza, Köln
BORSÄURE	K23155260	Merck KGaA, Darmstadt
DMSO	A3006-0100	DMSO, Applichem, Darmstadt
dNTP MIX		PCR Grade Nucleotide Mix, dATP, dCTP, dTTP, dGTP, 10 mM each, Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
EDTA	324503-100GM	Merck KGaA, Darmstadt
ESSIGSÄURE	1000631011	Merck KGaA, Darmstadt
ETHANOL 100%	362808	Sigma Aldrich / Merck KGaA, Darmstadt
FASTSTART TAQ POLYMERASE	04738403001	FastStart Taq Polymerase, dNTPack, Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
GELRED	41003	GelRed Nucleic Acid Gel Stain, 10,000x in water, Biotium, Hayward, CA
H <sub>2</sub> O	00041476	Ampuwa Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
ISOPROPANOL 99,5%	I9516	Sigma Aldrich / Merck KGaA, Darmstadt
PRIMER		Siehe 2.2, entsalzt, Metabion International AG, Steinkirchen
pUC19 DNA/MSPI (HPALL) MARKER	SM0222	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
TAQ POLYMERASE	M0480 X	One Taq DNA Polymerase, New England BioLabs, Frankfurt a.M.
TRISBASE	1002070984	Sigma Aldrich

### 2.1.2 Kits

KIT	ARTIKELNUMMER	HERSTELLER, ORT
AGENCOURT AMPUREXP	A29152	Agencourt Bioscience Corporation, Beckman Coulter Company, Krefeld
GENOMELAB DTCS-QUICK START KIT	608120	Beckman Coulter Company, Krefeld
LIGHT CYCLER 480 HIGH RESOLUTION MELTING MASTER	4909631001	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
QIAQUICK GEL EXTRACTION KIT	28706	QIAGEN GmbH, Hilden

### 2.1.3 Puffer

#### PUFFER ZUSAMMENSETZUNG

TAE 1X	40 mM Trisbase, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA.
TBE 1X	8,9 mM Trisbase, 8,9 mM Borsäure, 0,2 mM EDTA

### 2.1.4 Verbrauchsmaterialien

MATERIAL UND BEZEICHNUNG	HERSTELLER, ORT
384 WELL-PLATTE MIT VERSIEGELUNGSFOLIE: FRAME STAR 480/384 WITH QPCR ADHESIVE SEAL	4titude, Berlin
96 MICROPLATE SEQUENZIERUNG: MICROPLATE, 96B WELL, PS, F-BOTTOM, CLEAR	Sigma Aldrich / Merck KGaA,, Darmstadt
96 WELL-PLATTE: 96-WELL PCR PLATE, NON SKIRTED	Beckman Coulter Company, Krefeld
PCR-TUBE STRIPS 0,1 ML	Eppendorf, Hamburg
SAMPLE PLATE, 96 WELL	Beckman Coulter Company, Krefeld
SPRITZEN: INJEKT 5 ML, LUER-ANSATZ, EXZENTRISCH	B.Braun, Melsungen
THERMOWELL 96 WELL PCR PLATE: SEQUENZIERUNG	Sigma Aldrich / Merck KGaA,, Darmstadt
TUBES 1,5 ML: SAFE LOCK TUBES, 1,5 ML, AMBER	Eppendorf, Hamburg
TUBES 1,5 ML: SAFE LOCK TUBES, 1,5 ML, NATURAL	Eppendorf, Hamburg
VERSIEGELUNGSFOLIE FÜR 96 WELL-PLATTE: FRAME STAR 480/ 384 WITH QPCR ADHESIVE SEAL	Beckman Coulter Company, Krefeld



### 2.1.5 Geräte

GERÄT UND BEZEICHNUNG	HERSTELLER, ORT
ELEKTROPHORESEKAMMER (12X9,5X16 CM), MODEL: 40-0708	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
ELEKTROPHORESEKAMMER (17X9,5X25 CM), MODEL: 40-1214	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
LIGHT CYCLER 480	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
MAGNETPLATTE, AGENCOURT SPRIPATE 96R	Beckman Coulter Company, Krefeld
CONSORT ELEKTROPHORESIS POWER SUPPLY, 300V-500MA, E835,	Sigma Aldrich, München
SEQUENZIERER, CEQ 8000 GENETIC ANALYSIS SYSTEM	Beckman Coulter Company, Krefeld
THERMAL CYCLER, G-STORM	Alpha Metrix Biotech, Rödermark
THERMO-SCHÜTTLER	Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg
TISCHZENTRIFUGE THERMO, CENTRIFUGE 5415R	Eppendorf, Hamburg
UV- UND WEISSLICHT-TRANSILLUMINATOR MIT DUNKELHAUBE	Biostep, Burkhardtsdorf
UV-TRANSILLUMINATOR	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
VAKUUM-TROCKENGERÄT, CONCENTRATOR 5301, ROTOR: F-45-48-11,	Eppendorf, Hamburg
VORTEX-MIXER, 1318071	Gemmy Industrial Corporation, Taiwan
ZENTRIFUGE GROSS, CENTRIFUGE 5804, ROTOR: A-2-DWP	Eppendorf, Hamburg

### 2.1.6 Softwares

SOFTWARE	HERAUSGEBER/ URL
ARGUS X1	Biostep, Burkhardtsdorf
CHROMAS LITE VERSION 2.01	<a href="http://www.technelysium.com.au">http://www.technelysium.com.au</a> . Erworben am 26 September 2015
COREL DRAW X8 STUDENT	Corel GmbH, München
JMP 12.2.0	SAS Institute Inc., Heidelberg
LIGHT CYCLER480 SOFTWARE 1.5.0. SP3	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
NCBI SNP DATABASE	Sherry et al. (2001) <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP</a>
OLIGO ANALYZER 3.1	Oligoanalyzer program, IDT, Coralville, USA. <a href="http://www.idtdna.com/Scitools">http://www.idtdna.com/Scitools</a>
PRIMER3WEB VERSION 4.0.0	Untergasser et al. (2012) <a href="http://primer3.ut.ee/">http://primer3.ut.ee/</a>
PRIMERBLAST	Ye et al. (2012)

SEQUENCER SOFTWARE	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast</a> Genome Lab GeXP Genetic Analysis System Version 10.2
UCSC GENOME BROWSER	Kent et al. (2002) <a href="http://genome.ucsc.edu">http://genome.ucsc.edu</a> .
UMELT	Dwight et al. (2011) <a href="http://www.dna.utah.edu/umelt/umelt.html">http://www.dna.utah.edu/umelt/umelt.html</a> .

### 2.1.7 DNA Proben

Zur Analyse der Polymorphismen lagen 517 DNA-Proben von SCA3-Patienten vor, die im Rahmen des EuroSCA Konsortiums (<http://www.euroscas.org/>) gesammelt worden waren. Die DNA-Proben wurden mit der Repli-g-Methode (QIAGEN, Hilden) vervielfältigt und für die weitere Analyse in einem Verhältnis von 3:200 verdünnt. Am 05.03.2013 wurde die Verwendung der Proben für dieses Projekt von der Ethikkommission der Universität Tübingen mit der Bearbeitungsnummer 046/2013B02 genehmigt.

### 2.1.8 Oligonukleotide

Firma: Metabion International AG, Semmelweisstr.3, D-82152 Planegg/Steinkirchen

PRIMER	SEQUENZ
R173_TNPO1-EX1UTR-R1	AGGCAGCAATTTTCCTAGCC
R174_TNPO1-EX1UTR-F2	TGAAATGGCTGCGGAACAAA
R180_TNPO1-PROM40-F1	TGTTTTCTCCCTCAGATGCT
R181_TNPO1-PROM40-R1	TTTTCTTTGACAGTTTGCACA
R189_KPNB1-PROM16-F1	GCCTGAGCCACATACTGTAT
R190_KPNB1-PROM16-R1	CAGTTCTCAACCCCGGAAGA
R200_IPO8-UTR35_F1	ATCCGGTTGAGGTCCATCTC
R201_IPO8-UTR35_R1	GAATGGAGAGCGAGTTGTGG
R216_KPNA3-PROM21-F1	GGAGGGCAGATCACAAGG
R217_KPNA3-PROM21-R1	ACATACCTGCTCATGTCTACCA
R299_CSE1L_PROM09-F2	CCAAGAGGGGCAGGAAGTTC
R300_CSE1L_PROM09-R2	TGCTCTTTGGCTCTGACCAT
R316_RANBP1_PRO82_F2	CTCTATGATCCTGGCTTCTGG
R317_RANBP1_PRO82_R2	GCGATTCAAACACGATACAGC
R319_KPNA2_5UTR83_R1	GATTGGCTGGTTCGAGCC
R320_KPNA2_5UTR83_F2	CCTATGGAAACACGAACGGC
R321_KPNA2_5UTR83_R2	CTGGTTCGAGCCTAAGCTGT
R325_IPO4_MIS310_F2	GAACCTCTCACTCACCCAGG

R326_IPO4_MIS310_R2	GAGCCATTGGTGAGGAGAGA
R484_TNPO1-UTR47_F3	AATGGCTGCGGAACAAAGAG
R487_TNPO1-UTR47_R4	GCAGCAATTTTCCTAGCCCC
R835_KPNB1_PROM_R	GCGGATGACGAGTCAAGAG
R836_KPNB1_PROM_F	CAAGCGATCCTCCCAAAGT
R837_RANBP1_PROM_F	CGAGCGTCTCTATGATCCTG
R838_RANBP1_PROM_R	GAGGCGGACACTCTCATTGT
R839_RANBP1_PROM_F	CTTCTGGCAACGTCATCGT
R840_RANBP1_PROM_R	CGCGATTCAAACCAGTACA
R841_IPO8_UTR_F	GACCCTCTCAGCCTCCTCTT
R842_IPO8_UTR_R	TGTCGTAAAACGGTGAATGG
R843_IPO8_UTR_R	GGTGAATGGAGAGCGAGTTG
R844_KPNA2_UTR_F	TGACGGGATCTGGAGTCCT
R845_KPNA2_UTR_R	CTCAGCTCAAAGACCGTGTG
R846_KPNA2_UTR_R	CAAAGGGTCCACCTCGACT
R847_KPNA2_UTR_R	CCATTGGTGGATTTGAAAAA
R848_KPNA2_UTR_F	GCTTGACGGGATCTGGAGT
R849_KPNA2_UTR_R	TGGATTTGAAAAACACGTTGG
R852_KPNB1_PROM_F	CAGGCCTGAGCCACATACTG

<b>SONDE</b>	<b>SEQUENZ</b>
1_CSE1L_PROM_S.-P	CAAAATGGGTCACAAGCCAGCAGCC
R913_IPO4_MIS._S-P	CAGCAGCGAGGCCTGGGCAG
R920_KPNB1_SONDE_F	GAATAGCTTGGACTTCAGGTACGCGCCAC

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine Methode, um aus sehr geringen DNA-Mengen eine sehr große Menge eines bestimmten DNA-Abschnittes, die Amplifikate, zu produzieren. Die Amplifikation des DNA-Abschnittes erfolgt durch eine Polymerase. Das Enzym ist nur in einem bestimmten Temperaturbereich aktiv und repliziert das Amplikon. Nachdem die zunächst doppelsträngige DNA denaturiert wurde, wird der Startpunkt der Amplifikation durch 2 Primer, jeweils einen für den Forward- und den Reverse-Strang, festgelegt. Diese enden mit einem freien 3'-Ende und sind der Ansatzpunkt für die Polymerase. Der entsprechend angewandte Puffer, schafft ein geeignetes Arbeitsmilieu für die Polymerase. Eine Amplifikation kann nur erfolgen, wenn sich im Reaktionsgemisch Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) befinden. Diese werden als Substrate von der Polymerase an das freie 3'-Ende angefügt (Mullis et al., 1986). Da es bei hohen Temperaturen zur Denaturierung der DNA und zur Aktivität der Polymerase kommt, müssen die Reaktionsgemische vor Beginn der Zyklen kühl auf Eis gelagert werden, um einen vorzeitigen Reaktionsbeginn zu verhindern. Mit den der Tabelle 1 zu entnehmenden Konzentrationen wurde ein Mastermix hergestellt, der zu den unterschiedlichen DNA-Proben in eine Platte pipettiert wurde.

**Tabelle 1 Ansatz der PCR im Thermo Cycler**

PCR-Mix	Menge
Patienten-DNA	1,0 µl
One Taq Standard Reaction Puffer (5x)	4,0 µl
2 mM dNTP Mix (PCR Grade Nucleotide Mix)	1,6 µl
Forward-Primer	1,0 µl
Reverse-Primer	1,0 µl
One Taq DNA Polymerase	0,125 µl
H <sub>2</sub> O (Ampuwa)	11,3 µl
Gesamtvolumen	20,0 µl

Dem Vortex-Mixer (Gemmy Industrial Corporation, Taiwan) wurde die Platte nun kurz aufgesetzt, um eine zusätzliche Homogenisierung zu bewirken, dabei allerdings nicht die DNA zu beschädigen. Die Platte wurde zugeschweißt und der Inhalt daraufhin bei bis zu 1000 Umdrehungen in der Zentrifuge (Zentrifuge Gross 5804, Eppendorf, Hamburg) abzentrifugiert. Somit wurden Rückstände am

Deckel verhindert, sowie eine Konzentration der zugegebenen Reagenzien an einer Stelle gewährleistet. Die Amplifikation wurde in einem Thermo Cycler (Thermal Cycler, G-STORM, Alpha Metrix Biotech, Rödermark) durchgeführt: Die Temperatur des Deckels betrug während des gesamten Reaktionsprozesses 110°C. Um ein möglichst optimales Binden der Primer an die DNA zu ermöglichen, wurde eine Touchdown-PCR durchgeführt (Tabelle 2). Die DNA wurde stets bei 94°C denaturiert. Das Annealing erfolgte im ersten Zyklus bei 65°C, wobei in jedem folgenden Zyklus die Temperatur um 1°C reduziert wurde. Amplifiziert wurde stets bei 68°C. Nach Vollendung der zehn Touchdown-Zyklen wurden die nächsten 25 Zyklen mit einer Annealing-Temperatur von 55°C durchgeführt.

**Tabelle 2 Programm der Touchdown-PCR im Thermo Cycler**

Reaktionsmodus	Zyklen	Dauer – Temperatur
Initiation	1 x	4 min - 94°C
Denaturierung	10 x	1 min - 94°C
Annealing		1min - 65°C (-1°C pro Zyklus)
Amplifikation		1 min - 68°C
Denaturierung		1 min - 94°C
Annealing	25 x	1 min - 55°C
Amplifikation		1 min - 68°C
		6 min - 68°C
	1 x	

Nach Vollendung der 35 Zyklen wurde das Gemisch weitere sechs Minuten auf 68°C erwärmt, um sicher zu gehen, dass die Wirkung der Polymerase ausgeschöpft worden war. Eine Herunterkühlung auf 10°C ermöglichte, das PCR Produkt zu lagern.

#### Agarose-Gel:

In der Gelelektrophorese werden die PCR-Produkte abhängig von ihrer Größe aufgetrennt und dargestellt. Mittels eines Markers kann die Größe der Amplifikate festgestellt werden. In dieser Arbeit wurde für die durchgeführten Versuche ein 1,5% Agarosegel hergestellt, von dem je nach Probenanzahl entweder 40 ml für maximal 22 Proben oder 80 ml für maximal 96 Proben benötigt wurden. Für 40 ml des 1,5% Agarosegels wurden zunächst 60 mg Agarosepulver mit 40 ml TBE-Pufferlösung vermischt. Danach wurde das Gemisch in der Mikrowelle so lange erhitzt, bis es zu sieden anfangt. Die festen Bestandteile des Gels lösten sich dabei

und es bildete sich eine klare homogene Lösung. Diese wurde erneut langsam mit einem Rührfisch durchgerührt, wobei darauf geachtet wurde, eine Blasenbildung zu verhindern. In das warme Gel wurde nun unter beständigem Rühren 1 µl GelRed (Biotium, Hayward, CA) hineinpipettiert. In ein Gefäß wurden Kämme zur Bildung von Geltaschen eingesetzt, in die die Proben einpipettiert werden sollten. Das noch warme Gel wurde in das Gefäß hineingegossen. Nach Erkalten des Gels war dieses fest geworden und konnte für die Elektrophorese eingesetzt werden. Auf das Agarose Gel wurde nun der Marker pUC19 DNA/Mspl (HpaII) (Thermo Fisher Scientific, Dreieich) aufgetragen. Von diesem wurde in die erste Tasche des Gels 5 ng eingegeben. In die folgenden Taschen wurde der entsprechende DNA Mix gegeben, davon jeweils entsprechend der Taschengröße 20 µl oder weniger.

Zur Herstellung des DNA Mixes mischte man 10 µl TE-Puffer mit 4 µl DNA und 4 µl 10x BlueJuice Gel Loading Buffer (Thermo Fisher Scientific, Dreieich) in PCR-Tube Strips (Eppendorf, Hamburg). Dieses Gemisch wurde nun einmal kurz in der Zentrifuge auf über 1000 Umdrehungen zentrifugiert und daraufhin auf das Gel aufgetragen. Je nach Größe des Gels wurde entweder 90 V oder 120 V angelegt. Für ein Gel von 40 ml wurden 90 V eingestellt, bei einem Gel von 80 ml wurden 120 V eingestellt. Nach ca. 15 Minuten war die Gelelektrophorese nun so weit fortgeschritten, dass eine Auftrennung der Banden zu sehen war. Mit dem „Transilluminator Bio View“ wurde zunächst die Lage des Gels überprüft und die entsprechende Fokuseinstellung, entsprechend zur Gelgröße, ausgewählt. Dann wurde unter Bestrahlung mit UV-Licht eine Aufnahme der Gelelektrophorese geschossen. Mit Hilfe des Manuals des entsprechenden Markers konnte die Größe des Amplikons im Vergleich der Anzahl der Basenpaare (bp) auf entsprechender Höhe des Markers im dargestellten PCR-Produkt abgelesen werden.

## **2.2.2 Primer- und Sondendesign**

### Primerdesign

Um für die PCR geeignete Primer zu generieren, waren bestimmte Kriterien einzuhalten (Chuang et al., 2013; DeSilva & Blackett, 2007; Reed & Wittwer, 2004; Laborintern erprobte Maßnahmen):

- Größe des PCR Produktes: zwischen 130 und 230 bp

- CG-Gehalt im Bereich von 40%-60%, optimal im Bereich von 50%,
- Schmelztemperaturunterschiede der Primer unter 5°C
- Längendifferenz der Forward und Reverseprimer bis zu drei Nukleotiden
- Energiegehalt einer Hetero-/ Homodimerbildung rechts und links unter -7,5 kcal/mol

Der Datenbank auf der Website des National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ließ sich die Lokalisation sowie die Sequenz des entsprechenden Polymorphismus entnehmen. Auch die Detektion von etwaigen benachbarten Polymorphismen war auf dieser Website möglich. Um Primer zu generieren, wurde die entsprechende Basensequenz bei Primer3 (<http://primer3.ut.ee/>) eingegeben. Dort wurde die Größe des gewünschten PCR-Produktes nach Möglichkeit zwischen 130 und 230 bp angegeben. Unter den von der Software vorgeschlagenen Primern wurden jene weiter analysiert, die wie bei DeSilva & Blackett, 2007 beschrieben, eine Schmelztemperatur von ca. 60°C hatten. Die Schmelztemperatur wird als die Temperatur definiert, bei der die Hälfte der DNA-Doppelstränge dissoziiert vorliegt (Zhou et al., 2005). Des Weiteren wurde kontrolliert, ob der CG-Gehalt der Primer bei ca. 50% lag. Um die Wahrscheinlichkeit für Homo- und Heterodimere möglichst gering zu halten, wurden die Primer im Oligoanalyzer 3.1 (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) analysiert. Nach laborinternen Kriterien wurde dabei ein Betrag von weniger als -7,5 kcal/mol als ausreichend befunden. Es wurde darauf geachtet, dass der Unterschied der Schmelztemperaturen beider Primer nur maximal ca. 4°C betrug. Primerpaare, die diesen Kriterien entsprachen, wurden zur Generierung eines Typisierungssassays ausgewählt und von der Firma Metabion, Planegg/Steinkirchen, in einer Konzentration von 100 µM bezogen.

### Sondendesign

Bei unmarkierten Sonden handelt es sich um einzelsträngige DNA-Moleküle. Diese bestehen aus dem Gegenstrang für die Region um den untersuchten Einzelnukleotidpolymorphismus und tragen an der entsprechenden Stelle eine für einen bestimmten Genotyp komplementäre Base. Die Sonde kann nur vollständig an den Genotyp binden, für den sie komplementär ist. Liegt eine andere Base an der Stelle des SNP vor, bindet die Sonde lediglich an die umgebende Region.

Wird im High Resolution Melting analysiert, bei welcher Temperatur sich die zuvor gebundene Sonde von der DNA trennt, zeigt sich also abhängig vom Genotyp des SNPs eine bestimmte Schmelzkurve. Insbesondere dann, wenn die Schmelzkurvenanalyse der SNPs, keine eindeutige Zuordnung ermöglicht, ist die Anwendung einer Sonde eine etablierte Methode, um DNA-Proben zu genotypisieren (DeSilva & Blackett, 2007). In der vorliegenden Arbeit wurden die Sonden nach den folgenden Kriterien generiert: Der darzustellende Polymorphismus war in der Mitte der Sonde lokalisiert (DeSilva & Blackett, 2007). Darüber hinaus wurden optimale Bedingungen für die Genotypisierung geschaffen, wenn die Sonde einen 50%igen CG-Gehalt, eine ca. 5°C höhere Schmelztemperatur als die Primer besaß und zwischen 20 und 35 bp lang war (DeSilva & Blackett, 2007). Um zu verhindern, dass die Sonde als Primer fungieren würde, wurde am 3'-Ende ein Phosphat angefügt. Somit war dort kein Ansatzpunkt für die Polymerase mehr verfügbar. Die hier angewandten unmarkierte Sonden, wurden von der Firma Metabion, Planegg/Steinkirchen, bezogen.

### **2.2.3 High-Resolution Melting (HRM)**

Das High-Resolution Melting (HRM) ist eine schnelle, zuverlässige und kostengünstige Methode, mit der Polymorphismen detektiert werden und DNA-Proben genotypisiert werden können (Wittwer, 2009). Bevor die eigentliche HRM-Analyse gestartet werden kann, muss zunächst eine PCR durchgeführt werden. In der PCR wird der Genabschnitt amplifiziert, in dessen Zentrum der zu untersuchende Polymorphismus lokalisiert ist. Die PCR produziert eine hohe Anzahl an doppelsträngigen Amplikons. Nach der PCR eines homozygoten Genotyps liegen diese als Homoduplices vor, bei denen beide Stränge des DNA-Fragments den gleichen Genotyp haben. Bei einem heterozygoten Genotyp bilden sich durch die wiederholte Denaturierung und Hybridisierung in der PCR Heteroduplices. Dabei handelt es sich um DNA-Fragmente, die aus einem Vorwärtsstrang des einen und einem Gegenstrang des anderen Genotyps bestehen (Anglani et al., 1990). Das HRM wird mit dem Produkt der PCR durchgeführt. Durch stetiges Erhöhen der Temperatur kommt es, sobald die Schmelztemperatur des Amplikons erreicht ist, zur Denaturierung der Doppelstränge. Sinn und Zweck des HRM ist es, das Schmelzverhalten der DNA-Stränge in Echtzeit aufzuzeichnen. Das



ist durch die Zugabe eines fluoreszierenden Farbstoffes möglich. Dieser hat die Eigenschaft, nur an doppelsträngige DNA zu binden und nur dann ein starkes Signal abzugeben, wenn er an DNA gebunden ist. Daher kann zu Beginn des HRM während viele doppelsträngige Amplikons vorliegen ein sehr starkes Signal gemessen werden. Mit zunehmender Temperaturerhöhung und folglich zunehmender Denaturierung der Amplikons nimmt das Signal ab. Das Fluoreszenzsignal wird aufgezeichnet und so entsteht eine Schmelzkurve, die die Stärke der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Temperatur darstellt. Die Temperatur, bei der ein Amplikon denaturiert, auch Schmelztemperatur genannt, ist von der Basensequenz des DNA-Abschnitts abhängig. Schmelzkurven von Proben unterschiedlicher Personen, die aber im untersuchten Bereich die gleiche Abfolge von Basen haben, sehen daher gleich aus. Weicht ein Amplikon nur um eine Base von dieser Sequenz ab, so zeigt sich ein anderer Schmelzkurvenverlauf (Erali & Wittwer, 2010). Dieses Phänomen macht man sich bei der Genotypisierung mit HRM zu nutze.

Zunächst wurde das Typisierungsassay in der klassischen PCR im Thermo Cycler getestet. Danach wurde das HRM mit dem Light Cycler 480 High Resolution Melting Master Kit (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim) durchgeführt. Der im Kit enthaltene Master Mix wurde in ein 1,5 ml Tube gegeben. Hinzu kamen je Probe 2,6 µl H<sub>2</sub>O (Ampuwa, Fresenius Kabi, Bad Homburg), sowie eine im Kit enthaltene 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>-Stock Solution, in der Regel so viel, um die als optimal ermittelte Konzentration zu erhalten. Daraufhin wurden die Primer der zu analysierenden PCR-Produkte beigemischt. Hierfür wurden diese mit H<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 10 pmol/µl verdünnt.

**Tabelle 3 Ansatz der PCR im Light Cycler**

PCR-Mix	Menge
DNA	1,0 µl
Master Mix	5,0 µl
H <sub>2</sub> O (Ampuwa)	2,6 µl
MgCl <sub>2</sub> - Stock Solution	1,0 µl
Forward - Primer	0,2 µl
Reverse - Primer	0,2 µl
Gesamtvolumen	10,0 µl

Anschließend wurde jeweils 1 µl Patienten-DNA in die entsprechenden Wells einer 384 Well-Platte (4titude, Berlin) gegeben (Tabelle 3). Für die Versuche, die dem Test der Primer dienen, kamen CEPH-DNAs zum Einsatz. Die Genotypisierung wurde mit der EuroSCA Patienten-DNA durchgeführt. Dem zuvor angesetzten Mix wurden für jede Probe 9 µl Flüssigkeit entnommen und zu der Patienten-DNA hinzupipettiert. Mit der dafür vorgesehenen Klebefolie wurde die 384 Well-Platte verschlossen und bei 1500 Umdrehungen/Minute in der Zentrifuge 2 Minuten lang zentrifugiert, um Rückstände am Plattenrand oder der Folie zu vermeiden. In dem Light Cycler 480 (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim) erfolgte schließlich die Amplifikation und Schmelzung der Proben mit dem Programm Gene Scanning 384I (Tabelle 4).

**Tabelle 4 High-Resolution Melting Program im Light Cycler**

Reaktionsmodus	Dauer (hh:mm:ss)	Zieltemperatur (°C)
Präinkubation	00:10:00	95
Amplifikation	Denaturierung	00:00:10
	Annealing der Primer	65 (-0,5 pro Zyklus auf 53)
	Elongation	72
High-Resolution Melting	Denaturierung	00:01:00
	Annealing der Doppelstränge	40
	High-Resolution Melting	95 (von 50°C + 0,02 °C/s)
Kühlen	00:00:30	40

Mittels des im Master Mix enthaltenen fluoreszierenden Farbstoffes ResoLight high-resolution melting dye konnten die Schmelzkurven aufgezeichnet werden. Die Auswertung und Zuordnung zu Schmelzkurvengruppen wurde anschließend mit der Software Light Cycler480 Software 1.5.0. SP3 (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim) durchgeführt.

#### Optimierung mit MgCl<sub>2</sub>:

Wie unter Troubleshooting im Manual für den Light Cycler 480 High Resolution Melting Master beschrieben, wurde die MgCl<sub>2</sub> Konzentration für Proben, bei denen keine Amplifikation zu detektieren war, oder bei denen nur schwach amplifiziert wurde, als Variable verändert (Roche Diagnostics GmbH, 2008). Die

Versuchsbedingungen sollten hierdurch verbessert werden, da bei veränderter  $MgCl_2$ -Konzentration eine erhöhte Spezifität der Primer möglich war und sich darüber hinaus eine Veränderung des Schmelzpunktes positiv auf das Reaktionsgeschehen würde auswirken können. Die Stoffmenge von  $MgCl_2$  sollte im Bereich zwischen 1,0 mM - 3,5 mM liegen. In jeweils sechs Schritten wurde so nun die optimale Konzentration ermittelt. Im ersten Reaktionsansatz betrug die Stoffmenge von  $MgCl_2$  1,0 mM, diese wurde je um 0,5 mM bis zu 3,5 mM gesteigert.

#### Optimierung mit DMSO:

Eine weitere Möglichkeit, die Amplifikation eines PCR-Produktes im HRM zu steigern, stellte die DMSO-Zugabe dar. In den hier durchgeführten Optimierungsversuchen wurde die höchste empfohlene Menge DMSO eingesetzt, was einem 10%-igen Anteil des Reaktionsgemisches entsprach. Dies sollte laut Erali & Wittwer (2010) besonders sinnvoll bei PCR-Produkten mit einer höheren Schmelztemperatur als  $92^\circ C$  sein, da durch DMSO die Schmelztemperatur leicht gesenkt würde.

#### Anwendung von Sonden:

War das Essay mit obigen Beispielen optimiert worden, sodass Schmelzkurven zu sehen waren, konnte es dennoch sein, dass diese nicht stark genug voneinander abwichen, um einzelne Genotypen sicher voneinander zu unterscheiden. In diesem Falle wurden unmarkierte Sonden angewandt. Bei unmarkierten Sonden handelt es sich um einzelsträngige DNA-Sequenzen, die komplementär zu der Polymorphismusregion sind. Die Stelle des SNP befindet sich in der Mitte der Sonde. Diese wird mit der komplementären Base eines Genotyps generiert und dem Ansatz des HRM hinzugegeben. Die Sonde bindet an alle Polymorphismusregionen, zeigt aber bei unterschiedlichen Genotypen ein anderes Schmelzverhalten (Zhou et al., 2004). In dieser Arbeit wurden symmetrische PCRs getestet, bei denen beide Primer in derselben Konzentration eingesetzt wurden. Ebenso wurden asymmetrische PCRs durchgeführt. Für die asymmetrischen PCRs wurde der Primer, der die Amplifikation des gegengesetzten Stranges der Sonde initiierte, im Verhältnis 2:1, 5:1 sowie 10:1 hinzugegeben, um eine Überproduktion des Stranges zu produzieren, an den die Sonde binden sollte (Gyllensten & Erlich, 1988). Die asymmetrische PCR diente der Effektverstärkung der

Schmelzkurvendifferenzierung.

#### Mischung der DNA:

Eine weitere Möglichkeit, schwierig darstellbare Genotypen sichtbar zu machen, war die Beimischung bekannter DNA (Liew et al., 2004). Bei der Schmelzkurvenanalyse des HRM werden normalerweise drei Schmelzkurvengruppen erwartet, eine Gruppe bestehend aus den homozygoten Proben der häufigeren, eine aus den homozygoten Proben der selteneren Variante des Polymorphismus und eine bestehend aus den heterozygoten Proben. Es ist jedoch möglich, dass sich bei der Analyse eines Polymorphismus in der Schmelzkurvenanalyse eine Aufteilung in nur zwei Gruppen ergibt. Wird dann in der Sequenzierung ermittelt, dass eine Gruppe aus der gut abgrenzbaren Schar der Heterozygoten und die andere Gruppe aus der Schar der Homozygoten besteht, können innerhalb der Gruppe der Homozygoten die einzelnen Schmelzkurven nicht einem der beiden homozygoten Genotypen zugeordnet werden.

Um innerhalb der Gruppe der Homozygoten unterscheiden zu können, bei welchen Proben es sich um die mit der häufigeren und bei welchen es sich um die mit der selteneren Variante des Polymorphismus handelt, kann dann DNA beigemischt werden. Wie bereits erwähnt, bilden die Amplikons bei einer PCR von heterozygoten Proben Heteroduplexe aus. Der Vorwärtsstrang des PCR-Produktes hat dann einen anderen Genotyp als der Gegenstrang. Dieses Phänomen wird bei der Beimischung der DNA genutzt. Hier wurde zu allen homozygoten DNA-Proben, die genotypisiert werden sollten, eine homozygote CEPH-DNA hinzugegeben. Bei der PCR mit den DNA-Proben, die den gleichen Genotyp wie die beigemischte CEPH-DNA hatten, wurden Amplikons mit Homoduplex gebildet. Bei der PCR mit den übrigen DNA-Proben bildeten sich aufgrund der unterschiedlichen Genotypen von CEPH-DNA und Patienten-DNA Amplikons mit Heteroduplex. Im HRM konnte aufgrund ihres verschiedenen Schmelzverhaltens nun zwischen Amplikons mit Heteroduplex und Amplikons mit Homoduplex unterschieden werden. In der Schmelzkurvenanalyse zeigten sich zwei Gruppen, eine der häufigeren Variante und eine der selteneren Variante des Polymorphismus entsprechend. Um die optimale Menge der hinzuzufügenden DNA zu ermitteln, wurde im Spektrometer die Konzentration der Patienten DNA in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

gemessen. Daraufhin wurde die Konzentration der CEPH-DNA gemessen und auf dieselbe Konzentration verdünnt. In unterschiedlichen Konzentrationen wurden die CEPH-DNA und die Patienten-DNA dem oben beschriebenen HRM Ansatz untergemischt (Tabelle 3). Dabei wurde jeweils die Menge des Wassers angepasst, um bei einem Gesamtvolumen von 10  $\mu\text{l}$  zu bleiben. Es wurden Ansätze mit je 0,5  $\mu\text{l}$  CEPH- und Patienten-DNA, mit je 1  $\mu\text{l}$  CEPH- und Patienten-DNA und mit 1  $\mu\text{l}$  Patienten und 0,5 CEPH-DNA getestet. Für die weiteren Versuche zur Genotypisierung des gesamten Patientenkollektivs wurde mit der Konzentration gearbeitet, die im Test die beste Amplifikation und die stärkste Auftrennung der Genotypen gezeigt hatte.

#### **2.2.4 Sanger-Sequenzierung**

Die Sanger Sequenzierung, auch Kettenabbruchmethode oder Didesoxymethode genannt, ist eine enzymatische Methode, um DNA schnell und zuverlässig zu sequenzieren (Sanger et al., 1977). Sie wurde erstmals im Jahr 1977 von Frederick Sanger angewandt, um das Erbgut eines Bakteriophagen komplett zu entschlüsseln und ist seitdem eine etablierte Methode der DNA-Sequenzierung. Anders als bei einer PCR, findet durch die eingesetzte DNA-Polymerase die Amplifikation nur eines der komplementären Stränge statt, weswegen nur ein Primer eingesetzt wird. Die Reaktion verläuft in drei Zyklen. Zunächst erfolgt die Denaturierung der eingesetzten Matrize, im nächsten Schritt erfolgt das Annealing eines Primers und im letzten Schritt findet die Elongation der DNA statt. Der DNA-Polymerase stehen dabei nicht nur dNTPs für die Verlängerung des Stranges zur Verfügung, sondern in geringer Konzentration auch ddNTPs. Die Didesoxynucleosidtriphosphate tragen am 3'-Ende keine OH-Gruppe. Daher wird die Elongation der in 5'-3' arbeitenden DNA-Polymerase abgebrochen, sobald ein ddNTP eingebaut wird. Nach 30 Zyklen liegen Kettenabbruchprodukte sämtlicher Länge vor, die an ihrem Ende jeweils ein ddNTP tragen. Die Produkte werden in einer Gelelektrophorese nach Größe aufgetrennt (Sanger et al., 1977). Für die in dieser Arbeit analysierten SNPs kam die Kapillarelektrophorese zum Einsatz. Bei dieser Methode werden die ddNTPs mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die DNA-Stränge werden der Länge nach durch eine Kapillare geleitet und die fluoreszierenden ddNTPs durch einen Laser angeregt. Der Abfolge der vier

verschiedenen Farbspektren entsprechend, wird nun die DNA-Sequenz detektiert (Beckman Coulter, 2004).

Um in der vorliegenden Arbeit eine Schmelzkurvengruppe nach dem HRM einem bestimmten Genotyp zuzuordnen, wurden aus jeder Gruppe eine Probe zur Sequenzierung ausgewählt. Bei erfolgreicher Sequenzierung wurde das Ergebnis mit mindestens einer weiteren Probe überprüft. Mit den ausgewählten Proben wurde erneut eine PCR durchgeführt, um den gewünschten Abschnitt zu amplifizieren. Um eine exaktere Amplifikation der DNA-Sequenzen zu ermöglichen, wurde eine Hot-Start-PCR angewandt (Tabelle 5, Tabelle 6). Der Vorteil der Hot-Start Polymerase (FastStart Taq Polymerase, dNTPack, Roche Diagnostic GmbH, Mannheim) besteht darin, dass die Anzahl an amplifizierten Nebenprodukten geringer ausfällt (Birch et al., 1996). Das Enzym liegt bei Raumtemperatur in einem inaktiven Zustand vor und muss durch zehninminütige Präinkubation aktiviert werden. Erst danach kann eine PCR erfolgen.

**Tabelle 5 Ansatz der Hot-Start-PCR**

<b>PCR-Mix:</b>	<b>Menge</b>
Patienten-DNA	1,0 µl
FastStart Puffer (10x)	2,0 µl
2 mM dNTP	1,6 µl
Forward-Primer	1,0 µl
Reverse-Primer	1,0 µl
FastStart Taq Polymerase,	0,125 µl
H <sub>2</sub> O (Ampuwa),	13,3 µl
Gesamtvolumen	20,0 µl

**Tabelle 6 Programm der Hot-Start-Touchdown-PCR im Thermo Cycler**

<b>Reaktionsmodus</b>	<b>Zyklen</b>	<b>Dauer – Temperatur</b>
Präinkubation	1 x	10 min - 94°C
Denaturierung	10 x	1 min - 94°C
Annealing		1 min - 65°C (-1°C pro Zyklus)
Amplifikation		1 min - 68°C
Denaturierung	25 x	1 min - 94°C
Annealing		1 min - 55°C
Amplifikation		1 min - 68°C
	1 x	6 min - 68°C

War die Sequenzierung mit diesem Ansatz nicht erfolgreich, wurde als Template die zur HRM-Analyse amplifizierte DNA eingesetzt. Dieses Vorgehen gewährleistete eine höhere Konzentration des gesuchten Bereiches. Nach Vollendung der PCR im Thermo Cycler wurden die Reaktionsprodukte, die die DNA desselben Patienten enthielten, in 0,5 ml Stripes umpipettiert. Das Volumen betrug nun 40 µl je Patienten-DNA. Um zu kontrollieren, ob tatsächlich eine erfolgreiche PCR durchgeführt worden war, wurde jeweils 1/10 der Proben nach oben beschriebenen Vorgehen auf ein 1,5% Agarosegel aufgetragen.

#### DNA Aufbereitung aus dem PCR-Produkt

Das Template für die Sanger-Sequenzierung wurde direkt aus dem PCR-Produkt gewonnen, wenn in der Gelelektrophorese die gesuchten Banden deutlich und ohne Nebenbanden zu sehen waren. Für die Sanger-Sequenzierung musste das Reaktionsgemisch der PCR aufgereinigt werden. Primer, Polymerase, Polymerasepuffer und dNTPs der vergangenen PCR wurden durch den im Folgenden beschriebenen Aufreinigungsprozess entfernt. Hierfür wurden von dem „Agencourt AMPure“-Mix (Agencourt Bioscience Corporation, Beckman Coulter, Krefeld) jeweils 72 µl zu den vorhandenen 40 µl Reaktionsprodukt pipettiert und mit der Pipettenspitze zehnmal gemischt (Agencourt AMPure Protocol). So war eine homogene, braune Farbe zu erkennen. In diesem Schritt wurden Basenpaare, von einer Länge 100 bp oder mehr, an die Magnetic Beads gebunden (Agencourt AMPure Protocol). Bei Raumtemperatur wurden die Proben 3-5 Minuten inkubiert. Danach wurden die Stripes auf eine magnetische Agencourt SPRIPlate 96R (Agencourt Bioscience Corporation, Beckman Coulter, Krefeld) gestellt. Nach fünf- bis zehnminütiger Inkubationszeit erklärte die Lösung und es zeigte sich ein kupferfarbener, ringförmiger Niederschlag an der den Magneten zugewandten Innenseite der Stripes. Während sich die Stripes noch auf der Agencourt SPRIPlate befanden, wurde die Flüssigkeit abpipettiert, sodass sich nur noch der Ring im Gefäß befand. Im nächsten Schritt wurde die DNA zweimal hintereinander mit einer zuvor angesetzten 70%-igen Ethanol Lösung (Sigma Aldrich / Merck KGaA, Darmstadt) ausgewaschen und jeweils 30 Sekunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abpipettieren des Ethanols wurden die Proben nun mit geöffnetem Deckel 10-20 Minuten getrocknet. Während des gesamten

Reinigungsprozesses befanden sich die Strips auf der Magnetplatte. Die Proben, nun innerhalb des getrockneten Kupferrings des Gefäßes gebunden, wurden unter wiederholtem Pipettieren mit 40 µl TE-Puffer vermischt, bis eine homogene Flüssigkeit vorlag (Agencourt AMPure Protocol). Auch dieser Mischung wurde nun 1/10, also 4 µl entnommen und zur Überprüfung der Aufreinigung auf ein 1,5%-iges Agarose-Gel aufgetragen. Im nächsten Schritt erfolgte die Vorbereitung für das Thermo Cycling.

#### DNA Aufbereitung aus dem Agarose-Gel

Waren in der Gelelektrophorese neben der gesuchten Bande weitere Nebenbanden zu sehen, so wurde ein präparatives Agarosegel angefertigt. Um die unterschiedlichen Banden so deutlich wie möglich voneinander abgrenzen zu können, wurde ein großes Gel mit 80 ml gegossen. Dies gewährleistete eine große Laufstrecke und einen großen Abstand zwischen den Taschen, in denen Material aufgetragen wurde. Dafür wurde nicht wie im Falle des oben beschriebenen Agarosegels ein TBE- sondern der TAE-Puffer angewendet. Als nächstes wurde das PCR-Produkt, wie beschrieben, für das Auftragen auf ein Gel vorbereitet. Da Ziel der Elektrophorese die Extraktion von DNA aus dem Agarosegel war, musste für die Gelelektrophorese eine möglichst große Menge DNA verwendet werden. Dementsprechend setzte sich das Gemisch, das auf das Gel aufgetragen wurde, aus 30 µl PCR-Produkt und 3 µl zehnfach verdünntem Ladepuffer zusammen. Dieses wurde nach Erkalten des Gels in dessen Taschen eingebracht, in die Tasche des Markers wurden wie gewöhnlich 5 µl pUC19 DNA/Mspl (HpaII) Marker eingefüllt. Nach ausreichender Laufzeit, die sich dadurch definierte, dass die Banden mit deutlichem Abstand voneinander abzugrenzen waren, wurde ein Bild des Gels unter UV-Bestrahlung geschossen. Dabei wurde der Zustand vor Ausschneiden der Geltaschen dargestellt und somit die Information über die Lage der Banden erhalten. Danach wurde das Gel auf eine UV-Platte gelegt und die zu sequenzierenden Banden unter möglichst kurzer Bestrahlung ausgeschnitten. Die Banden wurden anschließend bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert.

Zur Extraktion des PCR-Produktes aus dem Agarose-Gel wurde das QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen, Hilden) angewandt. Zuerst erfolgte die Zugabe von



darin enthaltenem Buffer-QG. Um dessen benötigte Menge zu bestimmen, wurde die Menge des Gels gewogen. Grundannahme für die nächsten Schritte war, dass 100 mg Gel einem Buffer-QG Volumen von 100 µl entsprächen. Dem Gel wurde das Dreifache des ihm entsprechenden Volumens an Buffer-QG hinzugegeben. Die bei 50°C durchgeführte Inkubation in einem Wärmeinkubator erfolgte so lange, bis eine vollständige Lösung des Gels zu beobachten war. Diesem Gemisch wurde das, dem zuvor gemessenen Gewicht des Gels entsprechende, einfache Volumen an Isopropanollösung (Sigma Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt) beigemischt. Diese Lösung wurde in eine QIAquick spin column gegeben, die zuvor in ein 2 ml Tube des Kits gesetzt worden war. Das befüllte Zentrifugensäulchen wurde 1 Minute zentrifugiert. Der aufgefangene Säulendurchfluss wurde verworfen. Um ein besonders sauberes Produkt für die Sequenzierung zu erhalten, wurde dieser Vorgang wiederholt. Daraufhin wurde in die Säule 750 µl Buffer-PE gefüllt und diese erneut 1 Minute zentrifugiert. Auch dieser Überstand wurde verworfen und die Säule zur Elution in ein neues Tube gestellt. Hierfür wurde 30 µl Elutionspuffer Buffer-EB auf den Mittelpunkt der Säule pipettiert und diese wieder 1 Minute zentrifugiert. Der Überstand stellte das Fluat der aufgereinigten DNA dar (Quiagen, 2015). Ein Zehntel dieser Lösung wurde zur Kontrolle auf ein TBE-Agarosegel gegeben. Anschließend erfolgte die Konzentrations- und Mengenbestimmung für das Thermo Cycling.

#### Vorbereitung der DNA zur Sequenzierung

Da es sich um aufgereinigte PCR-Produkte handelte, mussten 25-100 fmol der entsprechenden DNA verwendet werden (Beckman Coulter, 2004). Um abzuschätzen, wie viele ml der Lösung eingesetzt werden sollten, um diese Bedingung zu erfüllen, lag eine Tabelle vor „Table for estimating the dsDNA concentration“. Wie viele ng in einem µl vorhanden waren, ließ sich mit Hilfe des Markers abschätzen. Die Konzentration von pUC19 DNA/Mspl (HpaII) Marker in den entsprechenden Banden war bekannt. Indem die Stärke der Intensität der aufgetragenen PCR-Probe mit der Intensität des Markers verglichen wurde, konnte die Konzentration der DNA abgeschätzt werden. War die Intensität des PCR Produktes beispielsweise dreimal stärker, als die entsprechende Bande des Markers, war davon auszugehen, dass dieses somit in dreifach höherer Konzentration als

der Marker vorlag.

Daher ließ sich ermitteln, wie viel  $\mu\text{l}$  der DNA eingesetzt werden mussten, um die für die Sequenzierung erforderliche Konzentration zu erhalten. Unter Anwendung des DTCS-Quickstart Mastermix (Beckman Coulter Company, Krefeld) wurde ein Thermo Cycling Mix hergestellt (Tabelle 7).

**Tabelle 7 Zusammensetzung des Thermo Cycling Mixes für die Sanger- Sequenzierung**

	<b>x <math>\mu\text{l}</math></b>
Aufgereinigte DNA	
DTCS-Quickstart Mastermix	4,0 $\mu\text{l}$
Primer	0,3 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O (Ampuwa)	5- x $\mu\text{l}$

Nach gutem Durchmischen wurde das Gemisch in den Thermo Cycler gegeben und bei einem Programm mit 30 Zyklen bei 96°C in den ersten 20 Sekunden denaturiert. Während der folgenden 20 Sekunden banden die Primer bei 50°C an die DNA und danach wurde die DNA bei 60°C jeweils 4 Minuten lang amplifiziert (Manual DTCS -Quickstart Mastermix). Bei 10°C wurden die Proben nach Durchlaufen des Zyklus solange gekühlt, bis mit der Weiterverarbeitung begonnen werden konnte (Tabelle 8).

**Tabelle 8 Thermo Cycling Programm für die Sanger-Sequenzierung**

<b>Reaktionsmodus</b>	<b>Zyklen</b>	<b>Dauer - Temperatur</b>
Denaturierung	30 x	20s - 96°C
Annealing		20s - 50°C
Amplifikation		4min - 60°C

Die Amplikons wurden nun aufgereinigt, wozu eine Stop-Solution/Glycogen-Mischung hergestellt wurde:

Die Lösung bestand aus 1  $\mu\text{l}$  einer 3 M Natrium-Acetat-Lösung mit pH 5,2 (Sigma Aldrich/Merck KGaA, Darmstadt) und 1  $\mu\text{l}$  einer 100 mM Na<sub>2</sub>-EDTA-Lösung sowie 1,5  $\mu\text{l}$  einer 20 mg/ml Glycogenlösung aus dem Genome Lab DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter Company, Krefeld). In einen 1,5 ml Eppendorf-Tube wurden jeweils 2,5  $\mu\text{l}$  der zuvor angefertigten Stop-Solution/Glycogen-Mixture eingefüllt. Auf diese Lösung wurden nun die 10  $\mu\text{l}$  der Thermo Cycling Reaktion gegeben, die die zu sequenzierende DNA enthielt. Nach sorgfältigem Mischen

wurden jeder Probe 60 µl 95%-iges Ethanol, das zuvor bei -20°C gelagert worden war, zugesetzt. Dieses Gemisch wurde in einer Kühlzentrifuge (Tischzentrifuge Thermo, Centrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg) bei 4°C auf maximaler Beschleunigungsstufe 30 Minuten zentrifugiert. Durch diesen Prozess bildete sich ein Pellet am Boden des Gefäßes, das die zu sequenzierende DNA enthielt. Die überstehende Flüssigkeit wurde verworfen, sodass lediglich das Pellet übrig blieb. Dieses wurde erneut gewaschen. Zu diesem Zweck wurden 200 µl 70%-igen bei -20°C gelagerten Ethanols auf das Pellet gegeben und 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt zweimal durchgeführt. Die überstehende Flüssigkeit wurde abpipettiert und die Gefäße mit den Pellets zum vollständigen Trocknen für 10 Minuten in eine Vakuumzentrifuge (Vakuum Trockengerät, Concentrator 5301, Eppendorf, Hamburg) gegeben. Jedem Pellet wurden 40 µl Sample Loading Solution beigemischt und danach eine Stunde im Dunkeln inkubiert. Nach Durchmischen mit der Pipettenspitze wurde die Lösung in eine Sequenzierplatte gefüllt. Um ein Verdampfen zu verhindern, wurde auf die Flüssigkeit jeweils ein Tropfen Öl aus dem GenomeLab DTCS-Quick Start Kit gegeben. Die Pufferplatte Microplate (Microplate 96b Well PS F-BOTTOM CLEAR, Sigma Aldrich / Merck KGaA, Darmstadt) wurde mit mehreren Tropfen Pufferlösung in der entsprechenden Spur befüllt. Im Sequenzierer (CEQ 8000 Genetic Analysis System, Beckman Coulter, Krefeld) erfolgte die Sequenzierung mit dem Programm LFP1, das für die entsprechende Länge der zu untersuchenden Genabschnitte geeignet war. Die DNA-Abschnitte wurden in einer Kapillargelelektrophorese der Länge nach aufgetrennt und die Basensequenz ermittelt (Beckman Coulter, 2004).

### **2.2.5 Statistische Auswertung**

Ziel der statistischen Auswertung war es, ein Regressionsmodell zu erstellen, um Zusammenhänge zwischen Genotypen und Erkrankungsalter der Patienten zu analysieren. Für die statistischen Tests und deren Auswertung wurde die Software „JMP 12.2.0“ von SAS Institute inc. verwendet. In die Statistik einbezogen wurden nur solche Proben, bei denen der Genotyp bestimmt werden konnte und bei denen das Erkrankungsalter sowie die Länge der CAG-Repeats bekannt war. Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch vermehrtes Vorkommen eines

bestimmten Genotyps innerhalb einer Familie zu verhindern, wurden alle Mitglieder einer Familie im Gesamten als eine einzige Person ohne weitere Familienmitglieder gewichtet. Dafür wurde ein Gewichtungsfaktor für jeden Patienten mit Verwandtschaftsbeziehungen erstellt, der sich aus eins durch die Anzahl der Familienmitglieder berechnen ließ. Also hatte beispielsweise ein Patient aus einer Familie mit vier Mitgliedern einen Gewichtungsfaktor von 0,25, wohingegen ein Patient ohne andere erfasste Familienmitglieder einen Gewichtungsfaktor von 1 hatte. Nach Anwendung der Gewichtungsfaktoren wurden die Daten auf Normalverteilung geprüft. Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde geprüft, ob die Erkrankungsalter und die CAG-Repeatanzahlen innerhalb einer Patientengruppe normalverteilt waren. Mit einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) wurde getestet, ob sich die Mittelwerte der Erkrankungsalter bzw. der CAG-Repeatanzahlen zwischen diesen Gruppen statistisch signifikant unterschieden.

Das Regressionsmodell wurde in der Analyseeinstellung „Fit Modell“ erstellt. Zielgröße auf der y-Achse war das Erkrankungsalter. CAG-Repeatlänge und Genotyp waren die Einflussgrößen, die in Bezug gesetzt wurden. Anhand des damit erstellten Regressionsplots ließ sich ablesen, ob einer oder mehrere Genotypen einen Einfluss auf das Erkrankungsalter hatten und ob es sich dabei um eine signifikante Änderung handelte. Das Signifikanzniveau wurde auf  $\alpha = 0,05$  festgesetzt. Bei einem p-Wert  $< 0,05$  galt das Ergebnis als statistisch signifikant. In den Ergebnissen wurden die p-Werte auf vier Nachkommastellen gerundet. Die Prozentangaben wurden auf ganze Zahlen gerundet. Sämtliche andere Daten wurden auf zwei Nachkommastellen gerundet. Die Grafiken wurden mit Corel Draw x8 erstellt.

### 3. Ergebnisse

Die Spinozerebelläre Ataxie 3 ist eine neurodegenerative Erkrankung, deren Ursache eine CAG-Repeatexpansion im Gen *ATXN3* auf dem langen Arm von Chromosom 14 ist. Diese Trinukleotidexpansion führt dazu, dass im Genprodukt, dem Protein Ataxin3, eine verlängerte Polyglutaminregion entsteht (Kawaguchi et al., 1994). Diese führt zu einer Fehlfaltung des Proteins. Zwar korreliert das Erkrankungsalter der Patienten negativ mit der Anzahl an CAG-Repeats (Ikeda et al., 1996), dennoch zeigen sich bei Individuen mit gleicher CAG-Repeatanzahl sehr unterschiedliche Erkrankungsalter. Ein weiterer Faktor, der sowohl Schwere als auch Erstaufreten der SCA3 beeinflusst, ist die Lokalisation des fehlgefalteten Ataxin3. Bei Gesunden ist Ataxin3 vorwiegend im Cytoplasma lokalisiert. Bei SCA3-Patienten konnten in den Neuronen intranukleäre Einschlusskörper gefunden werden, welche Fragmente des fehlgefalteten Ataxin3 enthalten. Im Tiernodel konnte bereits gezeigt werden, dass die Bildung dieser intranukleären Einschlusskörper mit einem früheren Erkrankungsalter assoziiert ist. Essenziell für die Bildung von Einschlusskörpern sind die Proteine, die das Ataxin3-Fragment über den nukleozytoplasmatischen Transport in den Nukleus befördern (Sowa et al., 2018).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss von SNPs auf das Erkrankungsalter von SCA3-Patienten zu untersuchen. Dazu wurden SNPs in Genen von Proteinen untersucht, die in den nukleozytoplasmatischen Transport involviert sind. Der Fokus wurde auf Proteine gelegt, für die ein Einfluss auf die nukleäre Lokalisation von Ataxin3 bereits bekannt, wie im Falle von KPNA3, oder wahrscheinlich ist (Sowa et al., 2018). Bei einer stärkeren Expression von KPNA3 und anderer am Transport beteiligter Proteine konnte eine erhöhte Ataxin3-Konzentration im Nukleus detektiert werden. Die Expression von Proteinen kann durch Polymorphismen in regulatorischen Regionen verstärkt oder abgeschwächt werden. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit SNPs, die im Gen selbst oder in regulatorischen Regionen der Gene von am Kerntransport beteiligten Proteinen liegen, auf ihren Einfluss auf das Erkrankungsalter untersucht.

### **3.1 Etablieren von Typisierungsassays**

In dieser Arbeit wurden insgesamt acht Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) auf einen möglichen Einfluss auf das Erkrankungsalter von Patienten mit SCA3 untersucht. Die Auswahl der SNPs erfolgte im Rahmen der Promotion der medizinischen Doktorandin cand. med. Annemarie Koebisch, Eberhardt Karls Universität Tübingen (persönliche Mitteilung).

Ein Polymorphismus ist eine Genvariante, bei der das seltenere Allel in mindestens einem Prozent der Bevölkerung vorkommt (Karki et al., 2015). In dieser Arbeit wurde die Analyse auf SNPs beschränkt, deren seltenere Variante mit einer Allelfrequenz von mehr als fünfzehn Prozent vorkommt.

Die untersuchten Polymorphismen sollten entweder in der kodierenden Region oder in der regulatorischen Region der entsprechenden Gene liegen. Es wurden vor allem Polymorphismen in dem 5' untranslatierten Bereich und Polymorphismen in der Promotorregion analysiert. Der Fokus lag vorwiegend auf Polymorphismen, die in der unmittelbar umgebenden Basensequenz an keinen weiteren Polymorphismus angrenzen (Tabelle 9). Die Etablierung der Typisierungsassays erfolgte mit Polymerase-Kettenreaktion (PCR), High-Resolution Melting und Sanger-Sequenzierung.

### Tabelle 9 Übersicht der untersuchten Einzelnukleotidpolymorphismen

Auf einen Einfluss auf das Erkrankungsalter der SCA3 wurden Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) untersucht, die sich in regulatorischen oder kodierenden Regionen von am Kerntransport beteiligten Proteinen befinden.

Anmerkung: Die Angaben zur Lokalisation und Allelfrequenz der SNPs wurden der NCBI SNP Database entnommen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) und sind in Vorwärtsrichtung zum Genom angegeben (5'-3'-Strang). Die Genotyp- und Allelfrequenzen wurden auf zwei Dezimalstellen gerundet. Legende: AF: Allelfrequenz, GF: Genotypfrequenz, SNP: Einzelnukleotidpolymorphismus, TV: Transkriptionsvariante, (-): das Gen ist auf dem Gegenstrang lokalisiert (3'-5'-Strang).

GEN	SNP	LOKALISATION	GF IN EUROPA	AF IN EUROPA
<b>RANBP1</b>	rs713982	Chromosom 22 Intron (TV1) Promotor (TV 2-X6)	0,62 (CC) 0,34 (AC) 0,05 (AA)	0,79 C 0,21 A
<b>IPO8 (-)</b>	rs12809335	Chromosom 12 5'UTR (TV1, X3) Promotor (TV2- X2)	0,59 (CC) 0,36 (CT) 0,05 (TT)	0,77 C 0,23 T
<b>KPNA2</b>	rs62084683	Chromosom 17 Promotor (TV1) 5'UTR (TV2)	0,53 (GG) 0,40 (AG) 0,07 (AA)	0,73 G 0,27 A
<b>IPO4 (-)</b>	rs7146310	Chromosom 14 Missense Exon 16/30	0,54 (GG) 0,39 (AG) 0,07 (AA)	0,74 G 0,27 A
<b>KPNB1</b>	rs4794016	Chromosom 17 5'UTR (TV1, X3) Promotor (TV2-X2)	0,29 (AA) 0,50 (AT) 0,22 (TT)	0,54 A 0,46 T
<b>TNPO1</b>	rs34647	Chromosom 5 5' UTR (TV1) Promotor (TV2-X3)	0,69 (GG) 0,28 (CG) 0,03 (CC)	0,83 G 0,17 C
<b>CSE1L</b>	rs2426109	Chromosom 20 Promotor	0,33 (CC) 0,49 (CG) 0,18 (GG)	0,57 C 0,43 G
<b>KPNA3 (-)</b>	rs11618521	Chromosom 13 Promotor	0,37 (CC) 0,48 (CT) 0,16 (TT)	0,61 C 0,39 T

### **3.1.1 Etablierung eines Typisierungsassays für den SNP rs713982 im *Ran-binding-Protein-1*-Gen (*RANBP1*)**

Bei dem Ran-binding-protein-1 (*RANBP1*) handelt es sich um ein am nukleozytoplasmatischen Transport beteiligtes Protein. Ein Exportin mit Trägermolekül bzw. ein Importin ohne weiteres Molekül wird als Komplex an Ran-GTP gebunden, einem Ran-GTP/GDP Gradienten folgend, aus dem Zellkern ins Zytoplasma transportiert (Hieda et al., 1999; Nachury et al., 1999). Durch die Hydrolyse von Ran-GTP zu Ran-GDP dissoziiert dieser Komplex, woraufhin das Importin für einen erneuten Transport zur Verfügung steht (Bischoff & Görlich, 1997). Normalerweise ist die intrinsische Aktivität der Ran-GTPase, die GTP in GDP hydrolysiert, gering. Allerdings wird die GTPase durch das Protein Ran-GAP1 induziert. Liegt RanGAP1 in Kombination mit *RANBP1* vor, wird diese Hydrolyse um ein Vielfaches beschleunigt (Bischoff et al., 1995). *RANBP1* ermöglicht also einen schnelleren Austausch von Proteinen vom Nukleus in das Zytoplasma.

Das Gen *RANBP1* ist auf Chromosom 22q11.21 lokalisiert (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, 08.04.2019). Mit den folgenden Analysen sollte geprüft werden, ob der Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) rs713982 einen Einflussfaktor für das Erkrankungsalter von SCA3-Patienten darstellt. Rs713982 ist ein Adenin-Cytosin Polymorphismus, der nach den in 4.1 definierten Kriterien ausgewählt wurde. In der europäischen Bevölkerung hat Adenin eine Allelfrequenz von 0,21, Cytosin ist mit einer Frequenz von 0,79 das häufigere Allel. Die Allelfrequenzen sind in Vorwärtsorientierung zum Genom angegeben. Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ist erfüllt. Es sind zehn Transkriptionsvarianten von *RANBP1* bekannt. Rs713982 liegt in der Promotorregion des Gens *RANBP1*, je nach Transkriptionsvariante zwischen ca. 650 und 90 bp upstream des Transkriptionsstarts. Nur bei einer Transkriptionsvariante, Transkriptionsvariante 1, liegt der SNP im Intron 1/5 (Tabelle 10).



### Tabelle 10 Charakteristika des SNP rs713982 im Gen *RANBP1*

Erhebung der Daten von <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (08.04.2019) und <https://genome-euro.ucsc.edu/>, (08.04.2019)

Legende: AF: Allelfrequenz, GF: Genotypfrequenz, TSP: Transkriptionsstartpunkt, TV: Transkriptionsvariante

Lokalisation	Transkriptionsvariante	GF in Europa	AF in Europa
chr22:20117296 Gen: <i>RANBP1</i>	TV 1: Intron 1/5	0,62 (CC)	0,79 C
	TV X4: 92 bp upstream vom TSP	0,34 (AC)	0,21 A
	TV 2,3: 128 bp upstream vom TSP	0,05 (AA)	
	TV X1,X3 262 bp upstream vom TSP		
	TV X5: 468 bp upstream vom TSP		
	TV X6: 470 bp upstream vom TSP		
	TV 4: 657 bp upstream vom TSP		
	TV X2: 662 bp upstream vom TSP		

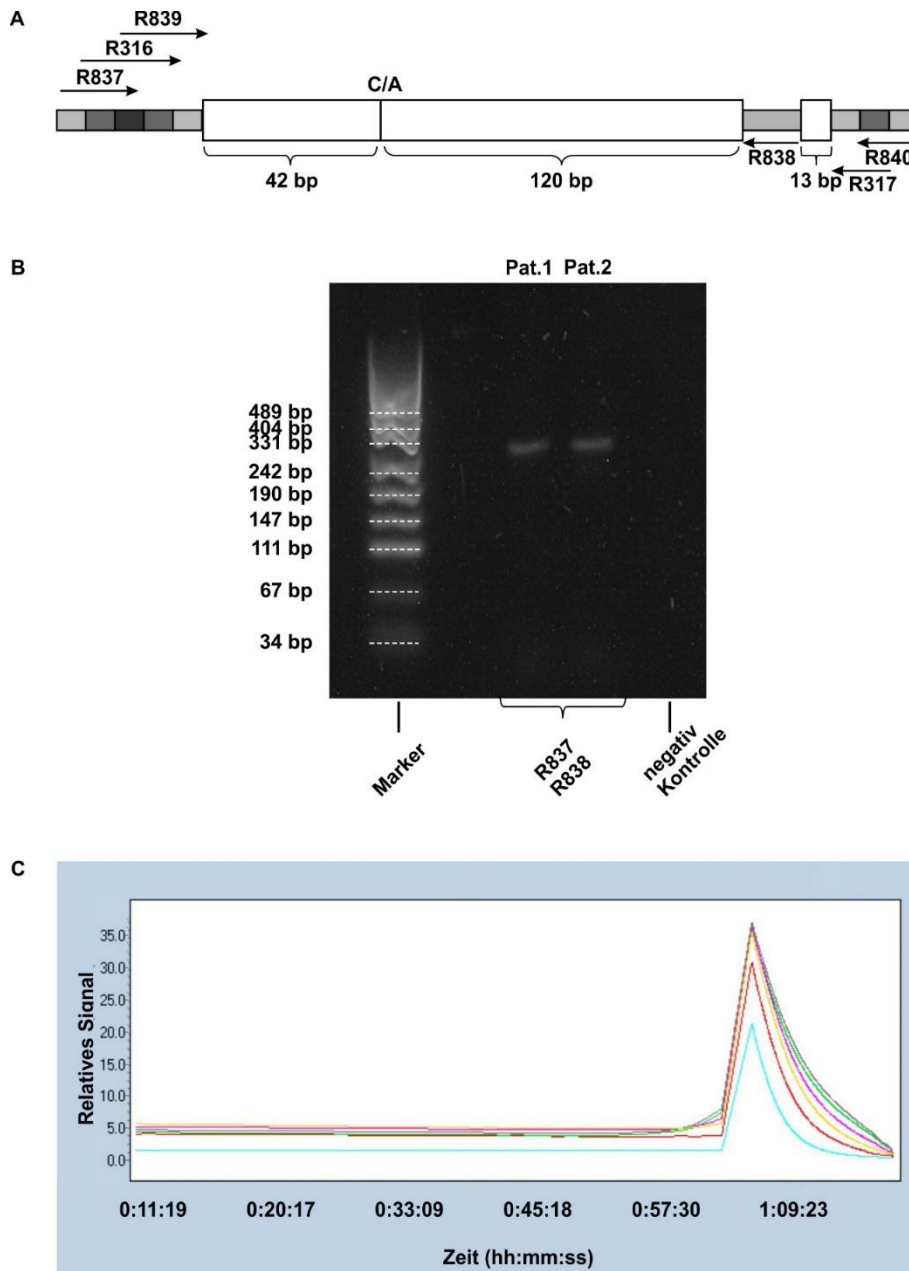
Insgesamt wurden fünf verschiedene Assays mit fünf verschiedenen Primerpaaren getestet. In der PCR im Thermo Cycler ließ sich ein 223 bp langes PCR Produkt mit dem Primerpaar R837 und R838 ohne Nebenbanden amplifizieren. Im Light Cycler war keine für eine Schmelzkurvenanalyse ausreichende Amplifikation des PCR-Produktes nachzuweisen (Abb. 2). Auch die Anwendung von DMSO und unterschiedlicher MgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen erbrachte keine Verbesserung (Tabelle 11). Da es nicht möglich war, weitere Primer zu generieren, die den beschriebenen Anforderungen entsprachen, wurde die Untersuchung dieses Polymorphismus in der vorliegenden Arbeit eingestellt.

### Tabelle 11 Zusammenfassende Betrachtung der Analyse des SNP rs713982 im Gen *RANBP1*

War die Amplifikation in der PCR im Thermo Cycler erfolgreich, wurden zur Etablierung eines Typisierungsassays im HRM verschiedenen Optimierungsversuche angewandt. Bei erfolgreicher Amplifikation im HRM sind die Versuchsbedingungen des Assays angegeben.

Legende: ×: wurde getestet, war aber kein Bestandteil des Typisierungsassays —: wurde nicht getestet

Primerpaar	Produktlänge	MgCl <sub>2</sub> Gradient	DMSO	PCR erfolgreich	HRM
R316_RANBP1_Pro82_F2 R317_RANBP1_Pro82_R2	250	—	—	Nein	nicht durchgeführt
R837_RANBP1_Prom_f R838_RANBP1_Prom_r	223	2,5 mM	×	Ja	Amplifikation nicht ausreichend
R839_RANBP1_Prom_f R840_RANBP1_Prom_r	237	—	—	Nein	nicht durchgeführt
R837_RANBP1_Prom_f R840_RANBP1_Prom_r	258	—	—	Nein	nicht durchgeführt
R839_RANBP1_Prom_f R838_RANBP1_Prom_r	202	—	—	Nein	nicht durchgeführt



**Abb. 2 Etablieren eines Typisierungsassays für den SNP rs713982 im Gen *RANBP1*** **A. Schematische Darstellung der ausgewählten Primer** Zur Genotypisierung des Patientenkollektivs sollte ein Assay etabliert werden. Fünf Kombinationen von 6 verschiedenen Primern wurden getestet. In der Abbildung grau unterlegt sind die Bindungsstellen der Primer. Die Abschnitte mit dunklen Grautönen sind sich überschneidende Bindungsstellen von zwei bzw. drei der getesteten Primer. Weiß sind die Sequenzen, die zwischen den Primern liegen. **B. PCR-Produkt in der Gelelektrophorese** Die Assays wurden in der PCR im Thermo Cycler getestet. Nur bei Einsatz des Primerpaars R837 und R838 war die Amplifikation erfolgreich. Dieser Ansatz erzeugte ein 223 bp langes PCR-Produkt. Als Marker wurde pUC19 verwendet. **C. Amplifikation im Light Cycler** Um das Patientenkollektiv für den SNP rs713982 zu genotypisieren, sollte eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden. Hierfür sollte das PCR-Produkt im Light Cycler amplifiziert werden. Abgebildet ist das detektierte Fluoreszenzsignal im zeitlichen Verlauf der Amplifikation. Es wurde das Assay mit dem Primerpaar R837 und R838 gewählt. Dieses zeigte keine für eine Schmelzkurvenanalyse ausreichende Amplifikation.

### 3.1.2 Etablierung eines Typisierungsassays für den SNP rs12809335 im *Importin-8-Gen (IPO8)*

Importin 8, auch RANBP8 genannt, ist ein Protein, das beim Transportvorgang in den Zellkern beteiligt ist. Es kann in Kombination mit KPNB1 als adaptorähnliches Protein vorliegen (Görlich et al., 1997). Alleine hingegen fungiert es vermutlich als Rezeptor für ein NLS (<http://www.genecards.org>, 25.04.2019), vermittelt aber auch den Import von Proteinen ohne NLS (Volpon et al., 2016; Dean et al., 2001). IPO8 hemmt darüber hinaus auch die intrinsische Aktivität der Ran-GTPase sowie die Ran-GAP. Diese stellen durch die Hydrolyse von GTP in GDP die Energie für den Kerntransport bereit (Görlich et al., 1997). Das Gen *IPO8* ist auf Chromosom 12p11.21 lokalisiert. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, 08.04.2019). In diesem Projekt sollte untersucht werden, ob der SNP rs12809335 einen Einfluss auf das Erkrankungsalter von SCA3-Patienten hat. Bei rs12809335 handelt es sich um einen Cytosin-Thymin-Polymorphismus. In der europäischen Bevölkerung ist Cytosin mit einer Frequenz von 0,77 das häufigere Allel. T kommt mit einer Allelfrequenz von 0,23 seltener vor (Tabelle 12). Die Angaben zum Genotyp beziehen sich auf die Lokalisation in Vorwärtsrichtung zum Genom (5'-3'-Strang). *IPO8* liegt auf dem dazu komplementären Strang (3'-5'-Strang) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, 08.04.2019).

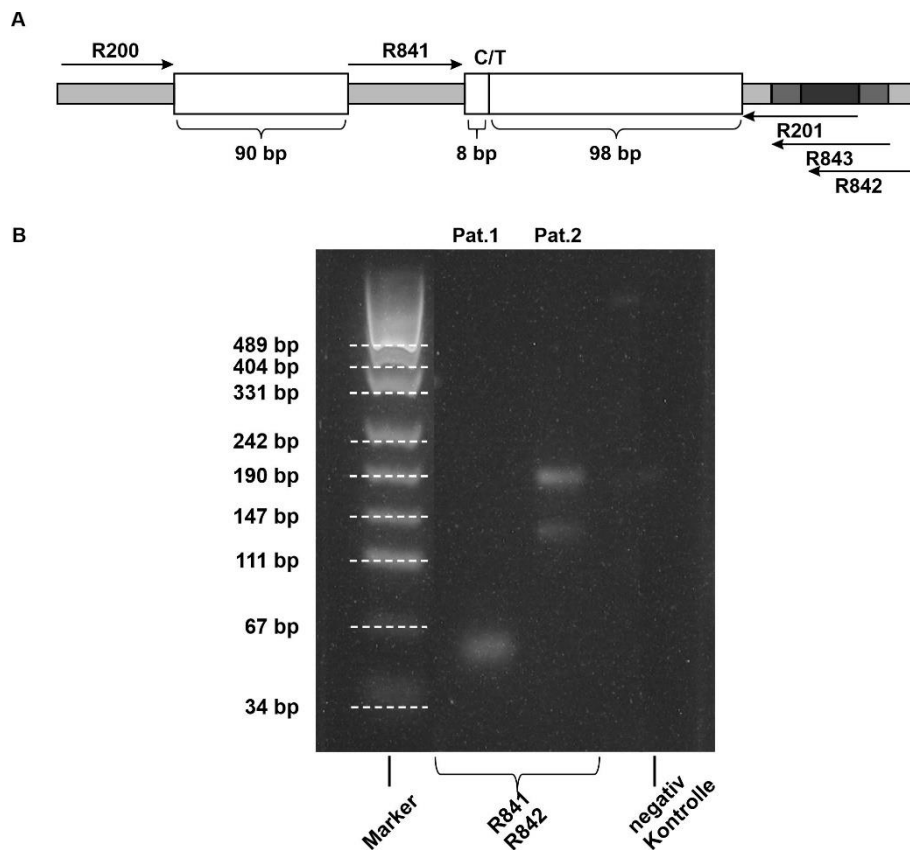
#### **Tabelle 12 Charakteristika des SNP rs12809335 im Gen *IPO8***

Erhebung der Daten von <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, (08.04.2019) und [https:// genome-euro.ucsc.edu/](https://genome-euro.ucsc.edu/), (08.04.2019). Legende siehe Tabelle 9

Lokalisation	Transkriptionsvariante	GF in Europa	AF in Europa
<b>chr12:30695946</b> Gen: <i>IPO8</i> (-)	TV 1,X3: 5'UTR	0,59 (CC)	0,77 C
	TV 2: 18.497 bp upstream vom TSP	0,36 (CT)	0,23 T
	TV X1: 434 bp upstream vom TSP	0,05 (TT)	
	TV X2: 9871 bp upstream vom TSP		

Das Gleichgewicht nach Hardy-Weinberg ist erfüllt. Es sind insgesamt fünf Transkriptionsvarianten von *IPO8* bekannt. rs12809335 ist entweder in der 5'-UTR oder zwischen ca. 10 kB und 18 kB upstream vom Transkriptionsstart lokalisiert (Tabelle 12). Es wurden drei unterschiedliche Assays getestet, anhand derer ermittelt werden sollte, ob der SNP rs12809335 einen modifizierenden Faktor auf das Erkrankungsalter der untersuchten Patientenpopulation darstellte. Bei einem

Assay zeigte sich eine schwache Amplifikation in der PCR im Thermo Cycler. Es wurden allerdings nicht alle Proben amplifiziert und in der Gelelektrophorese waren Nebenbanden zu sehen. Eine zuverlässige Analyse der Patienten-Proben mit den hier angewandten Methoden war nicht möglich (Abb. 3, Tabelle 13).



**Abb. 3 Etablieren eines Typisierungsassays für den SNP rs12809335 im Gen *IPO8***  
**A. Schematische Darstellung der ausgewählten Primer** Um eine Genotypisierung des Patientenkollektivs für den SNP rs12809335 durchzuführen, sollte ein Typisierungsassay etabliert werden. Dafür wurden drei verschiedene Primerpaare getestet. Die Bereiche, an die die Primer binden, sind in der Abbildung grau unterlegt. Überschneiden sich die Bindungsstellen der Primer, so ist dies durch einen dunkleren Grauton gekennzeichnet. Die Sequenzen, die zwischen den Primern liegen, sind in der Abbildung weiß dargestellt. **B. PCR-Produkt in der Gelelektrophorese** In der PCR im Thermo Cycler wurden die Assays mit den verschiedenen Primerpaaren getestet. Eine Amplifikation ließ sich in der Gelelektrophorese nur bei Einsatz des Primerpaars R841 und R842 nachweisen. Allerdings waren nicht alle Proben amplifiziert worden, zudem waren Nebenbanden zu sehen. Dieses Assay sollte ein PCR-Produkt einer Länge von 161 bp erzeugen. Als Marker wurde pUC19 verwendet.

### **Tabelle 13 Zusammenfassende Betrachtung der Analyse des SNP rs1280-9335 im Gen *IPO8***

Zur Etablierung eines Typisierungsassays wurden verschiedenen Primerpaare getestet. Bei erfolgreicher Amplifikation sind die Versuchsbedingungen des Assays angegeben. Legende siehe Tabelle 11

<b>Primerpaar</b>	<b>Produktlänge</b>	<b>MgCl<sub>2</sub> Gradient</b>	<b>DMSO</b>	<b>PCR erfolgreich</b>	<b>HRM</b>
R200_IPO8-UTR35_F1 R201_IPO8-UTR35_R1	229	—	—	Nein	nicht durchgeführt
R841_IPO8_UTR_f R843_IPO8_UTR_r	150	—	—	Nein	nicht durchgeführt
R841_IPO8_UTR_f R842_IPO8_UTR_r	161	—	—	Nebenbanden	nicht durchgeführt

### 3.1.3 Etablierung eines Typisierungsassays für den Einzelnukleotidpolymorphismus rs62084683 im *Karyopherin- $\alpha$ 2*-Gen (*KPNA2*)

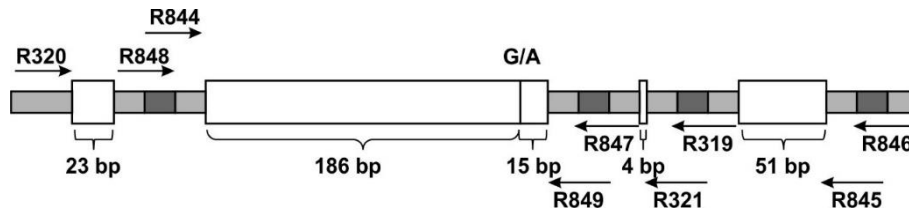
Das Protein KPNA2 ist am Transport in den Zellkern beteiligt, da es ein NLS erkennt und so den Import in den Zellkern ermöglicht (Goldfarb et al., 2004; Stewart, 2007). Das Gen *KPNA2* ist auf Chromosom 17q24.2 lokalisiert (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, 08.04.2019). Bei rs62084683 handelt es sich um einen Adenin-Guanin Polymorphismus. Es sind zwei verschiedene Transkriptionsvarianten bekannt. In der Transkriptionsvariante 1 befindet sich der Polymorphismus rs62084683 ca. 350 bp upstream des Transkriptionsstarts. In der Transkriptionsvariante 2 befindet sich der Polymorphismus in der 5'UTR. In den vorliegenden Quellen zeigte sich für diesen Polymorphismus eine Allelfrequenz von 0,27 für Adenin und 0,73 für Guanin innerhalb der europäischen Bevölkerung (Tabelle 14).

**Tabelle 14 Charakteristika des SNP rs62084683 im Gen *KPNA2***

Daten entnommen von <http://www.genecards.org>, (08.04.2019) und <https://genome-euro.ucsc.edu/>, (08.04.2019). Legende siehe Tabelle 10

Lokalisation	Transkriptionsvarianten	GF in Europa	AF in Europa
<b>chr17:68035609</b> Gen: <i>KPNA2</i>	TV1: Promotor 351bp upstream vom TSP TV2: 5'UTR	0,53 (GG) 0,40 (AG) 0,07 (AA)	0,73 G 0,27 A

Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ist erfüllt. Zur Etablierung eines Typisierungsassays wurden insgesamt sechs Primerpaare getestet (Abb. 4). Zunächst wurde das Primerpaar R320 und R321 an CEPH-DNA getestet, bei dem in der PCR im Thermo Cycler das PCR Produkt einer Länge von 319 bp nicht zu sehen war. Die Primerkombination R320 und R319 zeigte lediglich eine schwache Amplifikation des PCR-Produktes der Länge von 324 bp. Bei der PCR im Light Cycler ließ sich sowohl unter klassischen als auch unter optimierten Bedingungen mit MgCl<sub>2</sub> und DMSO bei der Anwendung von CEPH-DNA keine Amplifikation nachweisen. Auch nach dem Design von neuen Primerpaaren, stellte es sich als schwierig dar, den Bereich um den Polymorphismus zu amplifizieren und sichtbar zu machen. Bei der Anwendung des Primers R844 mit R845 und R846 war nur eine schwache Amplifikation mit starken Nebenbanden zu sehen, bei der Anwen-



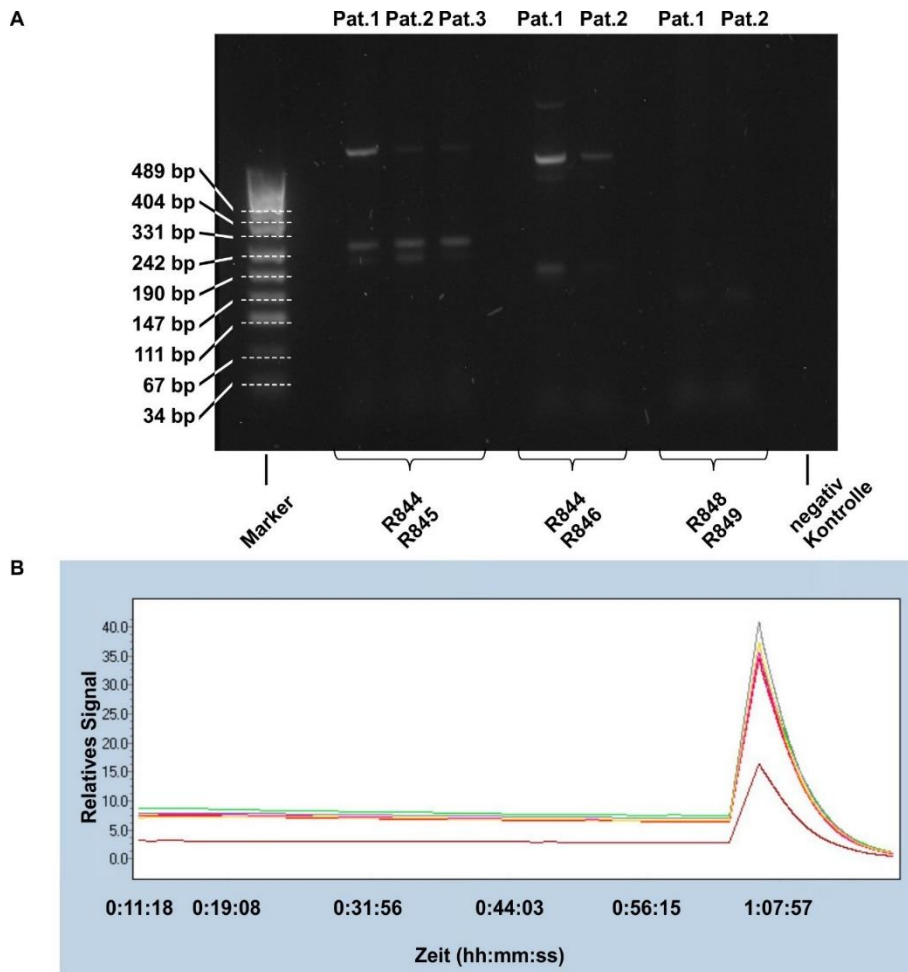
**Abb. 4 Schematische Darstellung der ausgewählten Primer zur Etablierung eines Typisierungsassays für den SNP rs62084683 im Gen *KPNA2*** Um das Patientenkollektiv auf den Polymorphismus rs62084683 zu genotypisieren, sollte ein Typisierungsassay etabliert werden. Dafür wurden Typisierungsassays mit sechs verschiedenen Primerpaaren getestet. Insgesamt kamen neun unterschiedliche Primer zur Anwendung. In der Abbildung sind die Bereiche, an die die Primer binden, grau markiert. Dunklere Grautöne zeigen sich überschneidende Bindungsstellen von unterschiedlichen Primern an. In der Abbildung weiß markiert sind die Sequenzen, die zwischen den Primern liegen.

dung der Primer R844 und R847 war keine Amplifikation zu detektieren (Abb. 5). Das Primerpaar R848 und R849 erzeugte ein 244 bp langes PCR-Produkt, das sich nach der PCR im Thermo Cycler schwach im Agarosegel darstellte. Zwar waren hier keine Nebenbanden zu sehen, aber auch unter optimierten Bedingungen wurde dieses im Light Cycler nicht ausreichend für eine zuverlässige Schmelzkurvenanalyse amplifiziert (Abb. 5, Tabelle 15). Die Genotypisierung für den vorliegenden Polymorphismus wurde mit den hier angewandten Methoden nicht weiterverfolgt.

#### **Tabelle 15 Zusammenfassende Betrachtung der Analyse des SNP rs62084683 im Gen *KPNA2***

Zur Etablierung eines Typisierungsassays wurden verschiedenen Optimierungsversuche angewandt. Bei erfolgreicher Amplifikation sind die Versuchsbedingungen des Assays angegeben. Legende siehe Tabelle 11

Primerpaar	Produktlänge	MgCl <sub>2</sub> Gradient	DMSO	PCR erfolgreich	HRM
R320_KPNA2_5UTR83_F2 R321_KPNA2_5UTR83_R2	319	—	—	nein	nicht durchgeführt
R319_KPNA2_5UTR83_R1 R320_KPNA2_5UTR83_F2	324	2,5 mM	×	sehr schwach	nein
R844_KPNA2_UTR_F R845_KPNA2_UTR_R	349	—	—	Nebenbanden	nicht durchgeführt
R844_KPNA2_UTR_F R846_KPNA2_UTR_R	366	—	—	Nebenbanden	nicht durchgeführt
R844_KPNA2_UTR_F R847_KPNA2_UTR_R	248	—	—	nein	nicht durchgeführt
R848_KPNA2_UTR_F R849_KPNA2_UTR_R	244	2,5 mM	×	schwach	schwach



**Abb. 5 Etablieren eines Typisierungsassays für den SNP rs62084683 im Gen *KPNA2*** **A. PCR-Produkt in der Gelelektrophorese** Zuerst wurden die Assays mit den verschiedenen Primerpaaren in der PCR im Thermo Cycler getestet. Dargestellt sind die Ergebnisse der Assays, die in der PCR deutlich nachweisbare Produkte generierten. Es zeigten sich bei Einsatz der Primerpaare R844 (19 bp) und R845 (20 bp) sowie bei Einsatz der Primerpaare R844 und R846 (19bp) Nebenbanden im Agarosegel. Das Assay mit dem Primerpaar R848 und R849 erzeugte ohne Nebenbanden ein 244 bp langes Amplikon, welches in der Gelelektrophorese schwach nachzuweisen war. Als Marker wurde pUC19 verwendet. **B. Amplifikation im Light Cycler** Um das Patientenkollektiv für den SNP rs62084683 genotypisieren zu können, sollte eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden. Hierfür sollte das PCR-Produkt im Light Cycler amplifiziert werden. Zu sehen ist das de-tektierte Fluoreszenzsignal im zeitlichen Verlauf der PCR. Bei Einsatz des Typisierungsassays mit dem Primerpaar R848 und R849 im Light Cycler ist keine charakteristische Zunahme des Fluoreszenzsignals, die auf eine Amplifikation schließen ließe, zu sehen.



### 3.1.4 Etablierung eines Typisierungsassays für den SNP rs7146310 im *Importin-4-Gen (IPO4)*

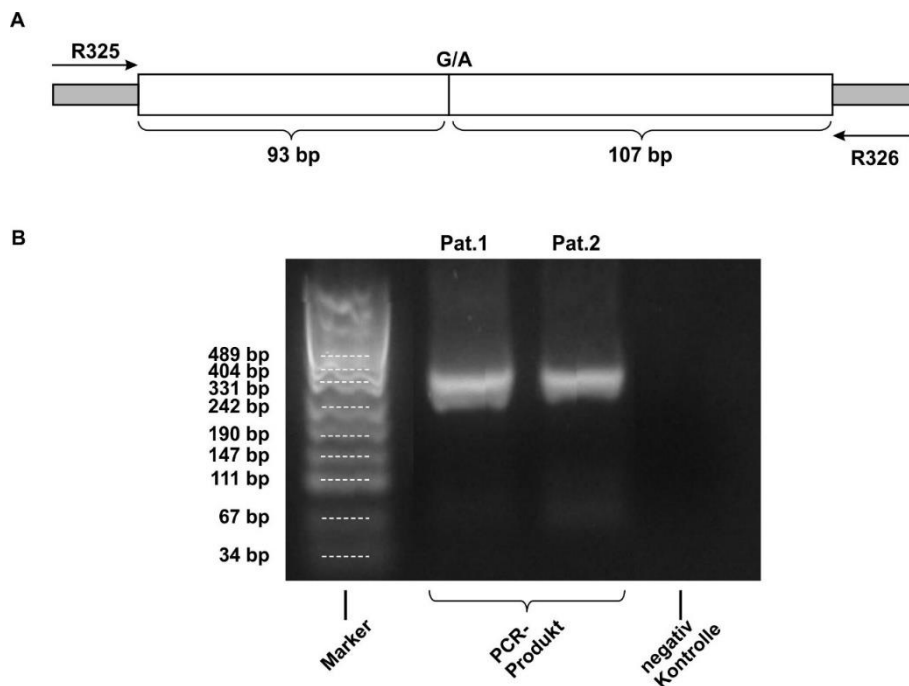
Das Protein IPO4 erkennt das NLS von Transportsubstraten und ist somit von Bedeutung für deren Import in den Nukleus (Jäkel et al., 2002). Des Weiteren wird eine Interaktion des Proteins IPO4 mit der Ran-GTPase vermutet (<http://www.genecards.org>, 25.04.2019). Das Gen *IPO4* ist auf Chromosom 14q12 lokalisiert (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, 08.04.2019). Bei rs7146310 handelt es sich um einen kodierenden Adenin-Guanin Polymorphismus im sechzehnten von insgesamt 30 Exons des Gens *IPO4*. Die Allelfrequenz in der europäischen Population beträgt 0,27 für Adenin und 0,74 für Guanin (Tabelle 16). Die Angaben der Genotypen beziehen sich auf den Strang in 5'-3' Orientierung zum Genom. IPO4 ist auf dem dazu komplementären Strang lokalisiert (3'-5'-Strang) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, 08.04.2019). Anstelle von Adenin findet sich im Gen *IPO4* daher die komplementäre Base Thymin und anstelle von Guanin die komplementäre Base Cytosin. Bei rs7146310 handelt es sich um eine Missensevariante. In der Translation wird bei Vorliegen der Base Thymin die Aminosäure Valin kodiert, bei Vorliegen von Cytosin ist die kodierte Aminosäure Alanin. 11 Basenpaare (bp) upstream ist ein weiterer SNP (rs45484197) lokalisiert. Es handelt sich um einen Cytosin-Thymin Polymorphismus. Die Allelverteilung dieses Polymorphismus in der Europäischen Bevölkerung ist mit 0,93 für C und 0,07 für T angegeben (Tabelle 16). Das Gleichgewicht nach Hardy-Weinberg ist erfüllt.

#### **Tabelle 16 Charakteristika des SNP rs7146310 im Gen *IPO4***

Daten entnommen von <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>, (09.04.2019) und <https://genome-euro.ucsc.edu>. (09.04.2019). Legende siehe Tabelle 9

Lokalisation	GF in Europa	AF in Europa
<b>chr14:24184748</b> Exon 16/30 Missense (Alanin/Valin) Gen: <i>IPO4</i> (-)	0,54 (GG) 0,39 (AG) 0,07 (AA)	0,74 G 0,27 A

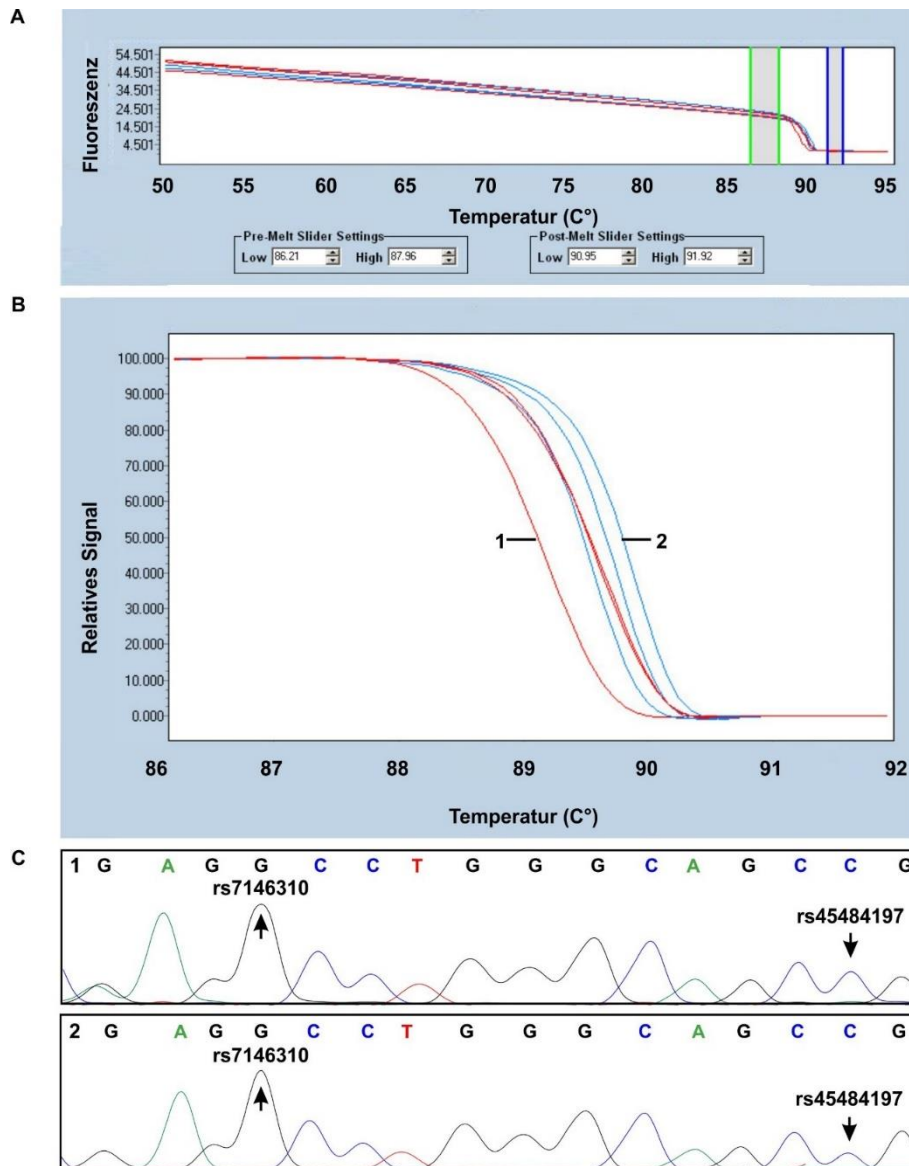
Mit den Primern R325 und R326 ließ sich ein PCR-Produkt einer Länge von 241 bp mit einem GC-Gehalt von 62% unter Anwendung von CEPH-DNA gut in der PCR im Thermo Cycler und ebenfalls gut im Light Cycler amplifizieren. Auch die Amplifikation von Patienten-DNA verlief im Light Cycler erfolgreich (Abb. 6).



**Abb. 6 Etablieren eines Typisierungsassays für den SNP rs7146310 im Gen *IPO4***  
**A. Schematische Darstellung der ausgewählten Primer** Um das Patientenkollektiv auf den Polymorphismus rs7146310 zu gentypisieren, sollte ein Typisierungsassay etabliert werden. Dafür wurden die Primer R325 und R326 angewendet. Die Position der Primer ist grau unterlegt. **B. PCR-Produkt in der Gelelektrophorese** Das Typisierungsassay wurde in der PCR im Thermo Cycler getestet. In der Gelelektrophorese zeigte sich das 241 bp lange Amplikon deutlich. Es waren keine Nebenbanden nachzuweisen. Als Marker wurde pUC19 verwendet.

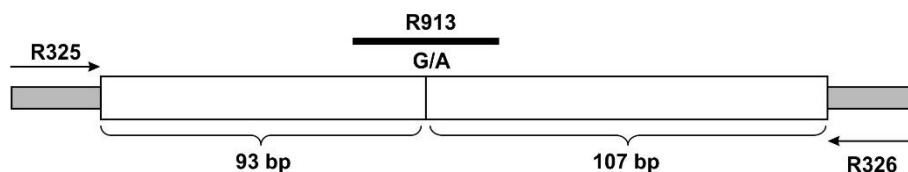
### Schmelzkurvenanalyse für den Polymorphismus rs7146310 im Gen *IPO4*

In der Schmelzkurvenanalyse zeigte sich eine Aufteilung von sechs Proben in zwei Gruppen (Abb. 7). Es wurde aus beiden Gruppen eine Probe sequenziert. Diese waren beide homozygot für G. In einer Analyse von weiteren 16 DNA Proben im Light Cycler zeigte sich eine Aufteilung der Schmelzkurven in vier Gruppen. Im Agarose-Gel der Touchdown-PCR für die Sequenzierung waren Nebenbanden zu sehen. Es erfolgte die Aufreinigung der Banden aus dem Agarose-Gel. Für eine Probe musste dieser Prozess ein weiteres Mal wiederholt werden, da sich auch nach der ersten Aufreinigung noch eine Nebenbande darstellte. Bis auf eine Probe, bei der die entsprechende Stelle der Sequenzierung keiner Base zuzuordnen war, waren alle Proben erneut homozygot für G (Abb. 7).



**Abb. 7 Genotypisierung des Patientenkollektivs für den SNP rs7146310 im Gen IFO4** **A. Ausgewählter Bereich der Schmelzkurvenanalyse** Das in der PCR erfolgreich angewandte Assay konnte für das HRM übernommen und angepasst werden. Dargestellt ist die Fluoreszenzemission der PCR-Produkte bei steigender Temperatur. Die Schmelzkurvenanalyse wurde bei einer Normierung der Bereiche von 86.21°C bis 87.96°C im tieferen Temperaturbereich und einer Normierung von 90.95 °C bis 91.92°C im höheren Temperaturbereich durchgeführt. **B. Schmelzkurvenanalyse** Zu sehen ist das Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit von der Temperatur nach Normierung der Temperaturbereiche. Bei steigender Temperatur nimmt die Fluoreszenz ab, da die Doppelstränge zu Einzelsträngen denaturieren. Die Schmelzkurven der Proben sind in zwei Gruppen mit gleichem Schmelzverhalten aufgeteilt. In der Sequenzierung zeigte sich, dass beide Gruppen homozygote Proben mit Genotyp G/G enthielten. **C. Sequenzierergebnis** Dargestellt ist das Ergebnis der Sanger-Sequenzierung von Proben aus beiden Schmelzkurvengruppen. Bei der oberen Sequenzierung handelt es sich um eine Probe aus der roten Schmelzkurvengruppe, bei der unteren Sequenzierung handelt es sich um eine Probe aus der blauen Schmelzkurvengruppe. Beide Proben waren homozygot für G. 11 bp upstream ist ein weiterer Polymorphismus, rs45484197, lokalisiert, der bei allen Proben in der Sequenzierung homozygot für C war.

Da nicht davon auszugehen war, dass sich die vorliegende Methode der Analyse zur Detektion der Polymorphismen eignete, wurde eine unmarkierte Sonde designed. Die unmarkierte Sonde R913 befand sich auf dem Vorwärtsstrang (Abb. 8). Die Sonde hatte einen GC-Gehalt von 75% und einer Länge von 20 Basenpaaren. R913 wurde an DNA getestet, die sich in vorherigen Versuchen gut amplifizieren ließ. Es wurden Typisierungsassays mit Primern im Verhältnis 1:1, 1:2, 1:5 und 1:10 angewendet, wobei der größere Anteil dem Rückwärtsprimer R326 entsprach, um einen größeren Anteil des Rückwärtsstranges zu amplifizieren, an den die Sonde binden sollte. Erfolgreich war die Amplifikation bei einem Primerverhältnis von 1:1 und 1:2, allerdings konnte kein Binden der Sonde an den entsprechenden Strang festgestellt werden (Abb. 9). Die Genotypisierung des zu untersuchenden Patientenkollektivs war mit den hier angewandten Methoden nicht möglich (Tabelle 17).

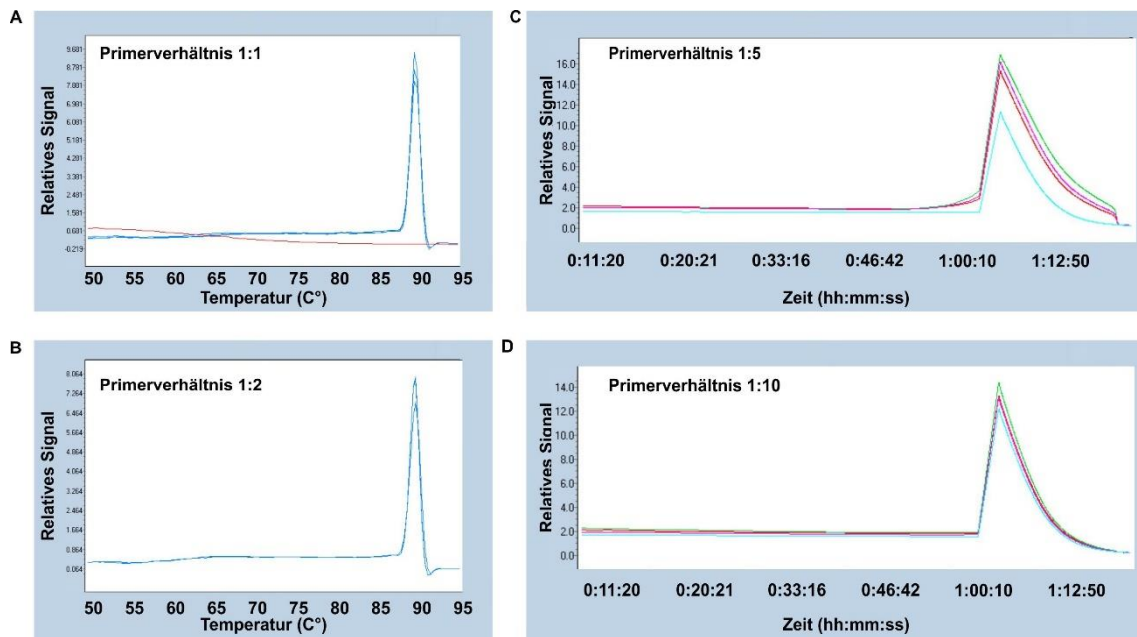


**Abb. 8 Schematische Darstellung der Sonde R913 zur Genotypisierung der Patientenproben für den SNP rs7146310 im Gen *IPO4*** Um das Schmelzverhalten der Patientenproben im High-Resolution Melting abhängig vom Genotyp unterscheiden zu können, wurde eine Sonde generiert. Diese war komplementär zum Rückwärtsstrang und hatte eine Länge von 20 bp.

**Tabelle 17 Zusammenfassende Betrachtung der Analyse des SNP rs7146310 im Gen *IPO4***

Angegeben sind die Bedingungen, die für das Typisierungsassay gewählt wurden. Legende siehe Tabelle 11

Primerpaar	Produktlänge	MgCl <sub>2</sub> Gradient	DMSO	Sonde	HRM
R325_IPO4_mis310_F2 R326_IPO4_mis310_R2	241	2,5 mM	×	R913_IPO4_mis_S-P	Genotypisierung nicht möglich



**Abb. 9 Anwendung der Sonde R913 zur Genotypisierung der Patientenproben für den SNP rs7146310 im Gen *IPO4A*.** **Schmelzkurvenanalyse mit Sonde und Primer im Verhältnis 1:1** Bei gleichem Verhältnis der Primer wurde genug PCR-Produkt amplifiziert, um eine Schmelzkurvenanalyse durchzuführen, welche hier abgebildet ist. Es ist die Ableitung des Fluoreszenzsignals im Verlauf des Temperaturanstieges zu sehen. Es zeigt sich für alle Proben ein Kurvenverlauf, wie er auch bei der Schmelzkurvenanalyse ohne Sonde zu erwarten gewesen wäre. Die Analyse ließ daher darauf schließen, dass kein Binden und Abschmelzen der Sonde stattgefunden hatte. **B. Schmelzkurvenanalyse mit Sonde und Primer im Verhältnis 1:2** Bei Einsatz der Forward- und Reverseprimer im Verhältnis 1:2 war im Light Cycler genug Amplifikation nachzuweisen, um eine Schmelzkurvenanalyse durchzuführen. Es ist die Ableitung des Fluoreszenzsignals im Verlauf des Temperaturanstieges zu sehen. Der Kurvenverlauf lässt auf kein verändertes Schmelzverhalten durch die Sonde schließen. **C. Amplifikation des Typisierungsassays mit Sonde und Primer im Verhältnis 1:5** Hier gezeigt ist die aufgezeichnete Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zeit ab Beginn der PCR. Bei einem Primerverhältnis von 1:5 war nur eine sehr geringe, nicht zur Schmelzkurvenanalyse ausreichende Amplifikation nachzuweisen. **D. Amplifikation des Typisierungsassays mit der Sonde R913 und Primer im Verhältnis 1:10** Es ist die detektierte Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zeit ab Beginn der PCR dargestellt. Auch bei einem Primerverhältnis von 1:10 zeigte sich keine für die Schmelzkurvenanalyse ausreichende Amplifikation.

### 3.1.5 Etablierung eines Typisierungsassays für den SNP rs4794016 im *Karyopherin-β1*-Gen (*KPNB1*)

Auch das Protein Karyopherin-β1 (*KPNB1*) ist an dem Transport durch den NPC maßgeblich beteiligt. *KPNB1* bildet einen Komplex mit dem Importin und dessen Cargo-Protein und dockt diese an den NPC an. Im Folgenden wird der Komplex Ran-GTPabhängig in den Nucleus transportiert (Jäkel et al., 1999; Jäkel & Gürlich, 1998; Mingot et al., 2009). Das Gen *KPNB1* liegt auf Chromosom 17q21.32. Es sind zwei Transkriptionsvarianten bekannt. Der SNP rs4794016 ist ein Adenosin-Thymin Polymorphismus, der sich in der Promotorregion von *KPNB1* befindet. Bei der Transkriptionsvariante 1 ist der rs4794016 ca. 1500 bp upstream des Transkriptionsstarts lokalisiert. Bei der Transkriptionsvariante 2 liegt der SNP ca. 1000 bp upstream des Transkriptionsstarts. Das Allel Adenin kommt mit einer Frequenz von 0,54 in der europäischen Bevölkerung häufiger vor, als Thymin mit einer Frequenz von 0,46 (Tabelle 18). Das Gleichgewicht nach Hardy-Weinberg ist erfüllt.

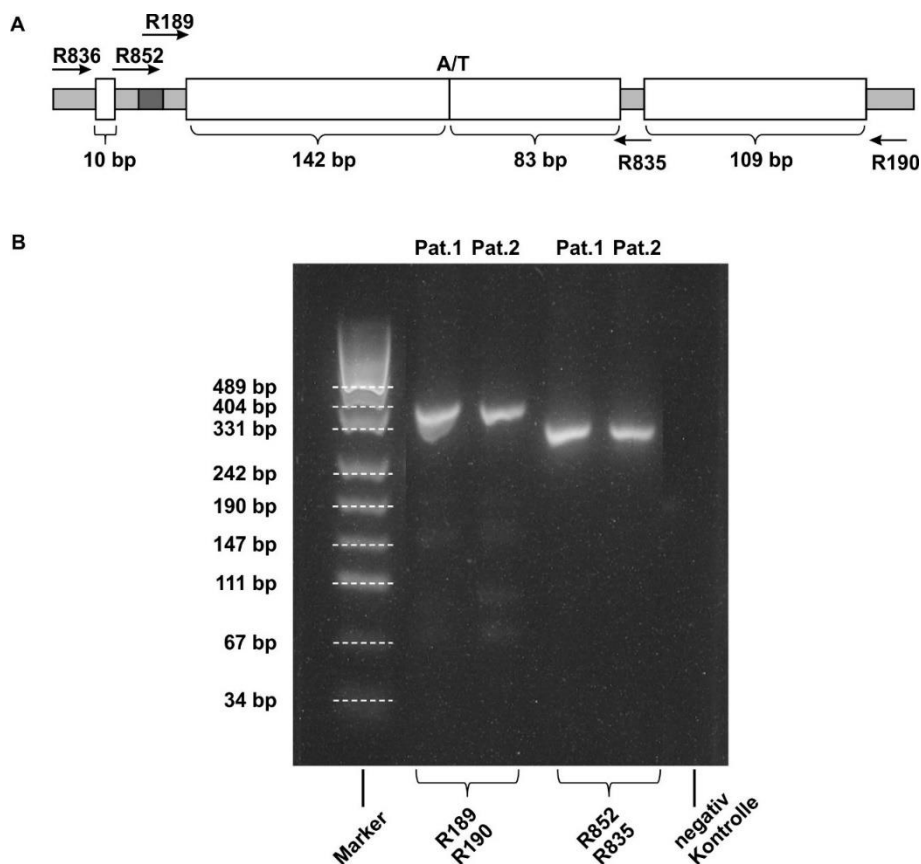
**Tabelle 18 Charakteristika des SNP rs4794016 im Gen *KPNB1***

Daten entnommen von <https://genome-euro.ucsc.edu/>, (08.04.2019) und [https:// www.ncbi.nlm.nih.gov](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/), (08.04.2019). Legende siehe Tabelle 10

Lokalisation	Transkriptionsvariante	GF in Europa	AF in Europa
chr17:47648565 Gen: <i>KPNB1</i>	TV1: 1273 bp upstream vom TSP	0,29 (AA)	0,54 A
	TV2: 2631 bp upstream vom TSP	0,50 (AT) 0,22 (TT)	0,46 T

Um zu prüfen, ob der Genotyp für rs4794016 einen Einfluss auf das Erkrankungsalter der SCA3-Patienten hat, wurden insgesamt drei verschiedene Genotypisierungsassays getestet. Die Primerpaarkombination R836 und R835 sollte ein 297 bp langes PCR-Produkt amplifizieren. Es zeigten sich trotz Optimierungsversuch mit DMSO und Veränderung der MgCl<sub>2</sub> Konzentration starke Nebenbanden im Agarosegel. Die Genotypisierung der Patienten auf den Polymorphismus rs4794016 wurde mit diesem Assay daher nicht weiterverfolgt. Im Ansatz mit der Primerpaarkombination R189 und R190 wurde ein PCR-Produkt mit einer Länge von 387 bp amplifiziert. Es ließ sich sowohl nach der PCR im Thermo Cycler sowie nach der Amplifikation im Light Cycler unter Anwendung von CEPH-DNA

ein Amplifikationsprodukt nachweisen. In der Gelelektrophorese waren leichte Nebenbanden zu sehen. Wurde das Typisierungsassay im Light-Cycler mit Patienten-DNA geprüft, so zeigte sich auch nach Ermittlung der optimalen  $MgCl_2$ -Konzentration und Anwendung von DMSO nur bei weniger als 20% der Proben eine Amplifikation. Dieses Assay eignete sich nicht zur Genotypisierung des Patientenkollektivs. Im Ansatz mit dem Primerpaar R852 und R835 funktionierte die Amplifikation des 267 bp langen PCR-Produktes in der PCR im Thermo Cycler und im Light Cycler zuverlässig (Abb. 10). Daher wurde dieses Assay für die Typisierung gewählt.



**Abb. 10 Etablieren eines Typisierungsassays für den SNP rs4794016 im Gen *KPNB1*** **A. Schematische Darstellung der ausgewählten Primer** Für die Genotypisierung sollte ein Assay etabliert werden. Drei verschiedene Primerpaare wurden getestet. Die Bindungsstellen der Primer sind in der Abbildung grau unterlegt. Dunklere Grautöne zeigen sich überschneidende Bindungsstellen unterschiedlicher Primer an. Weiß sind die zwischen den Primern liegenden Sequenzen. **B. PCR-Produkt in der Gelelektrophorese** Das Assay wurde in der PCR im Thermo Cycler getestet. Das Assay mit dem Primerpaar R189 und R190 erzeugte ein 387 bp langes Amplikon mit leichten Nebenbanden. Das Assay mit dem Primerpaar R852 und R835 zeigte in der Gelelektrophorese ein 267 bp langes Amplikon ohne Nebenbanden. Als Marker wurde pUC19 verwendet.

### Schmelzkurvenanalyse für den Polymorphismus KPNB1 rs4794016:

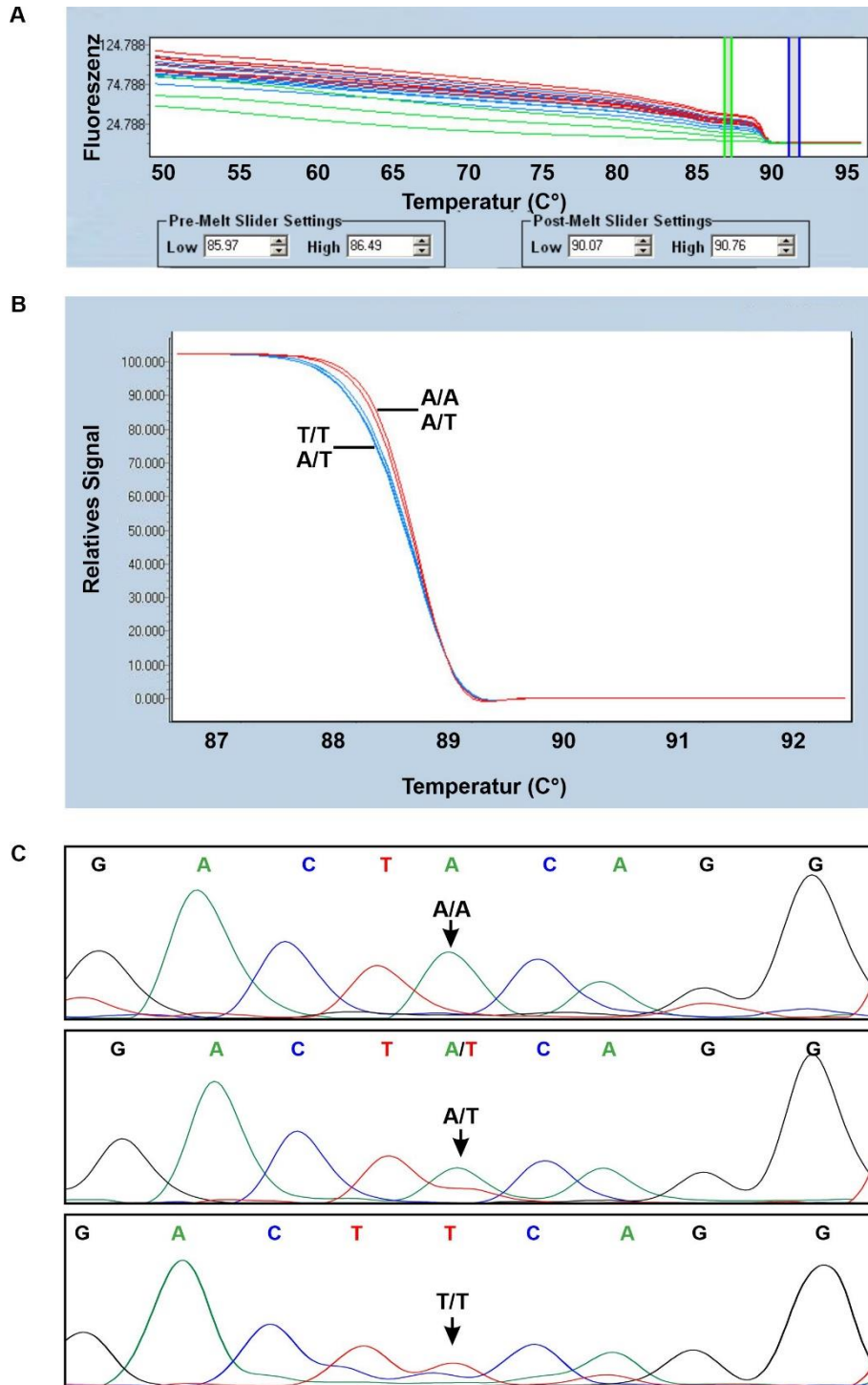
In der Schmelzkurvenanalyse zeigte sich eine Aufteilung der Kurven in 2 Gruppen (Abb. 11). In der roten Schmelzkurvengruppe befanden sich sowohl homozygote Proben mit Genotyp A/A als auch heterozygote Proben mit Genotyp A/T. In der blauen Gruppe befanden sich ebenfalls sowohl heterozygote Proben als auch homozygote Proben mit Genotyp T/T (Abb. 11). Da beide Gruppen keinem Genotyp eindeutig zuzuordnen waren, ließ sich daraus schließen, dass mit dieser Methode eine Genotypisierung des Patientenkollektivs nicht möglich sein würde. Daher wurde eine unmarkierte Sonde designt. Die Sonde R920 wurde komplementär zu dem Rückwärtsstrang der um den Polymorphismus liegenden DNA-Region generiert. Der CG-Gehalt betrug 55% bei einer Länge von 29 Basenpaaren. Es wurden sowohl symmetrische als auch asymmetrische PCRs getestet. Für die asymmetrische PCR wurde im Verhältnis weniger Vorwärtsprimer eingesetzt, um eine Überproduktion des Rückwärtsstranges zu bewirken, an dem die Sonde binden sollte. Bei einem Primerverhältnis von 1:2, 1:5 und 1:10 war keine Amplifikation zu sehen. Es zeigte sich lediglich bei der symmetrischen PCR mit einem Primerverhältnis von 1:1 eine minimale Amplifikation, welche jedoch nicht zur Durchführung einer Schmelzkurvenanalyse ausreichend war (Abb. 12). Es war also auch mit der Sonde unter den gegebenen Voraussetzungen keine Zuordnung der Schmelzkurvengruppen einem bestimmten Genotyp möglich. Daraus ließ sich schließen, dass mit den hier angewandten Methoden keine Genotypisierung der Patienten für den Polymorphismus rs4794016 im *Karyopherin-β1* Gen möglich war (Tabelle 19).

#### **Tabelle 19 Zusammenfassende Betrachtung der Analyse des SNP rs4794016 im Gen *KPNB1***

Angegeben sind die Bedingungen, die für das Typisierungsassay gewählt wurden. Legende siehe Tabelle 11

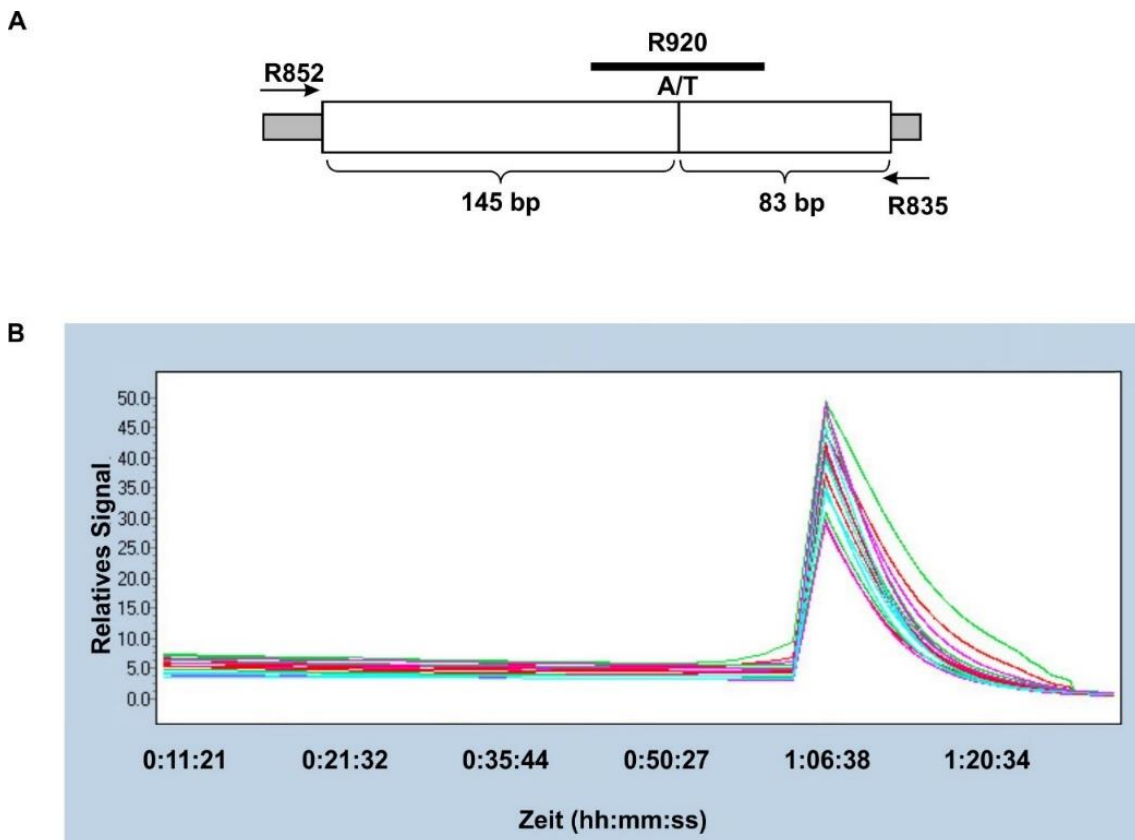
Primerpaar	Produktlänge	MgCl <sub>2</sub> Gradient	DMSO	Sonde	HRM
R835_KPNB1_Prom_R R836_KPNB1_Prom_F	297	—	—	—	nicht durchgeführt
R189_KPNB1-Prom16-F1 R190_KPNB1-Prom16-R1	387	2,0 mM	×	—	<20% d. Proben amplifiziert
R852_KPNB1_Prom_F R835_KPNB1_Prom_R	267	2,5 mM	×	R920_KPNB1_Sonde_F	Genotypisierung nicht möglich





**Abb. 11 Genotypisierung des Patientenkollektivs für den SNP rs4794016 im Gen *KPNB1*** **A. Ausgewählter Bereich der Schmelzkurvenanalyse** Mit HRM sollten DNA-Proben der SCA3-Patienten-DNA genotypisiert werden. Zu sehen ist das Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit von der steigenden Temperatur. Es wurde eine Normierung aller Schmelzkurven in den Temperaturbereichen gewählt, bei denen die deutlichste Unterteilung der Kurven in Gruppen zu sehen war. Die Schmelzkurven wurden im tieferen Temperaturbereich zwischen 85,97°C und 86,94 °C normiert. Im höheren Temperaturbereich erfolgte die Normierung zwischen 90,07°C und 90,76 °C. **B. Schmelzkurvenanalyse** Hier abgebildet ist die Schmelzkurvenanalyse nach Normierung der

Temperaturbereiche. Zu sehen ist die detektierte Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Temperatur. Je höher die Temperatur, desto geringer ist das Fluoreszenzsignal. Es zeigte sich eine Aufteilung der Schmelzkurven in zwei Gruppen. Die Sequenzierung ergab, dass die blaue Schmelzkurvengruppe Proben mit Genotyp T/T und A/T enthielt. Die rote Schmelzkurvengruppe bestand aus Proben mit Genotyp A/A und A/T. **C. Sequenzierergebnis** In der oberen Kurve dargestellt ist das Ergebnis der Sanger Sequenzierung von einer Probe der roten Schmelzkurvengruppe, welche homozygot für A war. In derselben Schmelzkurvengruppe konnten darüber hinaus Proben sequenziert werden, die heterozygot waren (mittlere Sequenzierkurve). Die unten dargestellte Kurve zeigt das Ergebnis der Sequenzierung einer Probe aus der blauen Schmelzkurvengruppe mit dem Genotyp T/T.



**Abb. 12 Anwendung der Sonde R920 zur Genotypisierung der Patientenproben für den SNP rs4794016 im Gen *KPNB1*** **A. Schematische Darstellung der Sonde** Da mittels Schmelzkurvenanalyse keine eindeutige Zuordnung der Proben zu einem bestimmten Genotyp möglich war, wurde eine unmarkierte Sonde generiert. Die Sonde R920 war komplementär zum Rückwärtsstrang und hatte eine Länge von 29 bp. **B. Amplifikation des Typisierungsassays mit Sonde** Die Amplifikation der Assays mit Sonde wurde mit unterschiedlichen Primerkonzentrationen getestet. Sowohl bei der symmetrischen PCR, als auch bei den asymmetrischen PCRs mit Primerverhältnis 1:2, 1:5 und 1:10 (Forwardprimer : Reverseprimer) zeigte sich keine für die Schmelzkurvenanalyse ausreichende Amplifikation.

### 3.1.6 Etablierung eines Typisierungsassays für den SNP rs34647 im *Transportin-1*-Gen (*TNPO1*)

Bei *TNPO1* handelt es sich um ein Protein, das am Transport in den Zellkern beteiligt ist. Es erkennt das NLS und führt dazu, dass der Komplex aus Importin und Substrat an den NPC binden (Chook & Blobel, 2001). Das Gen *TNPO1* liegt auf Chromosom 5q13.2 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, 08.04.2019). Es sind fünf Transkriptionsvarianten bekannt. Hier sollte ein möglicher Einfluss des SNP rs34647 auf das Erkrankungsalter der an SCA3 erkrankten Patienten untersucht werden. Rs34647 ist entweder zwischen ca. 169 und 3200 bp upstream des Transkriptionsstarts von *TNPO1* oder in der 5'UTR lokalisiert. Es handelt sich um einen Guanin-Cytosin Polymorphismus. In der europäischen Bevölkerung kommt Guanin mit einer Allelfrequenz von 0,83 und Cytosin mit einer Allelfrequenz von 0,17 vor. Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ist erfüllt (Tabelle 20). Mit dem Ziel, die Patienten zu genotypisieren, wurde ein Assay mit dem Primerpaar R173 und R174 erstellt (Abb. 13). Das Amplikon betrug eine Länge von 136 bp. In der PCR im Thermo Cycler ließ sich das PCR-Produkt schwach darstellen. Optimierungsversuche ergaben keine Verbesserung. Im Light Cycler ließ sich nur bei weniger als 40% der PCR-Produkte eine Amplifikation nachweisen.

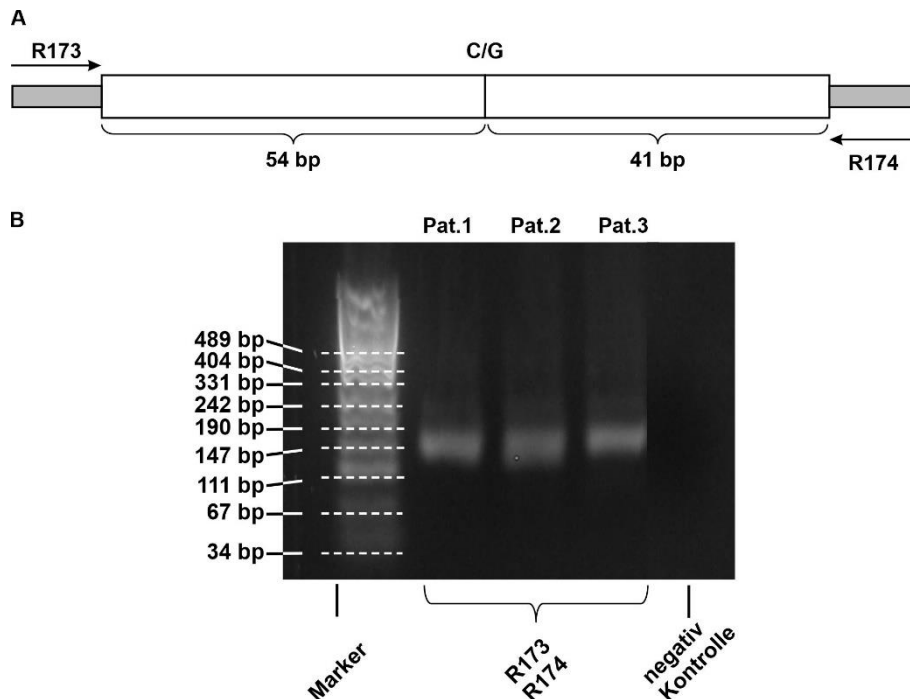
**Tabelle 20 Charakteristika des SNP rs34647 im Gen *TNPO1***

Daten entnommen von <https://genome-euro.ucsc.edu>, (08.04.2019) und <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, (08.04.2019). Legende siehe Tabelle 10

Lokalisation	Transkriptionsvariante	GF in Europa	AF in Europa
chr5:72816594 Gen: <i>TNPO1</i>	TV 1: 5'UTR	0,69 (GG)	0,83 G
	TV X1: 156 bp upstream vom TSP	0,28 (CG)	0,17 C
	TV 2, X2: 31509 bp upstream vom TSP	0,03 (CC)	
	TV X3: 31533 bp upstream vom TSP		

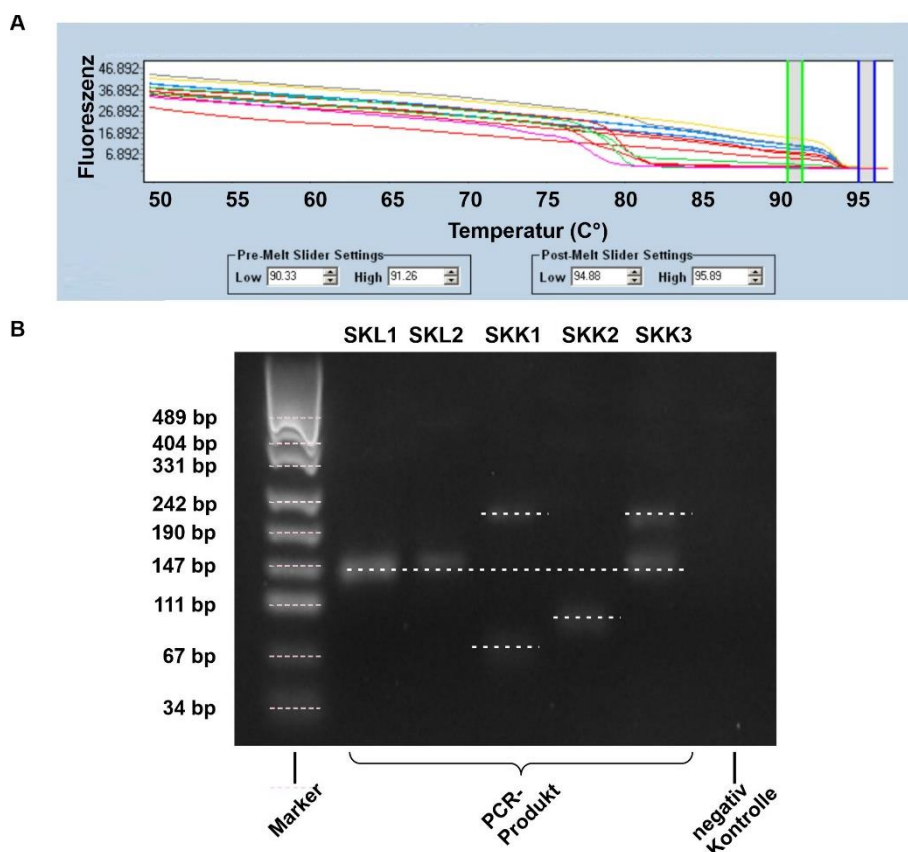
#### **Schmelzkurvenanalyse für den Polymorphismus rs34647 im Gen *TNPO1*:**

Die Schmelzkurvenanalyse wurde im Gegensatz zu den Analysen der anderen Polymorphismen mit einer Schmelztemperatur bis 97°C durchgeführt, da erst bei dieser Temperatur die vollständige Denaturierung der Doppelstränge zu Einzelsträngen erfolgt war. In der Analyse zeigte sich, dass von den Proben, die amplifiziert worden waren, einige Schmelzkurven bereits früher abbrachen (Abb. 14). Um zu überprüfen, ob das Schmelzverhalten durch einen bestimmten Genotyp



**Abb. 13** Etablieren eines Typisierungsassays für den SNP rs34647 im Gen *TNPO1*  
**A. Schematische Darstellung der ausgewählten Primer** In der Abbildung grau unterlegt sind die Bindungsstellen der Primer R173 und R174. Weiß ist die zwischen den Primern liegende Sequenz. **B. Gelelektrophorese mit dem PCR-Produkt aus der PCR im Thermo-Cycler** Um die Patientenproben mittels High-Resolution Melting genotypisieren zu können, wurde ein Assay für die Amplifikation in der PCR erstellt. Das Typisierungsassay mit dem Primerpaar R173 und R174 erzeugte ein Amplikon mit einer Länge von 136 bp.

bedingt war, wurden die PCR-Produkte zunächst auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen, aufgereinigt und dann sequenziert. In der Gelelektrophorese der Proben, die im Light Cycler bereits bei ca. 80°C abschmolzen, zeigten sich Nebenbanden. Eine Sequenzierung dieser Proben gelang nicht, da die Fluoreszenzemission zu gering für eine zuverlässige Sequenzanalyse war. In der Gelelektrophorese der Proben, die im Light Cycler bei ca. 94°C abschmolzen, waren keine Nebenbanden zu sehen (Abb. 14). Insgesamt wurden aus der Gruppe der Proben mit langem Schmelzkurvenverlauf, die bei 94°C denaturierten, acht Proben sequenziert. Bei vier Ansätzen fiel das Signal zu schwach aus, die Sequenzierung war nicht möglich. Bei drei Proben wurde der Genotyp C/C festgestellt, bei einer Probe G/G. Dabei war keine genotypabhängige Zuordnung zu Schmelzkurvengruppen gegeben (Abb. 15). Anhand des Schmelzkurvenverlaufs war für diese Proben keine Genotypisierung möglich.



**Abb. 14 Schmelzkurven und PCR-Produkt im HRM des Typisierungsassays für den SNP rs34647 im Gen *TNPO1*** **A.** Dargestellt ist das detektierte Fluoreszenzsignal im Verlauf der ansteigenden Temperatur. Es zeigt sich, dass einige Proben ihren Schmelzpunkt schon bei ca. 80°C, andere erst bei ca. 94°C erreichen. **B.** Mit dem PCR-Produkt aus dem HRM wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Bei der Gelelektrophorese der Schmelzkurven, die ihren Schmelzpunkt bei 80°C erreicht hatten (SKK) zeigten sich Nebenbanden. Bei den Proben, deren Schmelzkurven ihren Schmelzpunkt erst bei ca. 94°C erreichten (SKL), stellte sich das PCR-Produkt ohne Nebenbanden und in der vom Typisierungsassay erwarteten Größe (136 bp) dar. erzeugte.

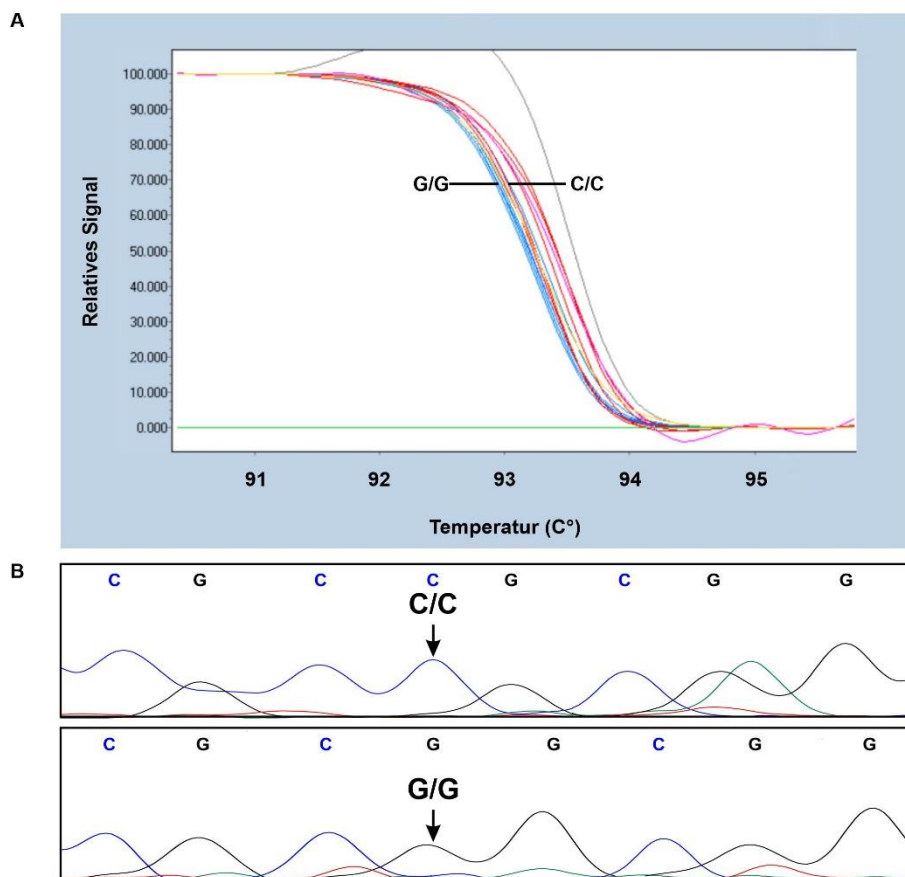
Da also nur ein geringer Anteil der Proben amplifiziert wurde, sich von diesen Proben darüber hinaus nur ein Teil ohne Nebenbanden darstellte, war eine Genotypisierung des Patientenkollektivs für den Einzelnukleotidpolymorphismus rs34647 mit diesen Methoden nicht möglich (Tabelle 21). In dem Projekt der medizinischen Doktorandin stud. med. Annemarie Koebsch (Publikation noch ausstehend) waren bereits sieben weitere Typisierungsassays getestet worden. Für diese Assays waren sieben andere Primerpaare generiert worden. Auch mit diesen Assays war die Genotypisierung der Patienten für den Polymorphismus rs34647 nicht möglich. Es wurde nach weiteren Primern für ein neues

Typisierungsassay recherchiert. Dabei stellte sich heraus, dass es nicht möglich war, bisher noch nicht getestete Primer zu generieren, die die geforderten Kriterien von Schmelztemperatur, Amplikonlänge und CG-Gehalt erfüllen würden.

### Tabelle 21 Zusammenfassende Betrachtung der Analyse des SNP rs34647 im Gen TNPO1

Angegeben sind die Bedingungen, die für das Typisierungsassay gewählt wurden. Legende siehe Tabelle 11

Primerpaar	Produktlänge	MgCl <sub>2</sub> Gradient	DMSO	PCR erfolgreich	HRM
R173_TNPO1-Ex1UTR-R1 R174_TNPO1-Ex1UTR-F2	136	2,5 mM	×	ja	Genotypisierung nicht möglich



**Abb. 15 Genotypisierung der Patientenproben für den SNP rs34647 im Gen TNPO1**  
**A. Schmelzkurvenanalyse** Dargestellt ist das detektierte Fluoreszenzsignal bei steigender Temperatur im normierten Temperaturbereich (90,33°C bis 91,26°C und 94,88°C bis 95,89°C). Es zeigte sich keine deutliche Aufteilung der Schmelzkurven in verschiedene Gruppen. Zwar waren die Schmelzkurven unterschiedlich farblich markiert, es war allerdings eine starke Überlappung und Überschneidung der Kurven zu erkennen **B. Sequenzierergebnis** Aus den farblich markierten Gruppen wurden acht Proben sequenziert. Die Sequenzierung fiel undeutlich aus. Eine der Proben war homozygot für G und drei homozygot für C, wie hier exemplarisch dargestellt.

### 3.2 Einfluss des SNP rs2426109 im *Chromosome-Segregation-1-like-Gen (CSE1L)* auf das Erkrankungsalter von SCA3-Patienten

Die bisher beschriebenen Proteine sind vor allem während dem Import eines Substrates in den Nucleus aktiv. Einige der Transportproteine ermöglichen den Import in den Zellkern, indem sie an ein Cargo-Protein mit NLS binden. Im Zellkern dissoziieren die Importine und das Substrat (Nachury et al., 1998; Radu et al., 1995). Das Protein CSE1L ist selbst nicht aktiv an dem Transportvorgang in den Zellkern beteiligt, sondern transportiert die Importine aus dem Zellkern heraus, wo sie erneuten für den Import von Proteinen mit NLS zur Verfügung stehen (Kutay et al., 1997). Das Gen *CSE1L* liegt auf Chromosom 20q13.13. Es sind vier Transkriptionsvarianten bekannt. Rs2426109 ist zwischen 225 und 156 bp upstream des Transkriptionsstarts von *CSE1L* lokalisiert (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, 09.04.2019). Es handelt sich hierbei um einen Cytosin-Guanin Polymorphismus. Cytosin liegt mit einer Frequenz von 0,57 und Guanin mit einer Frequenz von 0,43 in der europäischen Bevölkerung vor (Tabelle 22). Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ist erfüllt.

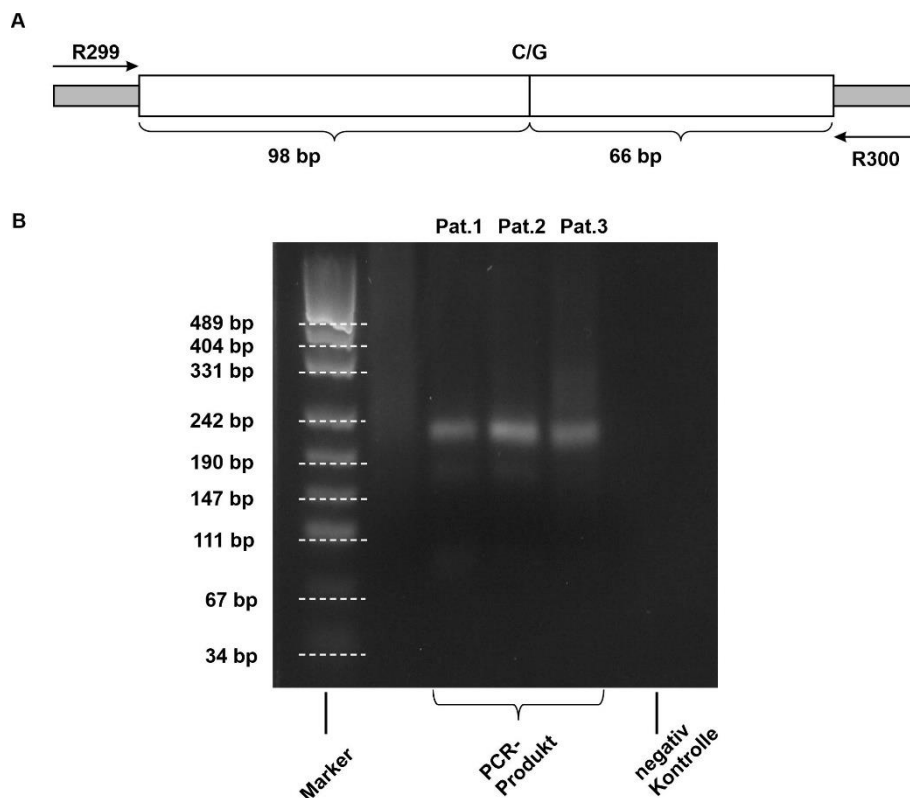
**Tabelle 22 Charakteristika des SNP rs2426109 im Gen *CSE1L***

Daten entnommen von <https://genome-euro.ucsc.edu>, (09.04.2019) und <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, (09.04.2019). Legende siehe Tabelle 10

Lokalisation	GF in Europa	AF in Europa
chr20:49046090 TV 1-3: 156 bp upstream vom TSP	0,33 (CC)	0,57 C
Gen: <i>CSE1L</i> TV X1: 225 bp upstream vom TSP	0,49 (CG) 0,18 (GG)	0,43 G

### 3.2.1 Etablierung eines Typisierungsassays für den SNP rs2426109 im *CSE1L*-Gen

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob der SNP rs2426109 einen Einfluss auf das Erkrankungsalter von SCA3-Patienten hat. Dazu erfolgte zunächst die Genotypisierung der Patienten aus dem Patientenkollektiv. Für die Genotypisierung wurde ein Assay mit dem Primerpaar R299 und R300 angesetzt. Das 196 bp lange PCR-Produkt konnte in der PCR im Thermo Cycler gut amplifiziert werden (Abb. 16). Auch im Light Cycler war die Amplifikation mit CEPH-DNA erfolgreich und funktionierte bei Zugabe von 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> am besten. Unter diesen Bedingungen wurde eine Amplifikation des PCR-Produktes mit Patienten-DNA durchgeführt. Diese funktionierte ebenfalls zuverlässig.

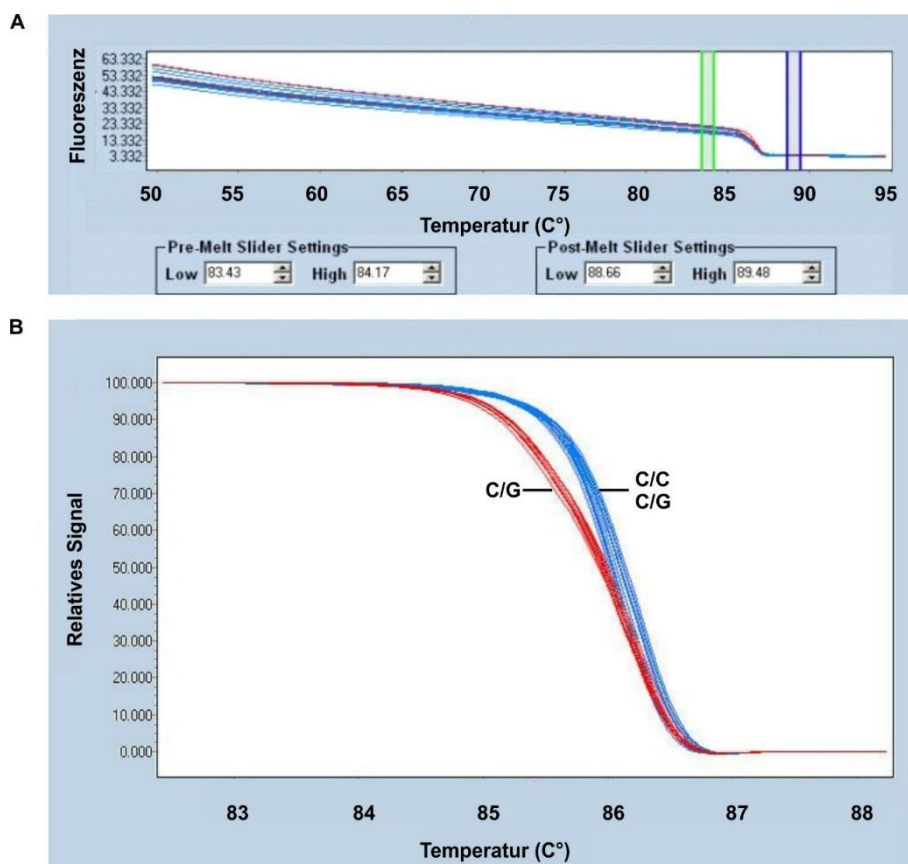


**Abb. 16 Etablieren eines Typisierungsassays für den SNP rs2426109 im Gen *CSE1L*** **A. Schematische Darstellung der ausgewählten Primer** Um eine Genotypisierung des Patientenkollektivs für den Polymorphismus rs2426109 durchzuführen, sollte ein Typisierungsassay etabliert werden. Dafür wurden die Primer R299 und R300 angewendet, deren Position in der Abbildung grau unterlegt ist. Der Bereich zwischen den Primern ist weiß markiert. **B. PCR-Produkt in der Gelelektrophorese** Um eine Genotypisierung des Patientenkollektivs für den Polymorphismus rs2426109 im *CSE1L* Gen durchzuführen, wurde zunächst ein Assay etabliert. Dieses erzeugte ein PCR-Produkt einer Länge von 196 bp. Als Marker wurde pUC19 verwendet. Das PCR-Produkt stellte sich ohne Nebenbanden in der Gelelektrophorese dar.



### 3.2.2 Schmelzkurvenanalyse und Genotypisierung für den SNP rs2426109 im *CSE1L*-Gen

In der Schmelzkurvenanalyse zeigte sich eine Aufteilung der Schmelzkurven in zwei Gruppen. Die Schmelzkurvengruppen waren am deutlichsten bei einer Normierung des tiefen Temperaturbereichs zwischen 83.43°C bis 84.17°C und des hohen Temperaturbereichs zwischen 88.66°C bis 89.48°C voneinander unterscheidbar (Abb. 17). Die Sequenzierung mehrerer Proben ergab, dass eine Gruppe aus heterozygoten Genotypen bestand. Die andere Gruppe bestand aus den beiden homozygoten Genotypen (Abb. 17).



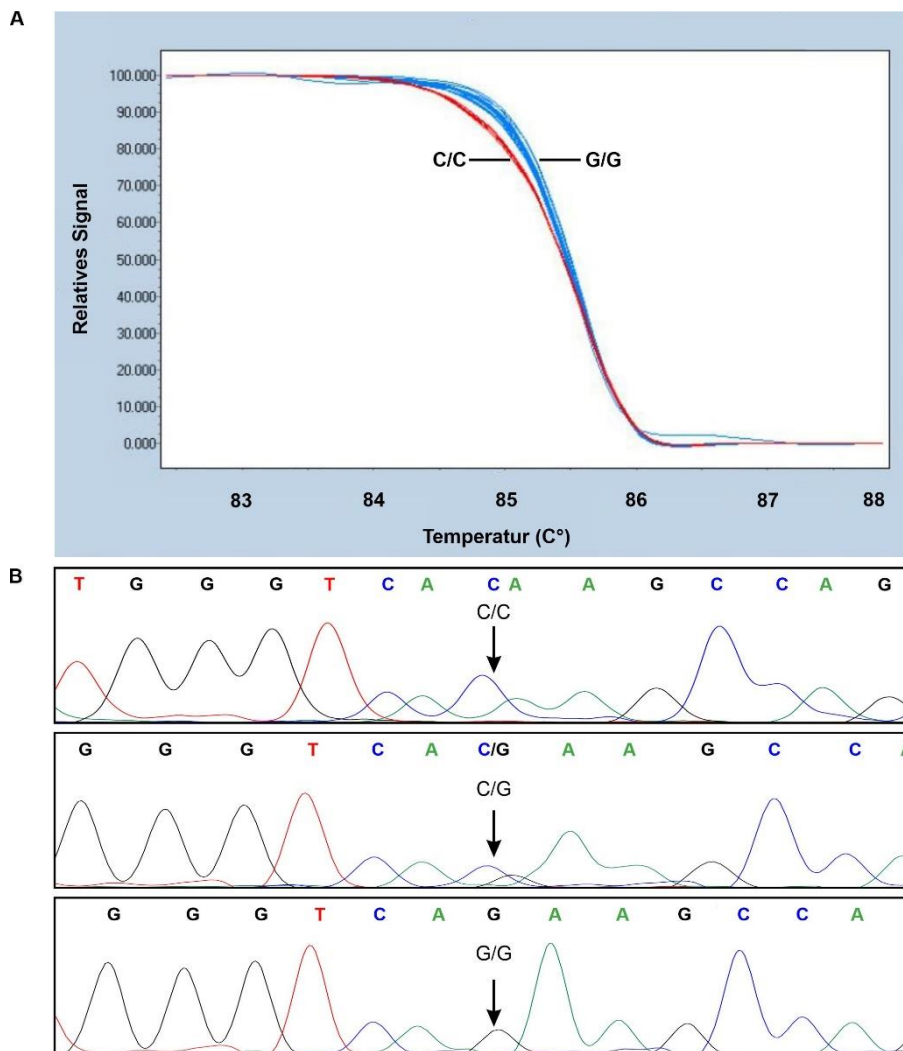
**Abb. 17 Schmelzkurvenanalyse des Typisierungsassays für den SNP rs2426109 im Gen *CSE1L*** **A. Ausgewählter Bereich der Schmelzkurvenanalyse** Das in der PCR erfolgreich angewandte Assay konnte für das HRM übernommen und angepasst werden. Dargestellt ist die Fluoreszenzemission der PCR-Produkte bei steigender Temperatur. Bei einer Normierung der Bereiche von 83.43°C bis 84.17°C im tieferen Temperaturbereich und einer Normierung von 88.66°C bis 89.48°C im höheren Temperaturbereich wurde die Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. **B. Schmelzkurvenanalyse** In der Schmelzkurvenanalyse zeigte sich eine Aufteilung der Schmelzkurven in 2 Gruppen. Die Sequenzierung ergab, dass es sich bei der blauen Kurve um die Patienten mit homozygotem Genotyp für C oder G handelte, die rote Kurve repräsentierte die heterozygoten Patienten. Die angewandten Methoden ließen lediglich zwischen homozygoter und heterozygoter Patienten-DNA unterscheiden.

Es konnte mit der Schmelzkurvenanalyse so nur zwischen heterozygoten und homozygoten Proben unterschieden werden. Eine Genotypisierung des gesamten Patientenkollektivs war mit dem hier angewandten Typisierungsassay nicht möglich. Daher wurde eine unmarkierte Sonde generiert (Tabelle 25). Der GC-Gehalt der Sonde betrug 52% bei einer Länge von 52 Basenpaaren. Diese sollte an die Region um den Polymorphismus binden. Abhängig vom Genotyp der untersuchten Probe wurde ein für diesen charakteristisches Schmelzmuster erwartet, welches die Zuordnung der Proben zu den verschiedenen Genotypen ermöglichen sollte. Um die Amplifikation mit der Sonde 1\_CSE1L\_Prom\_S.-P zu testen, wurde eine Reihe von Versuchsansätzen mit symmetrischer und asymmetrischer PCR erstellt. Weil die Sonde auf dem Vorwärtsstrang lag, wurden die asymmetrischen PCRs mit jeweils geringerem Anteil des Vorwärtsprimers R299, sowie eine symmetrische PCR mit gleicher Konzentration der Primer durchgeführt. Bei der symmetrischen PCR fand eine Amplifikation statt. Bei den asymmetrischen PCRs wurde im Light Cycler keine für eine Schmelzkurvenanalyse ausreichende Amplifikation detektiert. In der Schmelzkurvenanalyse der symmetrischen PCR zeigte sich kein Hinweis auf ein Abschmelzen der Sonde. Die Anwendung dieser Sonde eignete sich unter den gegebenen Bedingungen nicht dazu, das Patientenkollektiv zu genotypisieren. Daher wurde eine andere Methode zur Genotypisierung gewählt. Mit der klassischen Schmelzkurvenanalyse konnte aktuell zwischen heterozygoten und homozygoten Proben unterschieden werden (Abb. 17). Um innerhalb der Gruppe der homozygoten Proben zwischen den Genotypen unterscheiden zu können, wurde den homozygoten Proben eine für den Polymorphismus ebenfalls homozygote DNA beigemischt. Hatten die Proben einen anderen Genotyp als die beigemischten DNA, so zeigten diese nun einen anderen Schmelzkurvenverlauf. Lag der gleiche Genotyp vor, veränderte sich das Schmelzmuster nicht. Zunächst wurden mehrere CEPH-DNAs sequenziert, um zuverlässig einen geeigneten Genotyp zu finden. Beigemischt wurde eine für G/G homozygote CEPH-DNA. Da sich die Konzentration der PatientendnAs im Bereich zwischen 8 ng/µl bis 10 ng/µl befanden, wurde die Konzentration der CEPH-DNA mittels Extinktionsmessung bestimmt und auf eine Konzentration von 10 ng/µl verdünnt. In einer anschließenden Versuchsreihe wurde

bestimmt, in welchem Verhältnis Patienten-DNA zu CEPH-DNA sowohl die zuverlässigste Amplifikation als auch die eindeutigste Schmelzkurvenaufteilung zeigten. Es wurden die Verhältnisse 1:1, 2:1 sowie 2:2 getestet. Ein Verhältnis 2:1 von Patienten-DNA zu CEPH-DNA zeigte die beste Amplifikation. Daher wurde dieses Verhältnis für das Typisierungsassay gewählt (Tabelle 23). Die Schmelzkurvenanalyse ergab erneut eine Aufteilung in zwei Gruppen (Abb. 18). Die Sequenzierung von jeweils zwei Proben aus einer Gruppe ergab, dass es sich bei der einen Gruppe um den homozygoten Genotypen G/G und bei der anderen Gruppe um den homozygoten Genotypen C/C handelte (Abb. 18). Mit dieser Methode war es möglich, 421 Patienten zu genotypisieren.

**Tabelle 23 Ansatz der PCR mit gemischter DNA im Light Cycler**

<b>PCR-Mix:</b>	<b>Menge</b>
Patienten-DNA	1,0 µl
CEPH 1329407	0,5 µl
Mastermix	5,0 µl
Wasser	2,1 µl
MgCl <sub>2</sub>	1,0 µl
Forward – Primer	0,2 µl
Reverse – Primer	0,2 µl
Gesamtvolumen	10,0 µl



**Abb. 18 Genotypisierung des Patientenkollektivs für den SNP rs2426109 im Gen CSE1L** **A. Schmelzkurvenanalyse mit beigemischter DNA** Um innerhalb der Gruppe der homozygoten Patienten zwischen den Genotypen C/C und G/G differenzieren zu können, wurde dem Typisierungsassay homozygote CEPH-DNA mit dem Genotyp G/G beigemischt. Zu sehen ist die Schmelzkurvenanalyse, die das Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit von der Temperatur zeigt. Es können zwei Schmelzkurvengruppen ausgemacht werden. Die obere blaue Kurve bestand aus homozygoten Proben mit Genotyp G/G. Die Gruppe der roten Kurven, die dem Verlauf von heterozygoten Genotypen entsprachen, bestand aus Proben mit dem Genotyp C/C. **B. Sequenzierergebnis** Hier dargestellt ist das Ergebnis der Sanger-Sequenzierung von Patientenproben für den Polymorphismus CSE1L rs2426109. Die obere Kurve zeigt das Sequenzierergebnis vom homozygoten Genotyp C/C. Die mittlere Kurve zeigt das Sequenzierergebnis einer heterozygoten Probe mit Genotyp C/G. Die untere Kurve zeigt das Sequenzierergebnis vom homozygoten Genotyp G/G.

### 3.2.3 Einfluss der Genotypen von rs2426109 im CSE1L-Gen auf das Erkrankungsalter von SCA3-Patienten

Nachdem es gelungen war, das Patientenkollektiv zu genotypisieren, war es nun möglich mittels statistischer Analyse herauszufinden, ob es einen Zusammenhang zwischen Erkrankungsalter und Genotyp des SNP rs2426109 bei SCA3-Patienten gibt. Zur Analyse geeignet waren 421 von insgesamt 517 vorhandenen Patientenproben. Bei den übrigen Proben blieb die Amplifikation entweder aus oder war zu schwach, um eine Analyse durchzuführen. Die 421 Patientenproben wurden zunächst auf CAG-Repeatanzahl und Häufigkeit der Polymorphismen untersucht und diesbezüglich mit der europäischen Normalbevölkerung verglichen. Der Genotyp G/G kommt in der durchschnittlichen Bevölkerung zu 18%, C/G zu 49% und C/C zu 33% vor. Im untersuchten Patientenkollektiv waren 75 Personen homozygot für C (18%), 203 waren heterozygot C/G (48%) und 143 waren homozygot für G (34%). Bei der statistischen Analyse musste berücksichtigt werden, dass in dem untersuchten Patientenkollektiv auch Familien mit mehr als einem Mitglied erfasst worden waren. Daher wurde für jeden Patienten mit Verwandtschaftsbeziehungen ein Gewichtungsfaktor erstellt, der sich aus eins durch die Anzahl der Familienmitglieder berechnen ließ. Nach Anwendung der Gewichtungsfaktoren der Verwandten blieb rechnerisch ein Patientenkollektiv mit 257 unabhängigen bzw. nicht verwandten Personen übrig. Davon hatten 35% den Genotyp G/G, 47% den Genotyp C/G und 18% den Genotyp C/C. Dies entsprach 89 Patienten mit G/G, 121 Patienten mit C/G und 47 Patienten mit C/C. Um zu testen, ob das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht für das untersuchte Kollektiv erfüllt war (Hardy, 1908), wurden zunächst die Allelfrequenzen berechnet (Formel 1 & 2).

$$p = \frac{2 \times (GG) + (CG)}{2 \times (GG + CG + CC)} = \frac{2 \times 89 + 121}{2 \times (89 + 121 + 47)} = \frac{299}{514} \approx 0,58$$

$$q = \frac{2 \times (CC) + (CG)}{2 \times (GG + CG + CC)} = \frac{2 \times 47 + 121}{2 \times (89 + 121 + 47)} = \frac{215}{514} \approx 0,42$$

**Formel 1 & 2 Berechnung der Allelfrequenz für den SNP rs2426109 mit Hilfe des Hardy-Weinberg-Gesetzes. Formel 1** Berechnung der Allelfrequenz für das häufigere Allel: G = p. **Formel 2** Berechnung der Allelfrequenz für das seltenere Allel: C = q.

Hier ergab sich eine Allelfrequenz von 0,58 für G und 0,42 für C. Es zeigte sich eine ähnliche Allelfrequenz wie in der europäischen Allgemeinbevölkerung (Tabelle 22). Für jeden Genotyp wurde berechnet, welche Anzahl an Patienten nach Hardy-Weinberg zu erwarten war (Formel 3-5).

$$\text{erwartete } GG = p^2 \times 257 = \left(\frac{299}{514}\right)^2 \times 257 = 86,97$$

$$\text{erwartete } CG = 2pq \times 256 = 2 \times \frac{299}{514} \times \frac{215}{514} \times 257 = 125,07$$

$$\text{erwartete } CC = q^2 \times 257 = \left(\frac{215}{514}\right)^2 \times 257 = 44,97$$

**Formel 3-5 Berechnung der nach Hardy-Weinberg erwarteten Patientenanzahl für den SNP rs2426109 im untersuchten Patientenkollektiv abhängig von der ermittelten Allelfrequenz. Formel 3** Berechnung der erwarteten Anzahl von Patienten mit G/G. **Formel 4** Berechnung der erwarteten Anzahl von Patienten mit C/G. **Formel 5** Berechnung der erwarteten Anzahl von Patienten mit C/C.

Mit dem Chi-Quadrat-Test wurde berechnet (Pearson, 1900), ob die Genotypen im untersuchte Patientenkollektiv nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht verteilt waren (Formel 6). Bei dem Chi-Quadrat-Test gilt, dass die Null-Hypothese auf dem 5%-Signifikanzniveau zurückgewiesen wird, wenn  $X^2 > 3,84$  ist. Die Null-Hypothese ist, dass das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht erfüllt ist. Hier ist  $X^2 = 0,27$  und somit  $X^2 < 3,84$ . Das Gleichgewicht nach Hardy-Weinberg wurde somit erfüllt.

$$\begin{aligned} X^2 &= \sum \frac{(O - E)^2}{E} = \frac{(89 - 86,96)^2}{88,48} + \frac{(121 - 125,07)^2}{125,07} + \frac{(47 - 44,97)^2}{44,97} \\ &= 0,05 + 0,13 + 0,09 = 0,27 \end{aligned}$$

**Formel 6 Überprüfung der Verteilung der Genotypen des SNP rs2426109 auf das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht mit dem Chi-Quadrat-Test**

Für die weitere statistische Auswertung der Daten, wurden diese auf Normalverteilung überprüft. Es wurden drei Patientengruppen verglichen. Die Gruppen

bestanden aus Patienten mit dem jeweils gleichen Genotyp im SNP rs2426109. Zunächst wurde getestet, ob die Erkrankungsalter innerhalb der Patientengruppen normalverteilt waren. Dabei zeigte sich im Shapiro-Wilk-Test, der mit JMP 12.2.0 durchgeführt wurde, eine Normalverteilung der Erkrankungsalter und der CAG-Repeatanzahlen innerhalb aller Patientengruppen ( $p < 0,0001$  für die Patientengruppe mit Genotyp C/C, C/G und G/G). Mit ANOVA wurde untersucht, ob es einen signifikanten Unterschied zwischen den Mittelwerten der CAG-Repeatanzahlen der drei Patientengruppen gab. Bei der Patientengruppe mit Genotyp C/C lag die durchschnittliche CAG-Repeatanzahl bei 70,78, bei der Gruppe mit C/G bei 71,07 und bei der Gruppe mit G/G bei 70,87 CAG-Repeats. Die Nullhypothese besagt, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten liegt. Wenn  $p > 0,05$  wird diese nicht abgelehnt. Hier war  $p = 0,8608$ . Es lag kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den CAG-Repeatanzahlen vor. Darüber hinaus wurde untersucht, ob sich die Mittelwerte der Erkrankungsalter der drei Gruppen statistisch signifikant unterschieden. Der Mittelwert des durchschnittlichen Erkrankungsalters lag bei 40,38 Jahren in der Patientengruppe mit C/C, bei 40,16 Jahren in der Patientengruppe mit C/G und bei 40,00 bei Patienten mit G/G. Mit ANOVA konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den durchschnittlichen Erkrankungsaltern festgestellt werden ( $p = 0,9754$ ) (Abb. 19). Um festzustellen, ob ein bestimmter Genotyp einen Einfluss auf das Erkrankungsalter der Patienten hatte, wurde ein Regressionsmodell angewandt. Das Erkrankungsalter wurde als Zielgröße, Repeatanzahl und Genotyp als Einflussgrößen festgelegt. Der Effektttest des Regressionsmodells war auf dem 5%-Niveau statistisch nicht signifikant ( $p = 0,8653$ ). Im untersuchten Patientenkollektiv machte die CAG-Repeatexpansion 44% der Varianz des Erkrankungsalters aus. Der Polymorphismus rs2426109 zeigte keinen weiteren Einfluss auf die Varianz des Erkrankungsalters. Durch das Vorliegen unterschiedlicher Genotypen wurde kein statistisch signifikanter Einfluss auf das Erkrankungsalter ausgeübt (Tabelle 24, Tabelle 25). In den hier durchgeführten Analysen konnte kein Zusammenhang zwischen prädiktivem Erkrankungsalter von Patienten mit SCA3 in Abhängigkeit von dem Genotyp des Polymorphismus rs2426109 im Gen *CSE1L* beobachtet werden (Tabelle 24, Tabelle 25).

**Tabelle 24 Zusammenfassende Betrachtung der Analyse des SNP rs2426109 im Gen CSE1L**

Angegeben sind die Bedingungen, die für das Typisierungsassay gewählt wurden. Legende siehe Tabelle 11

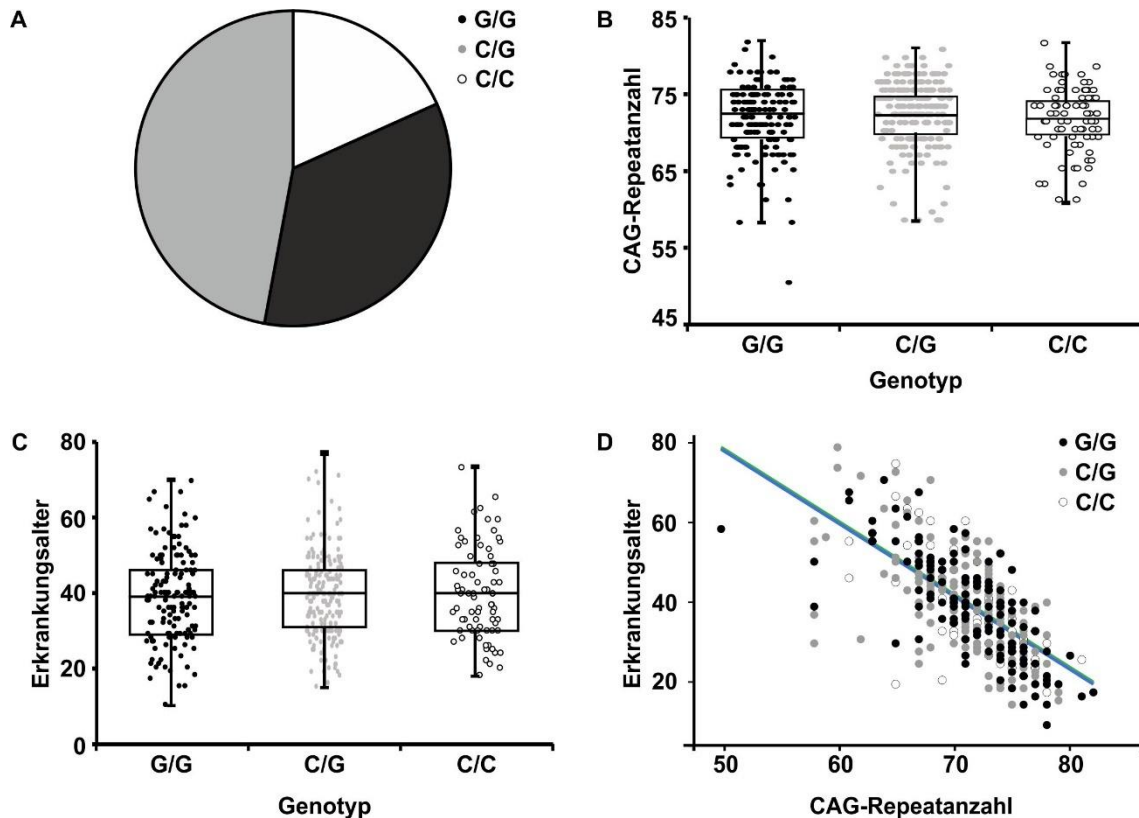
Primerpaar	Produktlänge	MgCl <sub>2</sub>	DMSO	Sonde	HRM	Regressionsanalyse
R299_CSE1L_Prom09 -F2 R300_CSE1L_Prom09 -R2	196	2,5 mM	×	1_CSE1L_Prom_S.-P	Zumischen von DNA	Effekttest nicht signifikant

**Tabelle 25 Effektzusammenfassung der Regressionsanalyse für den Einfluss des SNP rs2426109 im Gen CSE1L auf das Erkrankungsalter von Patienten mit SCA3**

Anmerkung: R<sup>2</sup>: Bestimmtheitsmaß

Einflussgröße	R <sup>2</sup>	ΔR <sup>2</sup>	p-Wert
CAG-Repeatanzahl	0,44	-	<0.001
Genotyp CSE1L 0=(C/C) 1=(C/G) 2=(G/G)	0,44	0	0.8653





**Abb. 19 Statistische Analyse des SNP rs2426109 im Gen *CSE1L*** **A. Häufigkeit der Genotypen** Nach Gewichtung der Patienten mit Verwandtschaftsbeziehungen wurde die statistische Analyse an einer errechneten Patientengruppe mit 257 Personen durchgeführt. Davon hatten 35% den Genotyp G/G (89 Patienten), 47% den Genotyp C/G (121 Patienten) und 18% den Genotyp C/C (47 Patienten). **B. Boxplot zur Darstellung der CAG-Repeatanzahl pro Patientengruppe** Dargestellt in Boxplots ist die Anzahl der CAG-Repeats innerhalb einer Patientengruppe mit gleichem Genotyp. Die Streuung der CAG-Repeats verhält sich für alle Gruppen sehr ähnlich, der Median beträgt bei allen Gruppen 72. Bei den homozygoten Patienten mit Genotyp C/C sind zwischen 61 bis 81 CAG-Repeats verzeichnet. Heterozygote Patienten haben zwischen 58 bis 79 CAG-Repeats. Die Patientengruppe mit G/G hat 50 bis 82 CAG-Repeats. Die Varianzanalyse zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Mittelwerten dieser Gruppen (im Schaubild nicht abgebildet). **C. Boxplot zur Darstellung der Erkrankungsalter innerhalb der Patientengruppen** Zu sehen sind Boxplots, die die Erkrankungsalter der Patienten mit demselben Genotyp zeigen. Patienten mit dem Genotyp C/C erkranken zwischen 18 und 74 Jahren (Median: 40), Heterozygote zwischen 15 und 78 Jahren (Median: 40) und Homozygote für G zwischen 10 und 70 Jahren (Median: 39). In der Varianzanalyse mit ANOVA lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der Erkrankungsalter nachweisen (im Schaubild nicht abgebildet). **D. Zusammenhang zwischen Anzahl der CAG-Repeats und Erkrankungsalter im Regressionsmodell** Im Diagramm auf der y-Achse sind die Erkrankungsalter, auf der x-Achse die festgestellte CAG-Repeatanzahl der Patienten dargestellt. Welchen Genotypen die Patienten im SNP rs2426109 haben, kann an der Farbe abgelesen werden. Patienten mit C/C sind weiß abgebildet, grau die heterozygoten Patienten und schwarz die homozygoten Patienten mit Genotyp G/G. Abhängig vom Genotyp ist jeweils in der entsprechenden Farbe das prädiktive Erkrankungsalter als Ausgleichsgerade dargestellt. Die Geraden unterscheiden sich statistisch nicht signifikant in ihrer Verschiebung auf der y-Achse.

### 3.3 Einfluss des SNP rs11618521 im *Karyopherin- $\alpha$ 3*-Gen (*KPNA3*) auf das Erkrankungsalter von SCA3-Patienten

Die Untersuchung von *KPNA3* war in diesem Projekt von besonderer Bedeutung, da in vorangehenden Arbeiten bereits gezeigt werden konnte, dass dieses einen Einfluss auf die Lokalisation von Ataxin3 im Nucleus sowie auf den Krankheitsverlauf der SCA3 hat (Sowa et al, 2018). Diesen Einfluss auf die SCA3 entfaltet das Protein *KPNA3* vermutlich durch seine Beteiligung am nukleozytoplasmatischen Transport. Es erkennt das NLS von Cargo-Proteinen und ist daran beteiligt, diese in den Zellkern zu importieren (Görlich et al., 1995; Nachury et al., 1998; Radu et al., 1995). Das Gen *KPNA3* ist auf Chromosom 13q14.3 lokalisiert (Takeda et al., 1997). Es sind zwei Transkriptionsvarianten bekannt. Bei rs11618521 handelt es sich um einen SNP der sich je nach Transkriptionsvariante ca. 1100 bis 2500 bp vom Startcodon entfernt in der Promotorregion befindet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, 09.04.2019). Es können die Basen Cytosin oder Thymin vorliegen. In der europäischen Bevölkerung hat Cytosin eine Allelfrequenz von 0,61, Thymin hat eine Allelfrequenz von 0,39 (Tabelle 26). Das Gleichgewicht nach Hardy-Weinberg ist erfüllt. Die Genotypangaben von rs11618521 beziehen sich auf den 5'-3'-Strang in Vorwärtsorientierung zum Genom. *KPNA3* liegt auf dem dazu komplementären Strang (3'-5'-Strang).

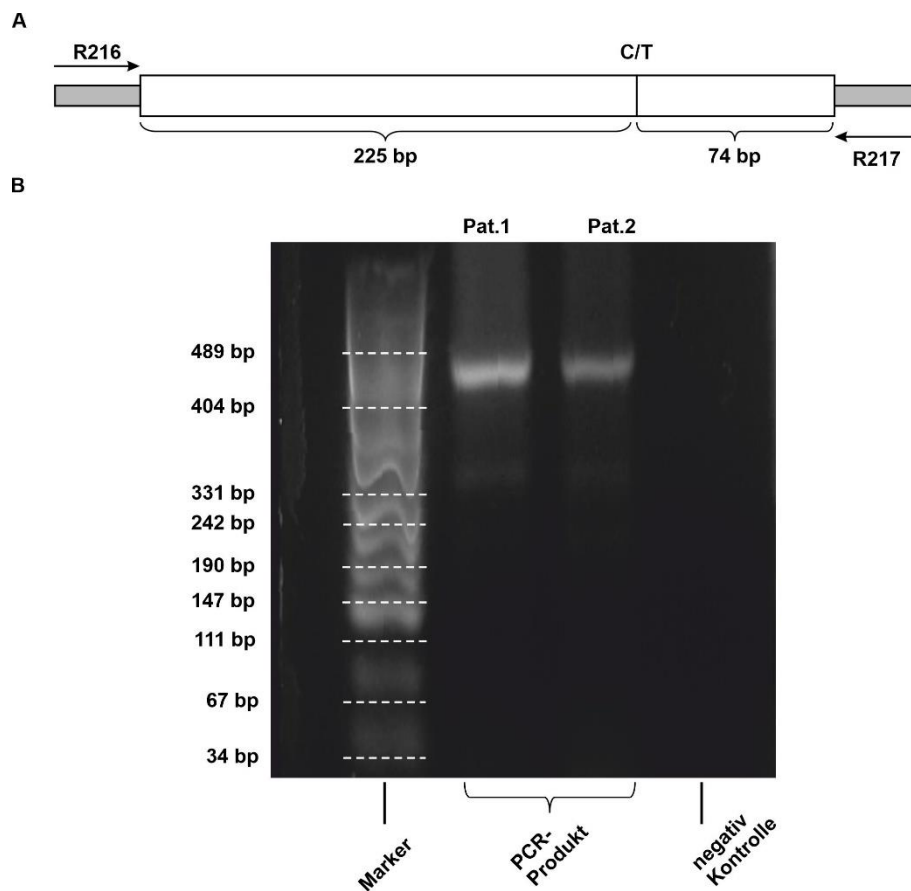
#### Tabelle 26 Charakteristika des SNP rs11618521 im Gen *KPNA3*

Daten entnommen von <https://genome-euro.ucsc.edu>, (09.04.2019) und <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, (09.04.2019). Legende siehe Tabelle 9

Lokalisation		GF in Europa	AF in Europa
chr13:49794015 Gen: <i>KPNA3</i> (-)	TV 1:	1094 bp upstream vom TSP	0,37 (CC)
	TV X1:	2457 bp upstream vom TSP	0,48 (CT) 0,16 (TT)

### 3.3.1 Etablierung eines Typisierungsassays für den SNP rs11618521 im *KPNA3*-Gen

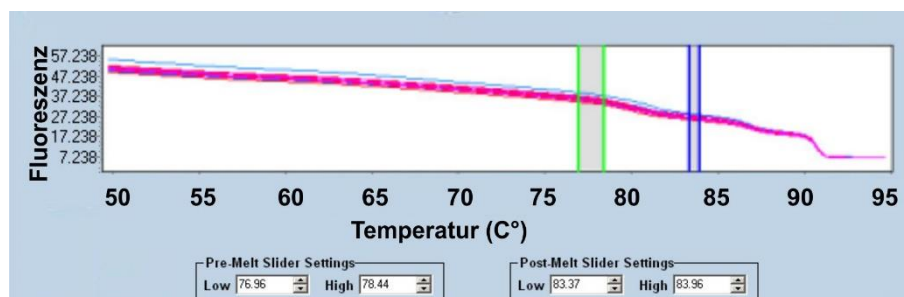
Um den Einfluss von rs11618521 im *KPNA3* Gen auf das Erkrankungsalter von Patienten mit SCA3 zu untersuchen, wurde ein Typisierungsassay erstellt. Dieses wurde in der PCR im Thermo Cycler getestet. Mit dem Primerpaar R216 und R217 ließ sich das 338 bp lange PCR-Produkt in der PCR im Thermo Cycler ohne Nebenbanden darstellen (Abb. 20). Daher wurde im Light Cycler mit HRM fortgeföhren.



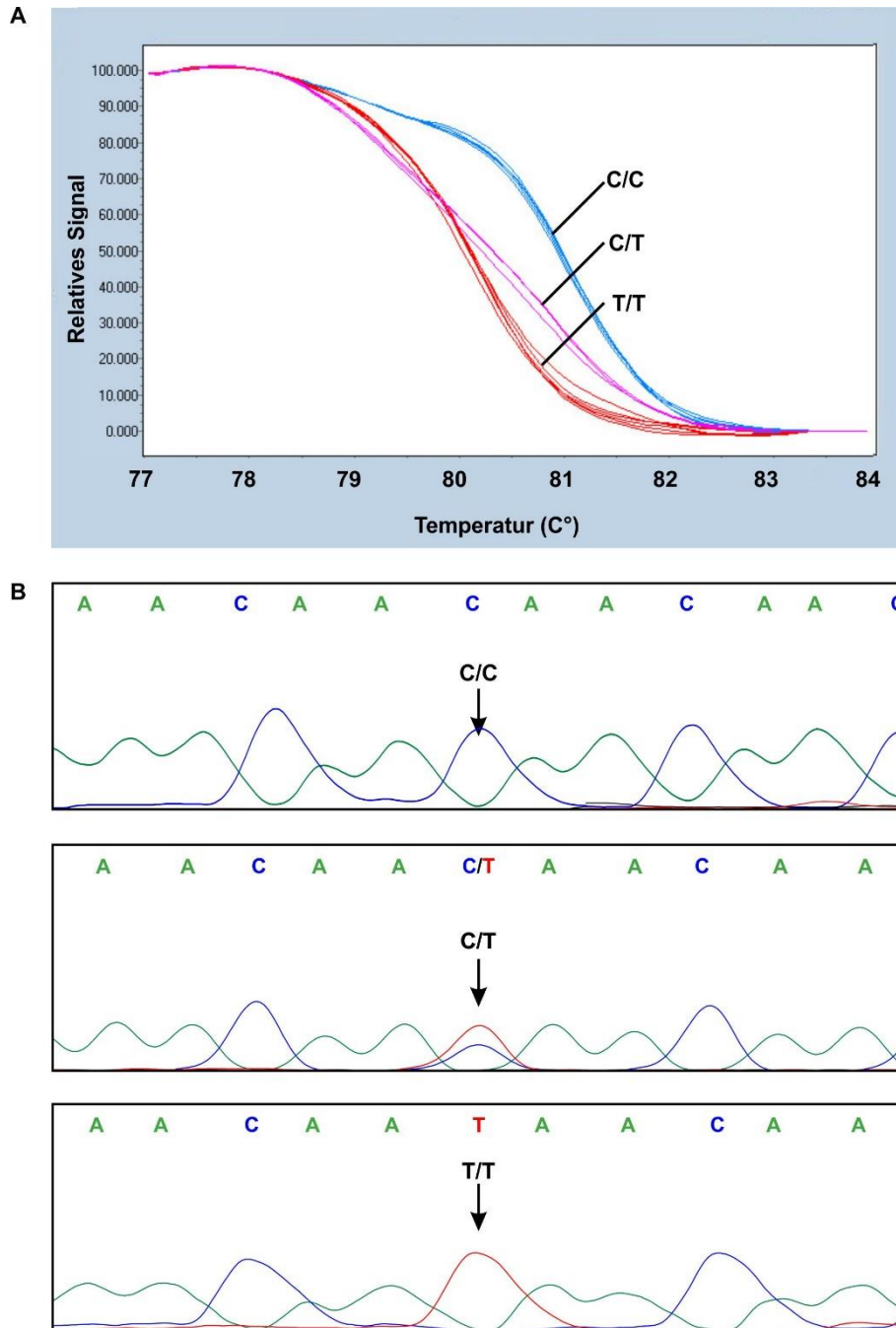
**Abb. 20** Etablieren eines Typisierungsassays für den SNP rs11618521 im Gen *KPNA3* **A. Schematische Darstellung der ausgewählten Primer** Um eine Genotypisierung des Patientenkollektivs mittels HRM für den Polymorphismus rs11618521 durchzuführen, sollte ein Typisierungsassay etabliert werden. Dafür wurden die Primer R216 und R217 angewendet. Das Typisierungsassay erzeugte ein 338 bp langes Amplikon. Der zwischen den Primern liegende Abschnitt ist weiß, die Position der Primer ist in der Abbildung grau markiert. **B. PCR-Produkt in der Gelelektrophorese** Das Typisierungsassay wurde zunächst in der PCR im Thermo Cycler getestet. Das PCR-Produkt wurde zuverlässig amplifiziert und stellte sich ohne Nebenbanden dar. Als Marker wurde pUC19 verwendet.

### 3.3.2 Schmelzkurvenanalyse und Genotypisierung für den SNP rs11618521 im *KPNA3*-Gen

Um die Proben den verschiedenen Genotypen zuordnen zu können, wurde nach erfolgter Amplifikation im Light-Cycler eine Schmelzkurvenanalyse der Amplikons durchgeführt. Zunächst wurde das Typisierungsassay mit CEPH-DNA getestet und die optimalen Bedingungen zur Amplifikation ermittelt. Hierfür wurde eine  $MgCl_2$ -Reihe angesetzt. Die dabei bestimmte  $MgCl_2$ -Stoffmenge, unter der die effektivste Amplifikation ablief, lag im Bereich von 2,0 mM bis 3,0 mM. Für die folgenden Versuche wurde eine Konzentration von 2,5 mM  $MgCl_2$  verwendet, womit eine ausreichende Amplifikation der nun eingesetzten Patienten-DNA gelang. Die Schmelzkurven wurden im Bereich zwischen 78,44°C und 83,37°C auf Unterschiede analysiert. Mit einer Normierung der Bereiche zwischen 76,96°C bis 78,44°C und 83,37°C bis 83,96°C ergab sich die anschaulichste Aufteilung der Schmelzkurven (Abb. 21). Dabei war die Aufteilung in drei verschiedene Schmelzkurvengruppen zu sehen (Abb. 22). Die Sequenzierung von Proben aus diesen drei Gruppen ergab, dass jeweils eine der Gruppen Proben mit Genotyp C/C, eine mit Genotyp C/T und eine mit Genotyp T/T enthielt (Abb. 22). Mit dieser Methode wurden alle vorhandenen Patientenproben genotypisiert.



**Abb. 21** Ausgewählter Bereich der Schmelzkurvenanalyse zur Genotypisierung des Patientenkollektivs für den SNP rs11618521 im Gen *KPNA3* Dargestellt ist das detektierte Fluoreszenzsignal bei steigender Temperatur. Im tieferen Bereich wurden die Schmelzkurven zwischen 76,96°C und 78,44°C normiert. Im höheren Temperaturbereich erfolgte die Normierung zwischen 83,37°C und 83,96°C. Bei dieser Einstellung war die deutlichste Unterteilung in Gruppen zu sehen.



**Abb. 22 Genotypisierung des Patientenkollektivs für den SNP rs11618521 im Gen *KPNA3*** **A. Schmelzkurvenanalyse** Hier zu sehen ist das detektierte Fluoreszenzsignal bei steigender Temperatur im normierten Temperaturbereich. In der Schmelzkurvenanalyse zeigte sich eine Aufteilung der Kurven in drei verschiedene Gruppen. Die Sequenzierung ergab, dass die blaue Schmelzkurvengruppe Proben mit Genotyp C/C enthält. Die lilafarbene Schmelzkurvengruppe bestand aus Proben mit Genotyp C/T und die rote Schmelzkurvengruppe enthielt die Proben mit Genotyp T/T. **B. Sequenzierergebnis** Um nachzuweisen, dass die Schmelzkurvengruppen jeweils Proben eines bestimmten Genotyps enthielten, wurde die Sanger-Sequenzierung durchgeführt. Die Proben der oberen Kurve (blaue Kurve) waren homozygot für C. Die Proben der mittleren Kurve (lilafarbene Kurve) waren heterozygot. Die Proben der unteren Kurve (rote Kurve) waren heterozygot für T/T.

### 3.3.3 Einfluss der Genotypen von rs11618521 im *KPNA3*-Gen auf das Erkrankungsalter von SCA3-Patienten

Um einen Zusammenhang zwischen dem Genotyp des SNP rs11618521 im *KPNA3*-Gen und einer Abweichung vom prognostizierten Erkrankungsalter der SCA3-Patienten aufzudecken, wurde eine statistische Analyse durchgeführt. Für die Analyse waren 350 Patientenproben geeignet. Bei den übrigen Proben blieb die Amplifikation entweder aus oder war zu schwach, um diese mittels Schmelzkurvenanalyse zu genotypisieren. Die zu analysierenden Proben wurden zunächst auf CAG-Repeatanzahl und Häufigkeit der Polymorphismen untersucht und diesbezüglich mit der europäischen Normalbevölkerung verglichen. 150 Patienten waren homozygot für C (43%). 146 Patienten waren heterozygot C/T (42%) und 54 waren homozygot für T (15%). Bei der statistischen Analyse musste berücksichtigt werden, dass in dem untersuchten Patientenkollektiv auch Familien mit mehr als einem Mitglied erfasst worden waren. Es wurde daher für jeden Patienten mit Verwandtschaftsbeziehungen ein Gewichtungsfaktor angewendet, der sich aus eins durch die Anzahl der Familienmitglieder berechnen ließ. Rechnerisch blieb nach Anwendung der Gewichtungsfaktoren der Verwandten ein Patientenkollektiv mit 242 unabhängigen bzw. nicht verwandten Personen. Davon hatten 45% den Genotyp C/C, 40% den Genotyp C/T und 15% den Genotyp T/T (Abb. 23). Dies entsprach 108 Patienten mit C/C, 98 Patienten mit C/T und 36 Patienten mit T/T. Um zu testen, ob das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht für das untersuchte Kollektiv erfüllt war (Hardy, 1908), wurden zunächst die Allelfrequenzen berechnet (Formel 7 & 8). Hier ergab sich eine Allelfrequenz von 0,65 für C und 0,35 für T.

$$p = \frac{2 \times (CC) + (CT)}{2 \times (CC + CT + TT)} = \frac{2 \times 108 + 98}{2 \times (108 + 98 + 36)} = \frac{314}{484} \approx 0,65$$

$$q = \frac{2 \times (TT) + (CT)}{2 \times (CC + CT + TT)} = \frac{2 \times 36 + 98}{2 \times (108 + 98 + 36)} = \frac{170}{484} \approx 0,35$$

**Formel 7 & 8 Berechnung der Allelfrequenz für den SNP rs11618521 mit Hilfe des Hardy-Weinberg-Gesetzes. Formel 7** Berechnung der Allelfrequenz für das häufigere Allel: C = p. **Formel 8** Berechnung der Allelfrequenz für das seltenere Allel: T = q.

Für jeden Genotyp wurde berechnet, welche Anzahl an Patienten nach Hardy-Weinberg zu erwarten war (Formel 9-11).

$$\text{erwartete } CC = p^2 \times 242 = \left(\frac{314}{484}\right)^2 \times 242 = 101,86$$

$$\text{erwartete } CT = 2pq \times 242 = 2 \times \left(\frac{314}{484}\right) \times \left(\frac{170}{484}\right) \times 242 = 110,29$$

$$\text{erwartete } TT = q^2 \times 242 = \left(\frac{170}{484}\right)^2 \times 242 = 29,86$$

**Formel 9-11 Berechnung der nach Hardy-Weinberg erwarteten Patientenzahl für den SNP rs11618521 im untersuchten Patientenkollektiv in Abhängigkeit von der ermittelten Allelfrequenz. Formel 9** Berechnung der erwarteten Anzahl von Patienten mit C/C. **Formel 10** Berechnung der erwarteten Anzahl von Patienten mit C/T. **Formel 11** Berechnung der erwarteten Anzahl von Patienten mit T/T.

Mit dem Chi-Quadrat-Test wurde berechnet (Pearson, 1900), ob die Genotypen im untersuchte Patientenkollektiv nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht verteilt waren (Formel 12). Bei dem Chi-Quadrat-Test gilt, dass die Null-Hypothese auf dem 5%-Signifikanzniveau zurückgewiesen wird, wenn  $X^2 > 3,84$  ist. Die Null-Hypothese ist, dass das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht erfüllt ist. Hier ist  $X^2 = 3$  und somit  $X^2 < 3,84$ . Das Gleichgewicht nach Hardy-Weinberg wurde erfüllt. Die weitere statistische Analyse wurde mit JMP 12.2.0 durchgeführt.

$$\begin{aligned} X^2 &= \sum \frac{(O - E)^2}{E} = \frac{(108 - 101,86)^2}{101,86} + \frac{(98 - 110,29)^2}{110,29} + \frac{(36 - 29,86)^2}{29,86} \\ &= 0,37 + 1,37 + 1,26 = 3 \end{aligned}$$

**Formel 12 Überprüfung der Verteilung der Genotypen des SNP rs11618521 auf das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht mit dem Chi-Quadrat-Test**

Es wurden drei Patientengruppen verglichen. Die Gruppen bestanden aus Patienten mit dem jeweils gleichen Genotyp im SNP rs11618521. Mit dem Shapiro-Wilk-Test wurde geprüft, ob die CAG-Repeatanzahlen und die Erkrankungsalter innerhalb dieser Patientengruppen normalverteilt war. Die Auswertung mit JMP 12.2.0 ergab eine auf dem 5%-Niveau statistisch signifikante Normalverteilung

der Daten ( $p < 0,0001$ ). Mit der ANOVA wurde getestet, ob ein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der CAG-Repeatanzahlen der Patientengruppen gegeben war. Patienten mit C/C hatten eine mittlere CAG-Repeatanzahl von 71,03, Patienten mit C/T eine mittlere CAG-Repeatanzahl von 70,56 und Patienten mit T/T eine mittlere CAG-Repeatanzahl von 72,10. Die Null-Hypothese ist, dass es keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Mittelwerten gibt und wird bei  $p > 0,05$  nicht abgelehnt. In dieser Varianzanalyse war  $p = 0,1243$ . Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der CAG-Repeatanzahlen. Mit ANOVA wurden die Mittelwerte der Erkrankungsalter der drei Patientengruppen mit unterschiedlichem Genotyp verglichen. Patienten mit C/C erkrankten im Schnitt mit 37,92 Jahren, Patienten mit C/T im Schnitt mit 41,33 Jahren und Patienten mit T/T im Schnitt mit 40,41 Jahren. Hier war  $p = 0,0493$ . Da  $p < 0,05$ , musste die Null-Hypothese abgelehnt werden. Es war ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten der Erkrankungsalter gegeben. Um festzustellen, ob ein bestimmter Genotyp einen Einfluss auf das Erkrankungsalter der Patienten hat, wurde ein Regressionsmodell angewandt. Das Erkrankungsalter wurde als Zielgröße festgelegt, Repeatanzahl und Genotyp als Einflussgrößen (Abb. 23). Der Effekttest des Regressionsmodells war auf dem 5%-Niveau statistisch signifikant ( $p = 0,0035$ ). In dem untersuchten Patientenkollektiv machte die CAG-Repeatexpansion alleine 44% der Varianz des Erkrankungsalters aus. Der Polymorphismus rs11618521 im *KPNA3*-Gen übte einen Einfluss von weiteren 2% auf das Erkrankungsalter aus (Tabelle 27, Tabelle 28). Es konnte gezeigt werden, dass durch das Vorliegen unterschiedlicher Genotypen ein statistisch signifikanter Einfluss auf das Erkrankungsalter ausgeübt wurde (Abb. 23). Der Einfluss dieser Parameter auf das Erkrankungsalter, konnte in einer Formel dargestellt werden (Formel 13). Anhand dieser Formel können nun Vorhersagen für das Erkrankungsalter getroffen werden. Liegt bei *KPNA3* rs11618521 der Genotyp C/C vor, so ist das prädiktive Erkrankungsalter im Vergleich zu C/T 2,58 Jahre früher bzw. im Vergleich zu T/T 4,38 Jahre früher. Ein heterozygoter Genotyp lässt einen Krankheitsbeginn 2,32 Jahre vor dem eines homozygoten Genotyps für T/T erwarten. Die günstigste Prognose haben demnach Patienten mit T/T.



**Tabelle 27 Zusammenfassende Betrachtung der Analyse des SNP rs11618-521 im Gen *KPNA3***

Angegeben sind die Bedingungen, die für das Typisierungsassay gewählt wurden. Legende siehe Tabelle 11

Primerpaar	Produktlänge	MgCl <sub>2</sub>	DMSO	HRM	Regressionsanalyse
R216_KPNA3-Prom 21-F1 R217_KPNA3-Prom 21-R1	338	2,5 mM	×	Genotypisierung erfolgreich	Effekttest signifikant

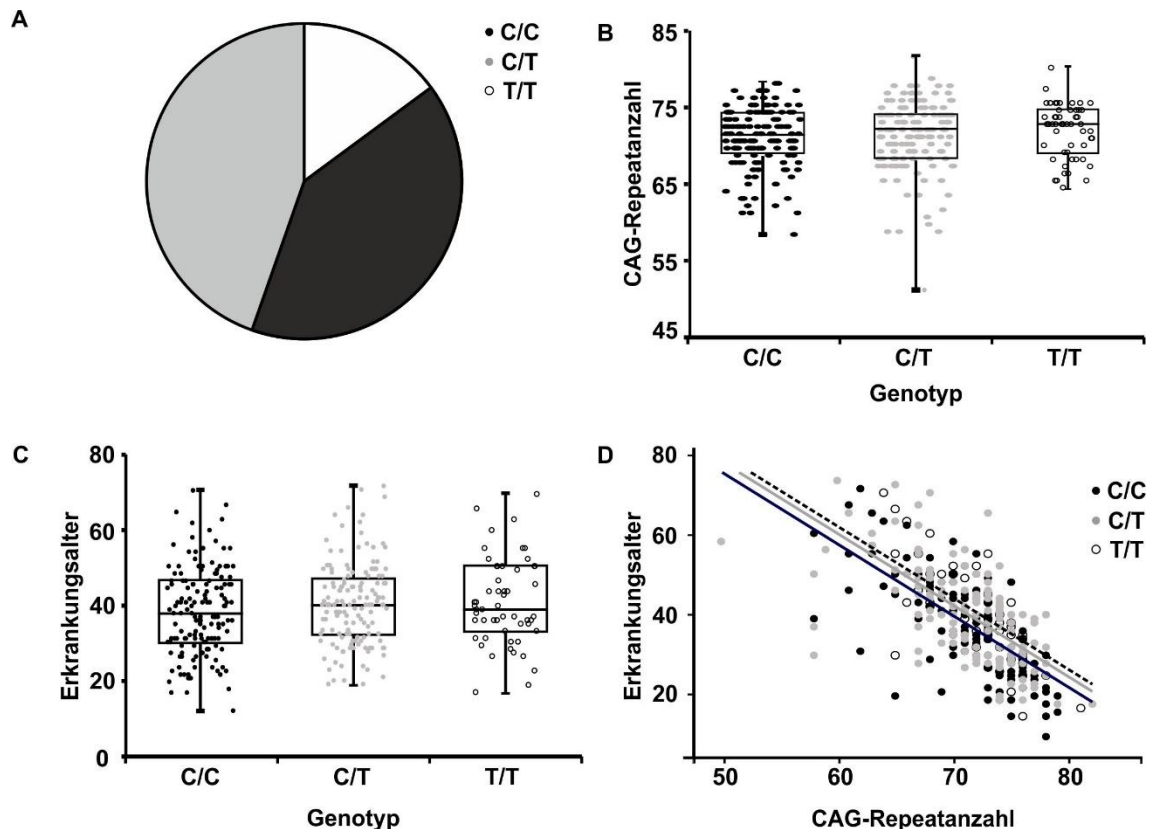
**Tabelle 28 Effektzusammenfassung der Regressionsanalyse für den Einfluss des SNP rs11618521 im Gen *KPNA3* auf das Erkrankungsalter von Patienten mit SCA3**

Anmerkung: R<sup>2</sup>: Bestimmtheitsmaß

Einflussgröße	R <sup>2</sup>	ΔR <sup>2</sup>	p-Wert
CAG-Repeatanzahl	0,44	-	<0.001
Genotyp KPNA3 0=(C/C) 1=(C/T) 2=(T/T)	0,46	0,02	0,0035

$$\text{Prädiktives Erkrankungsalter} = 166 + (-1,77 \times \text{Anzahl der CAG-Repeats}) + \begin{cases} -2,32 & \text{C/C} \\ 0,26 & \text{C/T} \\ 2,06 & \text{T/T} \end{cases}$$

**Formel 13 Formel für das prädiktive Erkrankungsalter** Anhand der Formel lässt sich das zu erwartende Erkrankungsalter eines Patienten berechnen. Im Gegensatz zu der bekannten Formel, die das Erkrankungsalter in Abhängigkeit der CAG-Repeatanzahl berechnen lässt, wird hier der Einfluss des SNP rs11618521 berücksichtigt. In Abhängigkeit vom Genotyp lässt sich nun eine genauere Aussage über das prädiktive Erkrankungsalter treffen. Für einen Patienten mit 70 CAG-Repeats und dem Genotyp C/C ergibt sich laut der Formel ein Erkrankungsalter von 39,78 Jahren (39 Jahre und 9 Monate). Ein Patient hingegen, der ebenfalls 70 CAG-Repeats hat, aber den Genotyp T/T, erkrankt voraussichtlich erst im Alter von 44,16 Jahren (44 Jahre und 2 Monate).



**Abb. 23 Statistische Analyse des SNP rs11618521 im Gen *KPNA3* A. Häufigkeit der Genotypen** Nach Gewichtung der Patienten mit Verwandtschaftsbeziehungen wurde die statistische Analyse an einer Gruppe mit 242 Patienten durchgeführt. Davon hatten 45% den Genotyp C/C (108 Patienten), 40% den Genotyp C/T (98 Patienten) und 15% den Genotyp T/T (36 Patienten). **B. Boxplot zur Darstellung der CAG-Repeatanzahl pro Patientengruppe** Zu sehen ist die Anzahl der CAG-Repeats innerhalb einer Patientengruppe mit gleichem Genotyp. In der Patientengruppe mit C/C kommen zwischen 58 und 79 CAG-Repeats vor (Median: 72). In der Patientengruppe mit C/T kommen zwischen 50 und 82 CAG-Repeats vor (Median: 72). In der Patientengruppe mit T/T kommen zwischen 64 und 81 CAG-Repeats vor (Median: 73). Zwischen den Mittelwerten der CAG-Repeatanzahlen gibt es keinen signifikanten Unterschied (im Schaubild nicht abgebildet). **C. Boxplot zur Darstellung des Erkrankungsalters der Patienten pro Patientengruppe** Dargestellt sind Boxplots, die die Erkrankungsalter der Patienten mit demselben Genotyp zeigen. Patienten mit C/C erkranken zwischen 10 und 71 Jahren (Median: 37). Patienten mit C/T erkranken zwischen 18 und 73 Jahren (Median: 40). Bei den Patienten mit T/T liegen die Erkrankungsalter zwischen 15 und 70 Jahren (Median: 38). Die Varianzanalyse zeigt einen signifikanten Unterschied der Mittelwerte der Erkrankungsalter (im Schaubild nicht abgebildet). **D. Zusammenhang zwischen Anzahl der CAG-Repeats und Erkrankungsalter im Regressionsmodell** Im Diagramm auf der y-Achse sind die Erkrankungsalter, auf der x-Achse die festgestellte CAG-Repeatanzahl der Patienten dargestellt. Der Genotyp der Patienten kann in der Graphik abgelesen werden (C/C: schwarz, C/T: grau, T/T: weis). Abhängig vom Genotyp ist in der entsprechenden Farbe das prädiktive Erkrankungsalter als Ausgleichsgerade dargestellt. Zu sehen ist, dass Patienten mit Genotyp C/C am frühesten erkranken (schwarze Gerade). Das prädiktive Erkrankungsalter von Patienten mit Genotyp C/C liegt 4,38 Jahre vor dem Erkrankungsalter von Patienten mit Genotyp T/T (gestrichelte Gerade). Bei heterozygoten Patienten ist ein früheres Erkranken als bei Patienten mit Genotyp T/T und ein späteres Erkranken als bei Patienten mit Genotyp C/C zu erwarten (graue Gerade).

### 3.4 Zusammenfassende Betrachtung der Ergebnisse

Gegenstand hier durchgeführten Analysen war es, einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Erkrankungsalter von SCA3-Patienten und SNPs in regulatorischen Regionen von Genen von am nukleozytoplasmatischen Transport beteiligten Proteinen aufzudecken. Dazu wurden insgesamt acht SNPs in acht Genen untersucht. Sieben dieser SNPs sind in regulatorischen Regionen der untersuchten Gene lokalisiert, der SNP rs7146310 ist im kodierenden Bereich des Gens *IPO4* lokalisiert. Es gelang Typisierungsassays für zwei Polymorphismen zu etablieren und eine Regressionsanalyse durchzuführen. In der Regressionsanalyse des SNP rs2426109 im *CSE1L*-Gen konnte kein statistisch signifikanter Einfluss auf das Erkrankungsalter festgestellt werden. Für den SNP rs11618521 im *KPNA3*-Gen hingegen zeigte sich in der Regressionsanalyse ein statistisch signifikanter Einfluss auf das Erkrankungsalter (Tabelle 29).

#### **Tabelle 29 Zusammenfassende Betrachtung der untersuchten SNPs und der dafür etablierten Typisierungsassays**

Von insgesamt acht durchgeführten Ansätzen konnten zwei Typisierungsassays etabliert werden. Mit diesen gelang die Regressionsanalyse zur Bewertung des Einflusses der SNPs auf das Erkrankungsalter von Patienten mit SCA3.

Legende siehe Tabelle 9

GEN	SNP	LOKALISATION	ANALYSESTATUS	EINFLUSS DES SNP AUF DAS ERKRANKUNGALTER
<b>KPNA3 (-)</b>	rs11618521	Chromosom 13 Promotor	Regressionsanalyse möglich	Ja
<b>CSE1L</b>	rs2426109	Chromosom 20 Promotor	Regressionsanalyse möglich	Nein
<b>RANBP1</b>	rs713982	Chromosom 22 Intron (TV1) Promotor (TV 2-X6)	schwache Amplifikation im HRM	-
<b>IPO8 (-)</b>	rs12809335	Chromosom 12 5'UTR (TV1, X3) Promotor (TV2- X2)	Nebenbanden in der PCR	-
<b>KPNA2</b>	rs62084683	Chromosom 17 Promotor (TV1) 5'UTR (TV2)	schwache Amplifikation im HRM	-
<b>IPO4 (-)</b>	rs7146310	Chromosom 14 Missense Exon 16/30	Amplifikation mit Nebenbanden im HRM, keine Genotypisierung möglich	-
<b>KPNB1</b>	rs4794016	Chromosom 17 5'UTR (TV1, X3) Promotor (TV2-X2)	Amplifikation im HRM, keine Genotypisierung möglich	-
<b>TNPO1</b>	rs34647	Chromosom 5 5'UTR (TV1) Promotor (TV2-X3)	Amplifikation im HRM, keine Genotypisierung möglich	-

#### 4. Diskussion

Die Spinozerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3), auch Machado-Joseph-Krankheit genannt, ist eine autosomal dominant vererbte, neurodegenerative Erkrankung. Insgesamt sind heutzutage über 40 verschiedene Formen der Spinozerebellären Ataxien bekannt (Sun et al., 2016), welche weltweit mit einer Prävalenz von 3 in 100.000 vorkommen. Die häufigste Form der Spinozerebellären Ataxien ist die SCA3 (Van De Warrenburg et al., 2002). Diese wurde erstmals 1972 bei Familien der Azoren in Portugal beschrieben (Rosenberg et al., 1976; Spence et al., 1972). Dort zeigt sich mit einem Erkrankten in 239 Bewohnern die höchste Prävalenz der SCA3 (Lima et al., 1998). Die SCA3 ist eine progrediente Erkrankung für die aktuell noch keine Kausalthherapie bekannt ist.

Ursächlich für die SCA3 ist eine CAG-Repeatexpansion im *ATXN3*-Gen, das auf Chromosom 14q3.1 lokalisiert ist (Kawaguchi et al., 1994). Die normale Trinukleotidrepeatanzahl liegt zwischen 23 und 43 Triplets. SCA3-Patienten weisen in der Regel zwischen 51 bis 91 CAG-Repeats auf (Saute & Jardim, 2015). Die CAG-Repeatexpansion im *ATXN3*-Gen führt bei der Proteinbiosynthese zu einer verlängerten Polyglutaminregion innerhalb des Proteins Ataxin3. Aufgrund dieser Polyglutaminregion kommt es zu einer Fehlfaltung von Ataxin3 (Kawaguchi et al., 1994). Die fehlgefalteten Proteine bilden Aggregate in Neuronen. Davon betroffen sind vor allem Neurone des Kleinhirns und Hirnstamms (Paulson, 2012). Zwar lässt sich eine statistische Korrelation zwischen Erkrankungsalter und CAG-Repeatanzahl erkennen, doch fällt auf, dass bei gleicher CAG-Repeatanzahl das Erkrankungsalter individuell stark differiert (Li et al., 2015). Die CAG-Repeatanzahl stellt also zwar eine wesentliche Einflussgröße auf das Erkrankungsalter dar, allerdings muss es weitere Einflussfaktoren geben, die sowohl erstmaliges Auftreten der Erkrankung als auch den Krankheitsverlauf beeinflussen.

Ein bekannter Einflussfaktor auf das Erkrankungsalter von SCA3-Patienten ist beispielsweise das Vorliegen einer bestimmten Isoform von Apolipoprotein E (APOE), einem Protein, das am Lipidstoffwechsel beteiligt ist (Mahley, 1988). Es gibt mehrere Isoformen von APOE (Weisgraber et al., 1981). Die bekannteste Isoform ist APOE  $\epsilon$ 4, die bei Alzheimerpatienten gefunden wird und dort das Risiko zu erkranken erhöht und das Erkrankungsalter senkt (Sando et al., 2008).

Wird die Isoform APOE  $\epsilon 2$  bei SCA3-Patienten gefunden, ist diese dort mit einem früheren Erkrankungsalter assoziiert (Bettencourt et al., 2011). Auch die Allele von anderen Polyglutaminerkrankungen haben, neben CAG-Repeatanzahl im *Ataxin3*-Gen, einen Einfluss auf das Erkrankungsalter der SCA3. Eine CAG-Repeatanzahl im oberen Normbereich im Gen *ATXN2* und im Gen *ATN1* setzen das Erkrankungsalter von SCA3-Patienten herab, wohingegen ein verlängertes *HTT* Allel zu einem späteren Erkranken führt (Du Montcel et al., 2014). Darüber hinaus wurden Hinweise entdeckt, dass nicht nur die Polyglutaminregion des Ataxin3, sondern auch die Lokalisation des fehlgefalteten Ataxin3's von Bedeutung für den Krankheitsverlauf ist. Bei Personen, die keine Träger der CAG-Repeat-expansion im *ATXN3*-Gen sind, ist das Ataxin3 vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert (Paulson et al., 1997). Bei an SCA3 erkrankten Patienten sind Fragmente des mutierten Ataxin3's in Form von intranukleären Einschlusskörpern im Zellkern lokalisiert (Schmidt et al., 1998; Paulson et al., 1997). Diese Einschlusskörper bestehen neben Abbauproteinen aus dem C-Terminus des Ataxin3, der die für die Zelle toxische Polyglutaminregion enthält (Haacke et al., 2006; Schmidt et al., 2002; Schmidt et al., 1998). Das Vorkommen von intranukleären Einschlusskörpern im Nucleus scheint maßgeblich mit Schwere und Progredienz der Erkrankung zu korrelieren. Zwar können die Polyglutaminregionen auch in Gehirnbereichen nachgewiesen werden, in denen es nicht zur Neurodegeneration kommt (Yamada et al., 2001), allerdings kommen die intranukleären Einschlusskörper vor allem in den Gehirnbereichen vor, die besonders stark von der Neurodegeneration betroffen sind (Riess et al., 2001). Es wird angenommen, dass die intranukleären Einschlusskörper Resultat eines Abwehrmechanismus sind, um die Zelle vor der Polyglutaminregion zu schützen (Saudou et al., 1998). Im Tiermodell wurde festgestellt, dass transgene Mäuse, die 148 CAG-Repeats im *ATXN3*-Gen haben, einen sehr schweren Phänotyp entwickeln. Bei Mäusen hingegen, bei denen dieses Konstrukt mit einem nukleären Export Signal verknüpft wurde, ist der Phänotyp bedeutend schwächer ausgeprägt (Bichelmeier et al., 2007). Ein Zusammenhang zwischen dem intranukleären Vorkommen der Polyglutaminregion und daraus folgend erschwerten Erkrankungsmodalitäten ist also äußerst naheliegend, weswegen in der Literatur die Inhibierung des nukleären

Transportvorgehens als möglicher Therapieansatz für SCA3 und andere Polyglutaminerkrankungen genannt wird (Sowa et al., 2018; Bichelmeier et al., 2007; Jackson et al., 2003).

#### **4.1 Auswahl der Gene und Einzelnukleotidpolymorphismen**

Der nukleozytoplasmatische Transport beruht auf dem Zusammenspiel vieler beteiligter Proteine. Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung von SNPs in Genen von ausgewählten Proteinen, die am Kerntransport beteiligt sind, auf einen Einfluss auf das Erkrankungsalter der SCA3. Bei SNPs handelt es sich um Polymorphismen, die sich nur durch eine Base unterscheiden und deren selteneres Allel zu mehr als 1% vorkommt (Karki et al., 2015). SNPs sind also sehr häufig. Sie machen 90% der genetischen Sequenzvarianten von unterschiedlichen Personen aus, bei den übrigen 10% handelt es sich um Insertionen und Deletionen (Collins et al., 1998). Grundsätzlich können SNPs in codierenden oder in nicht codierenden Regionen lokalisiert sein. Am häufigsten sind SNPs in intergenischen Regionen (Hindorff et al., 2009; Nickerson et al., 1998). In dieser Arbeit wurden vor allem SNPs untersucht, die in den regulatorischen Regionen der Gene lokalisiert sind. Dies lässt sich damit begründen, dass SNPs in regulatorischen und codierenden Regionen mit höherer Wahrscheinlichkeit einen Einfluss auf den Phänotyp zeigen (Collins et al., 1998). Die regulatorischen Regionen waren dabei besonders zur Untersuchung auf SNPs geeignet, weil SNPs im Upstream bzw. im Promotorbereich eines Gens dessen Expression verändern können. Dadurch können diese, ohne in den Exons des Gens selbst lokalisiert zu sein, einen starken Einfluss auf den Phänotyp ausüben (Shastry, 2009; Blank et al., 2005). Dies erklärt sich dadurch, dass die SNPs die Bindungsaktivität von Transkriptionsfaktoren verändern können (Myers et al., 2007). Ist ein SNP upstream im Bereich eines Enhancers oder Silencers lokalisiert, so kann es durch das veränderte Binden von Transkriptionsfaktoren zu einer Über- bzw. Unterexpression des Gens kommen (Heinz et al., 2013). Hindorff et al. (2009) konnten zeigen, dass SNPs, die einen Einfluss auf die Ausprägung einer Krankheit haben, in der Regel mit einer Allelfrequenz des selteneren Allels von über 5% auftreten. In der vorliegenden Arbeit wurde die Untersuchung auf solche Polymorphismen beschränkt, die mit einer Frequenz von mehr als 15% des selteneren Allels

vorkamen, was unter Berücksichtigung dieser Studie die Wahrscheinlichkeit erhöhte, dass es sich bei den untersuchten Polymorphismen um SNPs mit Einfluss auf die Krankheit handelte (Hindorff et al., 2009).

In dieser Arbeit wurden vor allem diejenigen Gene berücksichtigt, für die eine Beteiligung am Transport von Ataxin3 vermutet wird (Sowa et al., 2018; Koebisch, persönliche Mitteilung). Für den Import in den Zellkern ist ein Zusammenspiel verschiedener Proteine nötig. Die Gene von acht Proteinen, die an dem Import beteiligt sind, wurden hier untersucht. Große Proteine, die in den Nucleus gelangen sollen, tragen in der Regel ein Nuclear Localisation Signal (NLS). Die Karyopherine- $\alpha$  (KPNA) sowie Importin 4 (Jäkel et al., 2002) erkennen dieses NLS und binden es (Stewart, 2007; Goldfarb et al., 2004). Die Karyopherine- $\beta$  (KPNB) binden an den Komplex aus NLS und KPNA (Mingot et al., 2009; Jäkel et al., 1999; Jäkel & Görlich, 1998). Der Komplex aus KPNB, KPNA und NLS gelangt daraufhin in den Zellkern. Nach Dissoziation dieses Komplexes folgen die Importine gebunden an Ran-GTP (Hieda et al., 1999) bzw. CAS (Sun et al., 2013) entlang einem Ran-GTP/Ran-GDP Gradienten zurück ins Zytoplasma (Nachury et al., 1999). Die Hydrolyse von GTP zu GDP durch das Protein Ran-GTPase führt zur Dissoziation von Ran-GTP und Importinen, welche nun für einen erneuten Import zur Verfügung stehen (Bischoff & Görlich, 1997; Melchior et al., 1993). Ran-binding-Protein-1 beschleunigt diesen Prozess (Bischoff & Görlich, 1997; Bischoff et al., 1995). Importin 4 und 8 interagieren ebenfalls mit Ran-GTP (Görlich et al., 1997; <http://www.gene-cards.org>, 25.04.2019).

Es wird angenommen, dass eine Entzündungsreaktion, die zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies führt, zur Neurodegeneration im Rahmen der SCA3 beiträgt (Evert et al., 2003). Die hier genannten Proteine werden *in vitro* in ihrer Funktion stark durch die bei diesen Entzündungsreaktionen entstehende Radikale eingeschränkt (Kodiha et al., 2004). Daher sind diese Proteine nicht nur allein aufgrund ihrer Transportfunktion von Proteinen in den Nucleus, sondern auch aufgrund der besonderen Anfälligkeit dieser Transportfunktion durch neurodegenerative Prozesse als potenzielle modifizierende Faktoren der SCA3 besonders interessant. Vor allem die Karyopherine- $\alpha$ , aus deren Gruppe in der vorliegenden Arbeit KPNA2 und KPNA3 untersucht wurden, sind im Hinblick auf einen Einfluss

auf den Pathomechanismus der SCA3 vielversprechend, da bereits gezeigt werden konnte, dass der Spiegel von KPNA bei steigendem oxidativem Stress sinkt (Kodiha et al., 2008). Denkbar wäre, dass die in diesem Rahmen niedrigen KPNA-Spiegel mit einer Veränderung der Lokalisation von Ataxin3 verbunden sind. Darüber hinaus ist aus unterschiedlichen Bereichen der Forschung bekannt, dass KPNA bei der subzellulären Lokalisation von Proteinen eine Rolle spielt. So konnte kürzlich der Einfluss von KPNA2 für die Lokalisation von Proteinen gezeigt werden, die eine Rolle bei der Pathogenese des Mamma-Karzinom spielen und die eine prognostische Relevanz haben (Alshareeda et al., 2015; Christiansen & Dyrskjøt, 2013). Bei Patienten mit Frontotemporaler Demenz, die im Gehirn TDP-43-Ablagerungen aufweisen, ist KPNA2 reduziert (Nishimura et al., 2010). Anstatt im Nucleus, wie bei Gesunden, ist bei diesen TDP-43 im Zytoplasma abgelagert (Arai et al., 2006). Dies lässt darauf schließen, dass der Mangel an KPNA2 den Import von TDP-43 in den Nucleus beeinträchtigt. Ein ähnlicher Mechanismus für den Import von Ataxin3 im Rahmen der SCA3 wäre daher denkbar.

Auch für die KPNBs, von denen in der vorliegenden Studie *KPNB1* und *TNPO1* untersucht wurden, gibt es Hinweise, die eine Rolle für die Pathogenese der SCA3 überaus wahrscheinlich machen. Für *KPNB1* und *TNPO1* wird ein Einfluss auf die Lokalisation von Huntingtin, dem betroffenen Protein bei Chorea Huntington vermutet, da dieses ein NLS aufweist, das von *KPNB1* bzw. *TNPO1* erkannt wird (Maiuri et al., 2013). In Anbetracht der sehr ähnlichen Pathogenese von Chorea Huntington und SCA3, lag die Annahme nahe, dass diese Proteine eine ähnliche Relevanz bei der SCA3 haben könnten.

#### **4.2 Stärken und Schwächen der angewandten Methoden**

Um einen möglichen Einfluss der untersuchten SNPs in auf das Erkrankungsalter von SCA3-Patienten aufzudecken wurde zunächst eine Genotypisierung der Patienten mittels Schmelzkurvenanalyse im High-Resolution Melting (HRM) und der Sanger-Sequenzierung durchgeführt. Im HRM wurden die Patienten einer Schmelzkurvengruppe zugeordnet. Mittels Sanger Sequenzierung wurde der Genotyp der Proben einer Schmelzkurvengruppe bestimmt (Sanger et al., 1977). Es sind zahlreiche verschiedene Möglichkeiten bekannt, mit denen SNPs



genotypisiert werden können (Kwok & Chen, 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde das High-Resolution Melting (HRM) gewählt, weil es sich dabei um eine Methode handelt, die im Vergleich zu anderen einige Vorteile hat. Das HRM ist ein etabliertes und viel genutztes Verfahren, um Patienten auf Polymorphismen zu untersuchen. Im Vergleich zu anderen gängigen Genotypisierungsmöglichkeiten hat das HRM dabei den Vorteil, einen nur geringen Kosten- und Arbeitsaufwand zu benötigen (Vossen et al., 2009). Es eignet sich besonders dazu, große Gruppen, wie die hier erfassten 517 Patientenproben, schnell zu genotypisieren (Vossen et al., 2009). Hinsichtlich Spezifität und Sensitivität ist es dabei anderen Verfahren ebenbürtig (Erali & Wittwer, 2010, Evrand et al., 2008). HRM ist als eine Methode beschrieben, mit der es möglich sein soll, nahezu alle SNPs zu genotypisieren (Liew et al., 2004). Dennoch können, wie auch in der vorliegenden Arbeit beobachtet, Probleme bei der Genotypisierung auftreten. Voraussetzung für eine zuverlässige Genotypisierung ist zum einen die ausreichende Amplifikation des zu untersuchenden DNA-Abschnittes, zum anderen die Zuordnung zu Schmelzkurvengruppen.

Ein Problem, das die Genotypisierung in der vorliegenden Arbeit erschwerte, war das Auftreten von Nebenbanden. Binden Primer nicht an die Sequenz, für die sie vorgesehen und komplementär sind, so kann eine DNA-Region amplifiziert werden, die nicht den gewünschten Bereich enthält (Garibyan & Avashia, 2013). In der Gelelektrophorese stellen sich diese Produkte als Nebenbanden dar. Insbesondere bei der Genotypisierung von rs34647 (*TNPO1*) und rs12809335 (*IPO8*) stellte dieses Phänomen den limitierenden Faktor der Untersuchung dar, da bei den wenigen Proben, die amplifiziert wurden, häufig Nebenbanden zu sehen waren und das Generieren von anderen Primerpaaren nicht möglich war.

Bei Reed & Wittwer (2004) konnte gezeigt werden, dass die Amplifikation von kleinen PCR-Produkten im Light Cycler besser funktioniert als die von großen. Allerdings musste auch beachtet werden, dass die Primer für die PCR bestimmte Kriterien erfüllen sollten (Chuang et al., 2013; Reed & Wittwer, 2004; Laborintern erprobte Maßnahmen). Häufig war es nicht möglich, Primer zu generieren, die diesen Anforderungen entsprachen, ohne dass dabei in der PCR ein mehr als 230 bp langes Amplikon erzeugt wurde. In den Typisierungsassays, in denen die

Amplikons länger waren, wurde keine oder eine nicht zur Schmelzkurventypisierung ausreichende Amplifikation beobachtet. Die nicht zur Schmelzkurvenanalyse ausreichende Amplifikation der Typisierungsassays von rs62084683 (*KPNA2*), rs713982 (*RANBP1*) mit den Primerpaaren R16/R137, R839/R840 und R837/R840 sowie rs4794016 (*KPNB1*) mit den Primerpaaren R835/R836 und R189/R190 ist vermutlich auf die Länge der Amplikons zurückzuführen.

Nicht nur die Amplifikation, sondern auch die Schmelzkurvenanalyse im HRM konnte durch die Größe des Amplikons beeinträchtigt werden. Es ist bekannt, dass bei sehr kleinem Amplikon die Differenzierung zwischen Schmelzkurven und Primerdimeren in der Auswertung der Schmelzkurvenanalyse zu Problemen führen kann (Pichler et al., 2009, Liew et al., 2004). Generell gilt aber, dass die Unterschiede der Schmelzkurven mit zunehmender Amplikonlänge kleiner werden. Dieser Effekt verliert sich erst wieder ab einer Größe von mehr als 400 bp (Gundry et al., 2003). Dies konnte der Grund sein, dass bei dem Typisierungsassay von rs7146310 (*IPO4*), welches ein Amplikon von 243 bp erzeugte, keine Unterscheidung der Genotypen anhand der Schmelzkurvenanalyse möglich war. Bei dieser Analyse war jedoch auch die Region um den Polymorphismus nicht optimal zur Genotypisierung mittels Schmelzkurvenanalyse geeignet. Denn in Forschungsarbeiten, die sich näher mit dem HRM befassten, wurde herausgefunden, dass nicht nur das Typisierungsassay, sondern auch die Region um den Polymorphismus und der SNP selbst, die Typisierung im HRM erschweren können. Wie bei Evrand et al. (2008) gezeigt, wird das Schmelzverhalten durch den GC-Gehalt des untersuchten DNA-Abschnittes beeinflusst. Ein zu hoher GC-Gehalt konnte Ursache dafür sein, dass die Schmelzkurven nicht zuverlässig unterschieden werden konnten, wie beispielsweise bei dem Typisierungsassay von rs7146310 (*IPO4*) beobachtet. Dieses produzierte ein Amplikon mit einem 62%-igem und damit recht hohem GC-Gehalt, weswegen hier zur Genotypisierung eine unmarkierte Sonde zur Anwendung kam.

Insbesondere bei SNPs mit den Basenpaaren A/T und G/C ist eine Unterscheidung der Schmelzkurven von Proben mit homozygotem Genotyp oft schwierig, da sich diese meist nur um weniger als 0,4°C unterscheiden (Liew et al., 2004). Eine bewährte Methode, um die Differenzierung zwischen den Schmelzkurven

mit unterschiedlichem Genotyp im HRM zu ermöglichen, ist die Anwendung von unmarkierten Sonden. Im Vergleich zu anderen Verfahren ist hier der Vorteil, dass nur eine Sonde generiert werden muss, mit der alle Genotypen unterschieden werden können (Wittwer et al., 2001). Die unmarkierten Sonden sollen die Differenz der Schmelzkurventemperaturen auf bis zu zwischen 3°C und 4°C erhöhen (Zhang et al., 2012). Auch in der vorliegenden Arbeit kamen unmarkierte Sonden zur Anwendung. Diese wurden in symmetrischen und asymmetrischen PCR getestet. Bei der symmetrischen PCR liegen die Amplikons nach der PCR als Doppelstränge vor, was das Binden der Sonde erschweren kann. So ist es möglich, dass, wie in der vorliegenden Arbeit bei dem Typisierungssassay des SNP rs7146310 (*IPO4*) und rs2426109 (*CSE1L*) beobachtet, in der Schmelzkurvenanalyse kein Abschmelzen der Sonde detektiert werden kann. Dies lässt darauf schließen, dass diese nicht ans PCR-Produkt gebunden vorliegt. Darüber hinaus kann beim Abschmelzen von längeren Sonden ein stärkeres Signal detektiert werden (Erali et al., 2008). Sowohl bei rs7146310 in *IPO4* als auch bei rs2426109 in *CSE1L* waren die unmarkierten Sonden mit 20 bzw. 25 Basenpaaren möglicherweise so kurz, dass dies die Detektion erschwerte. Auch ist die Anwendung von unmarkierten Sonden unter anderem sinnvoll, wenn in der zu amplifizierenden Region ein niedriger GC-Gehalt vorliegt (Smith et al., 2010). Bindet die Sonde an einen Bereich mit sehr hohem GC-Gehalt, so kann dies die Amplifikation erschweren (Poulson & Wittwer, 2007). Insbesondere bei der Genotypisierung von rs7146310 (*IPO4*), bei dem die Sonde an einen Bereich binden sollte, dessen GC-Gehalt bei 75% lag konnte dies eine weitere Ursache für die nicht mögliche Genotypisierung sein.

Vorteil der asymmetrischen PCR ist, dass ein Strang überproduziert wird und dadurch das Reannealing von Vorwärts- und Rückwärtsstrang verhindert wird (Gyllensten & Erlich, 1988). Zur Genotypisierung im HRM mit unmarkierten Sonden werden daher im allgemeinen asymmetrische PCRs bevorzugt (Zhou et al., 2005). Ein Nachteil der asymmetrischen PCRs ist allerdings, dass die Amplifikation im Vergleich zur symmetrischen PCR wesentlich schwächer ausfällt (Ruijter et al., 2009; Gyllensten & Allen, 1993). Bei bereits schwacher Amplifikation in der symmetrischen PCR war es daher nicht verwunderlich, dass die Amplifikation im

Falle der Typisierungssassays von rs4794016 (*KPNB1*) und rs7146310 (*IPO4*) nicht ausreichte, um eine Schmelzkurvenanalyse durchzuführen. Waren in der Schmelzkurvenanalyse nur homozygote von heterozygoten Genotypen zu unterscheiden, gelang es dennoch, diese ohne Sonde zu genotypisieren, indem eine homozygote DNA-Probe mit bekanntem Genotyp beigemischt wurde (Liew et al., 2004).

Aufgrund der in 5.1 hervorgehobenen Rolle der analysierten SNPs und der Gene, in denen diese lokalisiert sind, ist deren weitere Prüfung auf einen möglichen Einfluss der SCA3 empfehlenswert. Die Genotypisierung des Patientenkollektivs auf die SNPs rs713982, rs12809335, rs62084683, rs7146310, rs4794016 und rs34647 war in der vorliegenden Arbeit trotz Optimierung und Ausschöpfung gängiger Verbesserungsversuche des HRM nicht möglich. Es konnte daher gezeigt werden, dass sich das HRM nicht als optimale Methode zur Genotypisierung auf diese SNPs eignet. Um einen möglichen Zusammenhang dieser SNPs und der SCA3 aufzudecken, wird daher empfohlen, andere Methoden zur weiteren Analyse in Betracht zu ziehen.

#### **4.3 Rs2426109 im *Chromosome-Segregation-1-like-Gen (CSE1L)***

Bei CSE1L handelt es sich um ein Protein, dessen Rolle, im Gegensatz zu den oben genannten Proteinen, hauptsächlich für den Export aus dem Nukleus relevant wird. Es fungiert als Mediator für den Export der Importin- $\alpha$  Einheit des Importin-Substrat-Komplexes. CSE1L bindet in Anwesenheit von Ran-GTP im Nucleus an Importin- $\alpha$ . Dieser Komplex dockt an die Kernporen an und wird ins Zytoplasma transportiert. Auf der zytoplasmatischen Seite des NPC wird Ran-GTP durch RANBP1 und Ran-GAP zu Ran-GDP hydrolysiert. Der Komplex aus Importin- $\alpha$ , Ran-GTP und CSE1L zerfällt. Importin- $\alpha$  steht nun erneut dem Import eines Substrates zur Verfügung (Kutay et al., 1997). Das Gen für CSE1L befindet sich auf Chromosom 20q13.13. Im Gesunden sind vier verschiedene Isoformen bekannt (Brinkmann et al., 1999; Jiang et al., 2001).

Aufgrund seiner Bedeutung für die Pathogenese vieler Tumorarten ist CSE1L aktuell das Objekt zahlreicher Forschungsarbeiten. Es konnte gezeigt werden, dass CSE1L einen Einfluss auf die Mitose, Apoptose und Zellproliferation hat (Brinkmann et al., 1995). Veränderungen in CSE1L führen zu Fehlern bei der

chromosomalen Segregation (Pimiento et al., 2016; Zhu et al., 2013; Brinkmann et al., 1995). Bei vielen malignen Erkrankungen des Urogenitaltrakts, wie beispielsweise dem Ovarial-Karzinom (Brustmann, 2004), dem Endometrial-Karzinom (Peiró et al., 2001), dem Prostata-Karzinom (Bar-Shira et al., 2002) und dem Mamma-Karzinom (Tai et al., 2010), konnte die Expression von CSE1L nachgewiesen werden. Aber auch bei anderen Tumoren, wie dem Hepatozellulären Karzinom oder dem Kolon-Karzinom wird CSE1L exprimiert. Ist bei diesen Tumoren CSE1L verstärkt exprimiert, so ist dies häufig mit einem höhergradigen Tumorstadium assoziiert und zeigt eine schlechtere Prognose für den Patienten (Aust et al., 2004; Zhu et al., 2013; Winkler et al., 2016). Im Gesunden zeigt sich vor allem im Bereich der Testes, des Ösophagus und der Placenta eine hohe Expression von CSE1L (Brinkmann et al., 1999). Die Expression ist also in überwiegend stark proliferativem Gewebe hoch (Scherf et al., 1996; Wellmann et al., 1997). Im Hinblick auf die hier durchgeführte Analyse ist besonders bemerkenswert, dass sich auch im Gehirn und in peripheren Nerven eine verhältnismäßig hohe CSE1L-Expression zeigt (Brinkmann et al., 1999). Dass CSE1L durch seine Funktion im Kerntransport eine Rolle für Neurodegenerative Erkrankungen spielt, wird bei dem idiopathischen Parkinson Syndrom vermutet und konnte bereits am Beispiel der Frontotemporalen Demenz gezeigt werden (Nishimura et al., 2010). Bei dem idiopathischen Parkinson Syndrom kommt es zu einer Neurodegeneration der dopaminergen Neurone in der Substantia Nigra (Fearnley & Lees, 1991). In diesem Bereich konnte bei Parkinson-Patienten eine Down-Regulation von CSE1L festgestellt werden (Zhang et al., 2010). Bei der Frontotemporalen Demenz handelt es sich um eine Erkrankung, bei der in den Nervenzellen von Patienten zytoplasmatische Einschlusskörper festgestellt werden können. Im Gegensatz zur SCA3, bei der ebenfalls Einschlusskörper auftreten, sind diese bei Patienten mit Frontotemporalen Demenz nicht im Nucleus, sondern im Zytoplasma lokalisiert (Iseki et al., 1998; Bergman et al., 1996). Die Einschlusskörper enthalten das Protein TDP-43 (Neumann et al., 2006). Bei Gesunden liegt TDP-43 im Nucleus vor. Im Zellmodell führte ein CSE1L-Knock-out zu vermehrter Einschlusskörperbildung im Zytoplasma, weswegen darauf geschlossen wurde, dass das Protein nach der Translation im Zytoplasma verbleibt, weil der Transportmechanismus in

den Nucleus ohne funktionsfähiges CSE1L gestört wurde (Nishimura et al., 2010). Es wurde also bereits nachgewiesen, dass CSE1L eine hohe Expression im Gehirn hat und darüber hinaus die subzelluläre Lokalisation von krankheitsauslösenden Proteinen beeinflusst. In Anbetracht dessen, dass auch bei der SCA3 die Lokalisation von Ataxin3 entscheidend für die Ausprägung der Erkrankung ist, wenn auch hier die Lokalisation im Nucleus als pathologisch gilt, war die Analyse von CSE1L in der vorliegenden Arbeit besonders interessant.

Bei rs2426109 handelt es sich um einen C/G Einzelnukleotidpolymorphismus. Dieser liegt in der Promotorregion des Gens. Die Genotypisierung der Patienten auf den Polymorphismus rs2426109 war allein anhand der Schmelzkurvenanalyse nicht möglich, da lediglich eine Aufteilung in zwei Gruppen, eine bestehend aus heterozygoten und eine aus allen homozygoten Proben, gegeben war. Die Ursache dafür war vermutlich das sich sehr ähnelnde Schmelzverhalten der Basen Cytosin und Guanin (Liew et al., 2004). Aus diesem Grunde wurde eine Sonde angewandt. Es zeigte sich nur bei symmetrischer PCR eine Amplifikation. Möglich ist, dass die Primerkonzentration des im Verhältnis schwächer eingesetzten Primers bei den asymmetrischen PCRs zu gering für eine Amplifikation war (Ruijter et al., 2009; Gyllensten & Allen, 1993). In der Schmelzkurvenanalyse der symmetrischen PCR war kein Abschmelzen der Sonde zu sehen. Das konnte dem Umstand geschuldet sein, dass das Fluoreszenzsignal aufgrund der Länge von lediglich 25 Basenpaaren zu schwach war (Erali et al., 2008). Wahrscheinlicher ist, dass eine Detektion des Schmelzverhaltens der Sonde nur dann erfolgreich gewesen wäre, wenn diese an einen überproportional produzierten Strang gebunden hätte.

Erfolgreich war die Genotypisierung des Patientenkollektivs mittels Beimischung von homozygoter CEPH-DNA zu den homozygoten Patientenproben. Es konnten 421 Patienten genotypisiert werden. In der untersuchten Patientengruppe waren unter anderem Patienten aus denselben Familien erfasst worden. Da für die statistische Analyse ein Gewichtungsfaktor erstellt wurde, der diese Verwandtschaftsbeziehungen berücksichtigte, kann davon ausgegangen werden, dass die Ergebnisse dadurch nicht verfälscht wurden. Diese Annahme unterstützt die Tatsache, dass das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht erfüllt war, da Erfüllung dieses

Gleichgewichts auf eine zuverlässige Genotypisierung schließen lässt (Hosking et al., 2004). Sowohl zwischen Mittelwerten der CAG-Repeatanzahlen als auch Mittelwerten der Erkrankungsalter von Patientengruppen mit gleichem Genotyp zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied. Im Regressionsmodell zeigte sich auf dem 5% Signifikanzniveau kein Zusammenhang zwischen Genotyp und Erkrankungsalter (p-Wert = 0,8653). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen entweder darauf schließen, dass dieser Polymorphismus keinen Einfluss auf eine mögliche Überexpression des Genes *CSE1L* hat, oder, dass der Polymorphismus zwar eine Expressionsveränderung bedingt, diese aber keinen Einfluss auf das Krankheitsgeschehen der SCA3 hat. Letzteres wäre dann der Fall, wenn *CSE1L* keinen modifizierenden Faktor der SCA3 darstellte. In Anbetracht der bereits erwähnten Rolle von *CSE1L* für den nukleozytoplasmatischen Transport (Kutay et al., 1997) und andere neurodegenerative Erkrankungen (Nishimura et al., 2010; Kim et al., 2007) ist es sicherlich sinnvoll, weitere Analysen des Gens selbst und der regulatorischen Regionen von *CSE1L* durchzuführen.

#### **4.4 Rs11618521 im *Karyopherin- $\alpha$ 3-Gen (KPNA3)***

Bei Karyopherin- $\alpha$ 3 (KPNA3) handelt es sich um ein Protein der Familie der Karyopherine. Diese sind am Transport zwischen Zytoplasma und Nukleus beteiligt (Radu et al., 1995). Die Karyopherin- $\alpha$ -Proteine sind an dem energieunabhängigen Schritt des Transports durch den Nuclear Pore Complex beteiligt. Karyopherin- $\alpha$ 3, auch Importin- $\alpha$ 4 genannt, erkennt das NLS des zu transportierenden Proteins und bindet dieses (Nachury et al., 1998). Gleichzeitig bindet das Protein Karyopherin- $\alpha$  an Karyopherin- $\beta$ . Dieser Komplex dockt an die Kernporen an und wird in den Nukleus transportiert (Görlich et al., 1995; Görlich et al., 1995). Ist die Kernmembran durchschritten, gibt KPNA3 das transportierte Substrat frei und gelangt zurück ins Zytoplasma (Görlich & Kutay, 1999). Das Gen *KPNA3* ist auf Chromosom 13q14.3 lokalisiert (Takeda et al., 1997).

KPNA3 ist das Objekt von Forschung in verschiedenen Bereichen der Medizin. Bekannt ist bereits, dass KPNA3 einen Einfluss auf neuropsychiatrische Erkrankungen hat. In Linkage-Studien wurde die Region, in der *KPNA3* lokalisiert ist, mit einer Anfälligkeit für bipolarer Störung und Schizophrenie in Verbindung

gebracht (Badner & Gershon, 2002; Camp et al., 2001). Daraufhin konnte ein Zusammenhang von SNPs im *KPNA3*-Gen und der Ausbildung einer Schizophrenie in bestimmten Populationen (Wei & Hemmings, 2005; Zhang et al., 2006), sowie der Ausbildung einer Opiat- und Alkoholabhängigkeit nachgewiesen werden (Morris et al., 2012). Diese SNPs sind, wie auch der hier untersuchte SNP, in nichtkodierenden Regionen von *KPNA3* lokalisiert. Die stärkste Assoziation zur Schizophrenie zeigt ein A/G Polymorphismus im Intron 5 (rs2273816) (Wei & Hemmings, 2005).

Auch im Bereich der neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere der Pathogenese von Polyglutaminerkrankungen, ist *KPNA3* zunehmend in den Fokus der Forschung gerückt. In mehreren Studien wurde bereits der Zusammenhang zwischen nukleärer Lokalisation des Ataxin3 und der Schwere der Symptomatik der SCA3 dargestellt (Bichelmeier et al., 2007). Das Vorhandensein von Ataxin3 im Zellkern ist demnach ein essenzieller Faktor für die Ausbildung von Symptomen. Durch aktiven Transport gelangt Ataxin3 in den Zellkern (Macedo-Ribeiro et al., 2009). Ist Ataxin3 nur im Zytoplasma vorhanden, bleibt ein Erkrankter aus (Bichelmeier et al., 2007). Dass *KPNA3* eine wesentliche Rolle für den Transport von Polyglutaminproteinen in den Nucleus spielt, wurde bereits im Tiermodell an *Drosophila Melanogaster* an  $\alpha 1$ ACT, einer Untereinheit des Kalziumkanals CACNA1A, gezeigt. Dieses ist der betroffene, im Nucleus lokalisierte Proteinanteil der SCA6, bei der es sich ebenfalls um eine neurodegenerative Polyglutaminerkrankung handelt, die in ihren Pathomechanismen Ähnlichkeit mit der SCA3 aufweist. Ein Knockdown von *KPNA3* führte dort zu einer Linderung der Symptome durch verminderte Proteinaggregation im Zellkern (Tsou et al., 2015). Dieses Phänomen lässt sich *in vitro* und *in vivo* auch für die SCA3 beobachten. Im Zellmodell haben Zellen mit einer Überexpression von *KPNA3* eine höhere Ataxin3 Konzentration im Nucleus als andere mit normaler *KPNA3* Konzentration (Sowa et al., 2018). Die Toxizität des Polyglutaminproteins entfaltet seine Wirkung vor allem dann, wenn es sich im Zellkern befindet (Bichelmeier et al., 2007). Eine Modifikation der *KPNA3* Konzentration beeinflusst dementsprechend durch veränderte intranukleäre Verteilung des Proteins Ataxin3 die Symptomatik der Krankheit. Dies wurde im Fliegenmodell und im Mausmodell anhand bestimmter



etablierter Parameter wie veränderte Schrittlänge und Gehverhalten, Anxiety und Aktivitätslevel beobachtet. KPNA3 Knock-out Fliegen bzw. Mäuse weisen eine geringere Konzentration von Ataxin3 im Nucleus auf und zeigen weniger krankheitsdefinierende Zeichen als die Vergleichsgruppe ohne Knock-out (Sowa et al., 2018). Die Erkenntnisse im Tiermodell geben Aufschluss über die Rolle von KPNA3 als Schlüsselprotein und als ein vielversprechendes Therapieziel der SCA3.

Im vorliegenden Projekt wurde erstmalig der Einfluss von KPNA3 auf die SCA3 beim Menschen untersucht. Der analysierte SNP rs11618521 ist in der Promotorregion des Gens *KPNA3* ca. 1100 Basenpaare upstream des Startcodons lokalisiert. Es handelt sich um einen C/T-Polymorphismus. Um die Krankheitschwere der Patienten zu objektivieren und zu vergleichen, wurde das Erkrankungsalter als Parameter festgesetzt.

Auch in der vorliegenden Arbeit sprechen die Ergebnisse für einen starken Einfluss von KPNA3 auf das Erkrankungsalter. Die Genotypisierung der Proben mittels HRM war bei 350 Patienten zuverlässig möglich. Da in der untersuchten Patientenpopulation auch einige Familien mit mehr als einem erkrankten Mitglied erfasst worden waren, wurde für diese Patienten ein Gewichtungsfaktor angewendet. Da das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht erfüllt war, kann angenommen werden, dass die Genotypisierung zuverlässig durchgeführt wurde (Hosking et al., 2004). In der einfaktoriellen Varianzanalyse fiel auf, dass es einen signifikanten Unterschied zwischen den Mittelwerten der Erkrankungsalter der drei Patientengruppen mit Genotyp C/C, C/T bzw. T/T gab. Die Mittelwerte der CAG-Repeatanzahlen hingegen unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Also wurden die Unterschiede der Erkrankungsalter somit nicht etwa dadurch verursacht, dass die Patienten in einer Gruppe höhere bzw. niedrigere CAG-Repeatanzahlen hatten als in den anderen beiden. Es musste einen anderen Einflussfaktor auf das Erkrankungsalter geben.

Dieser wurde in der Regressionsanalyse bestimmt. Das hier angewandte Regressionsmodell zeigt, dass die unterschiedlichen Genotypen von rs11618521 einen statistisch signifikanten Einfluss auf das Erkrankungsalter haben. Anhand der CAG-Repeatanzahl als alleinige Einflussgröße lässt sich ein prädiktives

Erkrankungsalter berechnen. Das tatsächliche Erkrankungsalter der Patienten weicht individuell allerdings oft stark von diesem ab. Nach Modifikation der Formel zur Berechnung des prädiktiven Erkrankungsalters, unter Berücksichtigung der hier gewonnenen Ergebnisse, ist eine genauere Prognose möglich. Es zeigt sich, dass das voraussichtliche Erkrankungsalter von Patienten bei gleicher CAG-Repeatanzahl mit Genotyp C/C signifikant früher auftritt, als bei heterozygoten Patienten, oder Patienten, die homozygot für Thymin sind. Heterozygote haben die Prognose erst ca. 2,5 Jahre später und Homozygote mit Genotyp T/T sogar erst über 4 Jahre später zu erkranken. Wie bereits erwähnt, führt eine verminderte KPNA3 Konzentration zu einer verminderten Ataxin3 Konzentration im Nucleus und in Folge dessen zu einem abgeschwächten Phänotyp im Tiermodell (Sowa et al., 2018), da Ataxin3 seine schädliche Wirkung im Zellkern vermittelt (Bichelmeier et al., 2007). Vor dem Hintergrund, kann man zu dem Schluss kommen, dass der SNP rs11618521 einen Einfluss auf die Expression von KPNA3 ausübt. Der Genotyp C/C scheint einen aktivierenden Einfluss auf die Expression von KPNA3 zu haben, da diese Patienten früher erkranken, was für einen verstärkten Transport in den Zellkern durch KPNA3 spricht. Die Abweichung vom Erkrankungsalter hin zu einem späteren Zeitpunkt bei einem homozygoten Genotyp für Thymin lässt in Bezugnahme auf die von Sowa et al. (2018) erwähnte Rolle von KPNA3 vermuten, dass dieser Genotyp die Expression des beschriebenen Transportproteins hemmt.

Die Rolle von KPNA3 als modifizierender Faktor der SCA3, sowie dessen vielversprechendes Potenzial als therapeutischer Ansatzpunkt, wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit weiter untermauert. In der vorliegenden Arbeit wurde dessen Rolle für die SCA3 nun auch erstmals am Menschen bestätigt. Werden SCA3-Patienten nun für den Genotyp des Polymorphismus rs11618521 im *KPNA3*-Gen getestet, so ist anhand der hier modifizierten Formel zur Ermittlung des prädiktiven Erkrankungsalters im Vergleich zu den bisher bekannten Daten eine genauere Vorhersage des Erkrankungsalters möglich.

## 5. Zusammenfassung

Die Spinozerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3) ist eine autosomal dominant vererbte, neurodegenerative Erkrankung, die zur Gruppe der Polyglutaminerkrankungen gehört. Ursächlich für die Erkrankung ist eine CAG-Repeatexpansion im *ATXN3*-Gen, welche im Genprodukt, dem Protein Ataxin3, zu einer verlängerten Glutaminregion führt. Bei an SCA3 erkrankten Patienten kommt es aufgrund der Polyglutaminregion zu einer Fehlfaltung von Ataxin3. Zwar zeigt sich eine negative Korrelation zwischen der Anzahl der CAG-Repeats und dem Erkrankungsalter, dennoch gibt es bei gleicher CAG-Repeatanzahl individuell starke Abweichungen vom statistisch prognostizierten Erkrankungsalter. In Tierversuchen wurde bewiesen, dass ein Faktor, der das Erkrankungsalter darüber hinaus beeinflusst, die Lokalisation des fehlgefalteten Ataxin3's im Nucleus ist. Auch bei Menschen kommt Ataxin3 im Gesunden vor allem im Zytoplasma vor. Erst bei Erkrankten lassen sich Ataxin3 enthaltende intranukleäre Einschlusskörper feststellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Polymorphismen in Genen von am Kerntransport beteiligten Proteinen einen Einfluss auf das Erkrankungsalter von SCA3-Patienten haben. Es wurde angenommen, dass eine Über- oder Unterexpression dieser Proteine eine Veränderung der Konzentration von Ataxin3 im Nucleus bewirken würde. Daher wurden insgesamt acht Einzelnukleotidpolymorphismen analysiert, die in kodierenden oder regulatorischen Regionen dieser Transportproteine lokalisiert sind. Die Genotypisierung der SCA3-Patienten erfolgte mittels High-Resolution Melting, der Einfluss der Genotypen auf das Erkrankungsalter wurde durch eine Regressionsanalyse ermittelt.

KPNA3 ist ein Protein, welches innerhalb der letzten Jahre zunehmend in den Fokus der Forschung zur Pathogenese der SCA3 gerückt ist. In dieser Arbeit konnte erstmals ein statistisch signifikanter Einfluss eines Polymorphismus im Gen von KPNA3 auf den Krankheitsverlauf der SCA3 beim Menschen gezeigt werden. Die Analyse ergab, dass sich das Erkrankungsalter von SCA3-Patienten in Abhängigkeit vom Genotyp dieses Polymorphismus um mehr als 4 Jahre unterscheidet. Unter Berücksichtigung des Einflusses dieses Polymorphismus wurde eine neue Formel bestimmt, die es nun möglich macht, das Erkrankungsalter von SCA3-Patienten genauer vorherzusagen.

## 6. Literaturverzeichnis

- Alshareeda, A. T., Negm, O. H., Green, A. R., Nolan, C. C., Tighe, P., Albarakati, N., Rakha, E. A. (2015). KPNA2 is a nuclear export protein that contributes to aberrant localisation of key proteins and poor prognosis of breast cancer. *Br J Cancer*, 112(12), 1929–1937.
- Anglani, F., Picci, L., Camporese, C., & Zacchello, F. (1990). Heteroduplex formation in polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet*, 47(1), 169–170.
- Antony, P. M. A., Mäntele, S., Mollenkopf, P., Boy, J., Kehlenbach, R. H., Riess, O., Schmidt, T. (2009). Identification and functional dissection of localization signals within ataxin-3. *Neurobiol Dis*, 36(2), 280–292.
- Arai, T., Hasegawa, M., Akiyama, H., Ikeda, K., Nonaka, T., Mori, H., Mann, D., Tsuchiya, K., Yoshida, M., Hashizume, Y., Oda, T. (2006). TDP-43 is a component of ubiquitin-positive tau-negative inclusions in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun.*, 351(3), 602-611.
- Araujo, J., Breuer, P., Dieringer, S., Krauss, S., Dorn, S., Zimmermann, K., Pfeifer, A., Klockgether, T., Wuellner, U., Evert, B. (2011). FOXO4-dependent upregulation of superoxide dismutase-2 in response to oxidative stress is impaired in spinocerebellar ataxia type 3. *Hum Mol Genet*, 20(15), 2928–41.
- Arrasate, M., Mitra, S., Schweitzer, E., Segal, M., & Finkbeiner, S. (2004). Inclusion body formation reduces levels of mutant Huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature* 431(7010), 805-810.
- Aust, D. E., Muders, M., Köhler, A., Schmidt, M., Diebold, J., Müller, C., Löhrs, U., Waldman, F.M., Baretton, G. B. (2004). Prognostic relevance of 20q13 gains in sporadic colorectal cancers: a FISH analysis. *Scand J Gastroenterol*, 39(8), 766–772.
- Badner, J. A., & Gershon, E. S. (2002). Meta-analysis of whole-genome linkage scans of bipolar disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry*, 7, 405-411.
- Bar-Shira, A., Pinthus, J. H., Rozovsky, U., Goldstein, M., Sellers, W. R., Yaron, Y., Eshhar, Z., Orr-Urtreger, A. (2002). Multiple Genes in Human 20q13 Chromosomal Region Are Involved in an Advanced Prostate Cancer Xenograft. *Cancer Res*, 62(23), 6803-6807
- Barraud, P., Banerjee, S., Mohamed, W. I., Jantsch, M. F., & Allain, F. H.-T. (2014). A bimodular nuclear localization signal assembled via an extended double-stranded RNA-binding domain acts as an RNA-sensing signal for transportin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(18), 1852–1861.
- Bauer, P. O., & Nukina, N. (2009). The pathogenic mechanisms of polyglutamine diseases and current therapeutic strategies. *J Neurochem*, 110(6), 1737–1765.
- Bergmann, M., Kuchelmeister, K., Schmid, K., Kretschmar, H., Schröder R. (1996). Different variants of frontotemporal dementia: a neuropathological and immunohistochemical study. *Acta Neuropathol*, 92(2), 170-179.
- Bettencourt, C., Raposo, M., Kazachkova, N., Cymbron, T., Santos, C., Kay, T., Vasconcelos, J., Maciel, P., Donis, K., Saraiva-Pereira, M., Jardim, L., Sequeiros, J., Lima, M. (2011). The APOE ε2 allele increases the risk of earlier age at onset in Machado-Joseph disease. *Arch Neurol*, 68(12), 1580-1583.

- Bettencourt, C., Santos, C., Kay, T., Vasconcelos, J., & Lima, M. (2008). Analysis of segregation patterns in Machado-Joseph disease pedigrees. *J Hum Genet*, *53*(10), 920–923.
- Bichelmeier, U., Schmidt, T., Hubener, J., Boy, J., Ruttiger, L., Häbig, K., Poths, S., Bonin, M., Knipper, M., Schmidt, W., Wilbertz, J., Wolburg, H., Laccone, F., Riess, O. (2007). Nuclear Localization of Ataxin-3 Is Required for the Manifestation of Symptoms in SCA3: In Vivo Evidence. *J Neurosci*, *27*(28), 7418–7428.
- Birch, D., Kolmodin, L., Wong, J, Zangenberg, G. A. , Zoccoli, M. A. , McKinney, N., & K. Y. Young. (1996). The use of a thermally activated DNA polymerase PCR gives improved specificity, sensitivity and product yield without additives or extra process steps. *Nature*, *381*, 445–446.
- Bischoff, F. R., Krebber, H., Smirnova, E., Dong, W., & Ponstingl, H. (1995). Co-activation of RanGTPase and inhibition of GTP dissociation by Ran-GTP binding protein RanBP1. *EMBO J*, *14*(4), 705–715.
- Bischoff, F.R., Görlich, D. (1997) RanBP1 is crucial for the release of RanGTP from importin beta-related nuclear transport factors. *FEBS Lett*, *419*(2-3), 249-54.
- Blank, M., Stefanescu, R., Masuda, E., Marti, F., King, P., Redecha, P., Wurzbürger, R., Peterson, M., Tanaka, S., Pricop, L. (2005). Decreased transcription of the human FCGR2B gene mediated by the -343 G/C promoter polymorphism and association with systemic lupus erythematosus. *Hum Genet*, *117*(2-3), 220-227.
- Brinkmann, U., Brinkmann, E., Bera, T. K., Wellmann, A., & Pastan, I. (1999). Tissue-specific alternative splicing of the CSE1L/CAS (cellular apoptosis susceptibility) gene. *Genomics*, *58*, 41–49.
- Brinkmann, U., Brinkmann, E., Gallo, M., & Pastan, I. (1995). Cloning and characterization of a cellular apoptosis susceptibility gene, the human homologue to the yeast chromosome segregation gene CSE1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *92*(22), 10427–10431.
- Brustmann, H. (2004). Expression of cellular apoptosis susceptibility protein in serous ovarian carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study. *Gynecol Oncol*, *92*(1), 268–276.
- Camp, N. J., Neuhausen, S. L., Tiobech, J., Polloi, A., Coon, H., & Myles-Worsley, M. (2001). Genomewide Multipoint Linkage Analysis of Seven Extended Palauan Pedigrees with Schizophrenia, by a Markov-Chain Monte Carlo Method. *Am J Hum Genet*, *69*(6), 1278–1289.
- Cancel, G., Dürr, A., Didierjean, O., Imbert, G., Bürk, K., Lezin, A., Belal, S., Benomar, A., Abada-Bendib, M., Vial, C., Guimarães, J., Chneiweiss, H., Stevanin, G., Yvert, G., Abbas, N., Saudou, F., Lebre, A., Yahyaoui, M., Hentati, F., Vernant, J., Klockgether, T., Mandel, J., Agid, Y., Brice, A. (1997). Molecular and Clinical Correlations in Spinocerebellar Ataxia 2: A Study of 32 Families. *Hum Mol Genet*, *6*(5), 709–715.
- Carvalho, D., La Rocque-Ferreira, A., Rizzo, I., Imamura, E., & Speck-Martins, C. (2008). Homozygosity Enhances Severity in Spinocerebellar Ataxia Type 3. *Pediatr Neurol*, *38*(4), 296–299.
- Chook, Y., & Blobel, G. (2001). Karyopherins and nuclear import. *Curr Opin Struct Biol*, *11*(6), 703–715.

- Christiansen, A., & Dyrskjøt, L. (2013). The functional role of the novel biomarker karyopherin a 2 ( KPNA2 ) in cancer. *Cancer Lett.* , 331(1), 18–23.
- Chuang, L.-Y., Cheng, Y.-H., & Yang, C.-H. (2013). Specific primer design for the polymerase chain reaction. *Biotechnol Lett.*, 35(10), 1541–1549.
- Collins, F., Brooks, L., Chakravarti, A. A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Res*, 8(12), 1229-1231.
- Cooper, J. K., Schilling, G., Peters, M. F., Herring, W. J., Sharp, A. H., Kaminsky, Z., Masone, J., Khan, F., Delanoy, M., Borchelt, D., Dawson, V., Dawson, T., Ross, C. A. (1998). Truncated N-Terminal Fragments of Huntingtin with Expanded Glutamine Repeats form Nuclear and Cytoplasmic Aggregates in Cell Culture. *Hum Mol Genet*, 7(5), 783–790.
- Cronshaw, J. M., Krutchinsky, A. N., Zhang, W., Chait, B. T., & Matunis, M. J. (2002). Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J Cell Biol*, 158(5), 915–927.
- D'Abreu, A., França, M. C., Paulson, H. L., & Lopes-Cendes, I. (2009). Caring for Machado-Joseph disease: current understanding and how to help patients. *Parkinsonism Relat Disord*, 16(1), 2-7.
- De Castilhos, R. M., Furtado, G. V., Gheno, T. C., Schaeffer, P., Russo, A., Barsottini, O., Pedroso, J., Salarini, D., Vargas, F., de Lima, M., Godeiro, C., Santana-da-Silva, L., Toralles, M., Santos, S., van der Linden, H., Wanderley, H., de Medeiros, P., Pereira, E., Ribeiro, E., Saraiva-Pereira, M., Jardim, L. (2014). Spinocerebellar ataxias in Brazil - Frequencies and modulating effects of related genes. *Cerebellum*, 13(1), 17–28.
- Dean, K. A., von Ahsen, O., Görlich, D., & Fried, H. M. (2001). Signal recognition particle protein 19 is imported into the nucleus by importin 8 (RanBP8) and transportin. *J Cell Sci*, 114(19), 3479-3485.
- DeSilva, D., & Blackett, J. (2007). Assay: High-resolution melting & unlabeled probes. *Genetic Engineering and Biotechnology News*, 27(3), 2007–2008.
- DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K. O., Davies, S. W., Bates, G. P., Vonsattel, J. P., & Aronin, N. (1997). Aggregation of Huntingtin in Neuronal Intranuclear Inclusions and Dystrophic Neurites in Brain. *Science*, 277(5334), 1990-1993.
- Dwight, Z., Palais, R., Wittwer, C. (2011). uMELT: prediction of high-resolution melting curves and dynamic melting profiles of PCR products in a rich web application. *Bioinformatics*, 27(7), 1019–1020.
- Erali, M. & Wittwer, C. T. (2010). High resolution melting analysis for gene scanning. *Methods*, 50(4), 250–261.
- Erali, M., Palais, R., Wittwer, C. (2008). SNP genotyping by unlabeled probe melting analysis. *Methods Mol Biol*, 429, 199-206.
- Evert, B., Vogt, I., Kindermann, C., Ozimek, L., de Vos, R., Brunt, E., Schmitt, I., Klockgether, T., Wüllner, U. (2001) Inflammatory genes are upregulated in expanded ataxin-3-expressing cell lines and spinocerebellar ataxia type 3 brains. *J Neurosci*, 21(15), 5389–5396.
- Evert, B., Vogt, I., Vieira-Saecker, A., Ozimek, L., de Vos, R., Brunt, E., Klockgether, T., Wüllner, U. (2003). Gene expression profiling in ataxin-3 expressing cell lines

- reveals distinct effects of normal and mutant ataxin-3. *J Neuropathol Exp Neurol*, 62(10):1006-18.
- Evrard, A., Raynal, C., Boyer, J., Gallic, L. L., Lumbroso, S. (2008). Identifizierung neuer Mutationen durch hochauflösende Schmelzkurvenanalyse, *Biospectrum*, 14, 171–173.
- Fearnley, J., Lees, A. (1991). Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain*, 114(5), 2283–2301.
- Fowler, H. (1984). Machado-Joseph-Azorean Disease: A Ten-Year Study. *Arch Neurol*, 41(9), 921–925.
- Fritz, J., Strehblow, A., Taschner, A., Schopoff, S., Pasierbek, P., & Jantsch, M. F. (2009). RNA-Regulated Interaction of Transportin-1 and Exportin-5 with the Double-Stranded RNA-Binding Domain Regulates Nucleocytoplasmic Shuttling of ADAR1. *Mol Cell Biol*, 29(6), 1487–1497.
- Garibyan, L. & Avashia, N. (2013). Polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol*, 133(3), 1–4.
- Giunti, P., Stevanin, G., Worth, P. F., David, G., Brice, A., & Wood, N. W. (1999). Molecular and clinical study of 18 families with ADCA type II: evidence for genetic heterogeneity and de novo mutation. *Am J Hum Genet*, 64(6), 1594–1603.
- Goldfarb, D. S., Corbett, A. H., Mason, D. A., Harreman, M. T., & Adam, S. A. (2004). Importin  $\alpha$ : a multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends Cell Biol*, 14(9), 505–514.
- Görlich, D., Dabrowski, M., Bischoff, F. R., Kutay, U., Bork, P., Hartmann, E., Prehn, S., Izaurralde, E. (1997). A Novel Class of RanGTP Binding Proteins. *J Cell Biol*, 138(1), 65-80.
- Görlich, D., Kostka, S., Kraft, R., Dingwall, C., Laskey, R. A., Hartmann, E., & Prehn, S. (1995). Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope. *Curr Biol*, 5(4), 383–392.
- Görlich, D., Vogel, F., Mills, A. D., Hartmann, E., & Laskey, R. A. (1995). Distinct functions for the two importin subunits in nuclear protein import. *Nature*, 377, 246–248.
- Gundry, C., Vandersteen, J., Reed, G., Pryor, R., Chen, J., Wittwer, C. (2003). Amplicon Melting Analysis with Labeled Primers: A Closed-Tube Method for Differentiating Homozygotes and Heterozygotes. *Clin Chem*, 49(3), 396-406.
- Gwinn-Hardy, K., Singleton, A., Suilleabhain, P., Boss, M., Nicholl, D., Adam, A., Hussey, J., Critchley, P., Hardy, J., Farrer, M. (2001). Spinocerebellar Ataxia Type 3 Phenotypically Resembling Parkinson Disease in a Black Family, *Arch Neurol*, 58(2), 296-299.
- Gyllenstein, U., Allen, M. (1993). Sequencing of in vitro amplified DNA. *Methods Enzymol*, 218, 3-16.
- Gyllenstein, U., Erlich, H., (1988). Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(20), 7652-7656.

- Haacke, A., Broadley, S. A., Boteva, R., Tzvetkov, N., Hartl, F. U., & Breuer, P. (2006). Proteolytic cleavage of polyglutamine-expanded ataxin-3 is critical for aggregation and sequestration of non-expanded ataxin-3. *Hum Mol Genet*, *15*(4), 555–568.
- Hackam, A. S., Singaraja, R., Wellington, C. L., Metzler, M., McCutcheon, K., Zhang, T., Kalchman, M., Hayden, M. R. (1998). The influence of huntingtin protein size on nuclear localization and cellular toxicity. *J Cell Biol*, *141*(5), 1097–1105.
- Harding, A. E. (1982). The Clinical Features and Classification of the Late Onset Autosomal Dominant Cerebellar Ataxias. *Brain*, *105*(1), 1–28.
- Hardy, G.H., (1908). Mendelian proportions in a mixed population. *Science*, *28*(706): 49-50.
- Heinz, S., Romanoski, C., Benner, C., Allison, K., Kaikkonen, M., Orozco, L., Glass, C. (2013). Effect of natural genetic variation on enhancer selection and function. *Nature*, *503*(7477), 487-492.
- Hieda, M., Tachibana, T., Yokoya, F., Kose, S., Imamoto, N., Yoneda, Y. 1999. A monoclonal antibody to the COOH-terminal acidic portion of ran inhibits both the recycling of ran and nuclear protein import in living cells. *J. Cell Biol.* *144*:645–55
- Hindorf, L., Sethupathy, P., Junkins, H., Ramos, E., Mehta, J., Collins, F., Manolio, T. (2009). Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(23), 9362–9367.
- Hosking, L., Lumsden, S., Lewis, K., Yeo, A., McCarthy, L., Bansal, A., Riley, J., Purvis, I., Xu, CF. (2004). Detection of genotyping errors by Hardy-Weinberg equilibrium testing. *Eur J Hum Genet*, *12*(5), 395-399.
- Huynh, D. P., Figueroa, K., Hoang, N., & Pulst, S. M. (2000). Nuclear localization or inclusion body formation of ataxin-2 are not necessary for SCA2 pathogenesis in mouse or human. *Nat Genet*, *26*(1), 44–50.
- Ikeda, Y., Dick, K.A., Weatherspoon, M.R., Gincel, D. Armbrust, K.R., Dalton, J.C., Stevanin, G., Dürr, A., Zühlke, C., Bürk, K., Clark, H.B., Brice, A., Rothstein, J.D., Schut, L.J., Day, J.W., Ranum, L.P. (2006). Spectrin mutations cause spinocerebellar ataxia type 5. *Nat Genet*, *38*(2), 184–190.
- Ikeda, H., Yamaguchi, M., Sugai, S., Aze, Y., Narumiya, S., & Kakizuka, A. (1996). Expanded polyglutamine in the Machado-Joseph disease protein induces cell death in vitro and in vivo. *Nat Genet*, *13*(2), 196–202.
- Iseki, E., Li, F., Odawara, T., Hino, H., Suzuki, K., Kosaka, K., Akiyama, H., Ikeda, K., Kato, M. (1998). Ubiquitin-immunohistochemical investigation of atypical Pick's disease without Pick bodies. *J Neurol Sci*, *159*(2), 194-201.
- Ishikawa, K., Fujigasaki, H., Saegusa, H., Ohwada, K., Fujita, T., Iwamoto, H. Komatsuzaki, Y., Toru, S., Toriyama, H., Watanabe, M., Ohkoshi, N., Shoji, S., Kanazawa, I., Tanabe, T., Hidehiro, M. (1999). Abundant Expression and Cytoplasmic Aggregations of  $\alpha$ 1A Voltage-Dependent Calcium Channel Protein Associated with Neurodegeneration in Spinocerebellar Ataxia Type 6. *Hum Mol Genet*, *8*(7), 1185–1193.
- Ishikawa, K., Tanaka, H., Saito, M., Ohkoshi, N., Fujita, T., Yoshizawa, K., Ikeuchi, T., Watanabe, M., Hayashi, A., Takiyama, Y., Nishizawa, M., Nakano, I., Matsubayashi, K., Miwa, M., Shoji, S., Kanazawa, I., Tsuji, S., Mizusawa, H. (1997).



- Japanese families with autosomal dominant pure cerebellar ataxia map to chromosome 19p13.1-p13.2 and are strongly associated with mild CAG expansions in the spinocerebellar ataxia type 6 gene in chromosome 19p13.1. *Am J Hum Genet*, 61(2), 336–346.
- Jackson, W. S., Tallaksen-Greene, S. J., Albin, R. L., Detloff, P. J. (2003). Nucleocytoplasmic transport signals affect the age at onset of abnormalities in knock-in mice expressing polyglutamine within an ectopic protein context. *Hum Mol Genet*, 12(13), 1621–1629.
- Jäkel, S., Albig, W., Kutay, U., Bischoff, F. R., Schwamborn, K., Doenecke, D., & Görlich, D. (1999). The importin  $\beta$ /importin 7 heterodimer is a functional nuclear import receptor for histone H1. *EMBO J*, 18(9), 2411–2423.
- Jäkel, S., & Görlich, D. (1998). Importin  $\beta$ , transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells. *EMBO J*, 17(15), 4491–4502.
- Jäkel, S., Mingot, J., Schwarzmaier, P., Hartmann, E., & Görlich, D. (2002). Importins fulfil a dual function as nuclear import receptors and cytoplasmic chaperones for exposed basic domains. *EMBO J*, 21(3), 377–386.
- Jardim, L. B., Pereira, M. L., Silveira, I., Ferro, A., Sequeiros, J., & Giugliani, R. (2001). Neurologic Findings in Machado-Joseph Disease. *Arch Neurol*, 58(6), 899.
- Jiang, M.-C., Lin, T.-L., Lee, T.-L., Huang, H.-T., Lin, C.-L., & Liao, C.-F. (2001). IRF-1-Mediated CAS Expression Enhances Interferon- $\gamma$ -Induced Apoptosis of HT-29 Colon Adenocarcinoma Cells. *Mol Cell Biol Res Commun*, 4(6), 353–358.
- Karki, R., Pandya, D., Elston, R. C., & Ferlini, C. (2015). Defining "mutation" and "polymorphism" in the era of personal genomics. *BMC Med Genomics*, 8(1), 37.
- Kawaguchi, Y., Okamoto, T., Taniwaki, M., Aizawa, M., Inoue, M., Katayama, S., Kawakami, H., Nakamura, S., Nishimura, M., Akiguchi, I. (1994). CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet*, 8(3), 221–228.
- Kent, W. J., Sugnet, C. W., Furey, T. S., Roskin, K. M., Pringle, T. H., Zahler, A. M., & Haussler, D. (2002). The human genome browser at UCSC. *Genome Res*, 12(6), 996–1006.
- Kieling, C., Prestes, P. R., Saraiva-Pereira, M. L., & Jardim, L. B. (2007). Survival estimates for patients with Machado-Joseph disease (SCA3). *Clin Genet*, 72(6), 543–545.
- Kim, J., Lee, K., Jeon, Y., Oh, J., Jeong, S., Song, I., Kim, J., Lee, D., Kim, N. (2006). Identification of Genes Related to Parkinson's Disease Using Expressed Sequence Tags. *DNA Res*, 13(6), 275–286.
- Klement, I., Skinner, P., Kaytor, M., Yi, H., Hersch, S., Clark, H., Zoghbi, H., Orr, H. T. (1998). Ataxin-1 Nuclear Localization and Aggregation. *Cell*, 95(1), 41–53.
- Kodiha, M., Chu, A., Matusiewicz, N., Stochaj, U. (2004) Multiple mechanisms promote the inhibition of classical nuclear import upon exposure to severe oxidative stress. *Cell Death Differ*, 11(8), 862–874.
- Kodiha, M., Tran, D., Qian, C., Morogan, A., Presley, J. F., Brown, C. M., & Stochaj, U. (2008). Oxidative stress mislocalizes and retains transport factor importin- $\alpha$  and

- nucleoporins Nup153 and Nup88 in nuclei where they generate high molecular mass complexes. *Biochim Biophys Acta*, 1783(3), 405-418.
- Koide, R., Ikeuchi, T., Onodera, O., Tanaka, H., Igarashi, S., Endo, K., Takahashi, H., Kondo, R., Ishikawa, A., Hayashi, T., Tsuji, S. (1994). Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral–pallidoluysian atrophy (DRPLA). *Nat Genet*, 6(1), 9–13.
- Koide, R., Kobayashi, S., Shimohata, T., Ikeuchi, T., Maruyama, M., Saito, M., Yamada, M., Takahashi, H., Tsuji, S. (1999). A Neurological Disease Caused By an Expanded CAG Trinucleotide Repeat in The TATA-Binding Protein Gene: A New Polyglutamine Disease? *Hum Mol Genet*, 8(11), 2047–2053.
- Kordasiewicz, H. B., Thompson, R. M., Clark, H. B., & Gomez, C. M. (2006). C-termini of P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channel  $\alpha$ 1A subunits translocate to nuclei and promote polyglutamine-mediated toxicity. *Hum Mol Genet*, 15(10), 1587–1599.
- Kutay, U., Bischoff, F.R., Kostka, S., Kraft, R., & Görlich, D. (1997). Export of Importin  $\alpha$  from the Nucleus Is Mediated by a Specific Nuclear Transport Factor. *Cell*, 90(6), 1061–1071.
- Kwok, P., Chen, X. (2003). Detection of Single Nucleotide Polymorphisms. *Curr Issues Mol Biol.*, 5(2), 43-60.
- La Spada, A. R., & Taylor, J.P. (2003). Polyglutamines placed into context. *Neuron*, 38(5), 681–684.
- Li, X., Liu, H., Fischhaber, P.L., & Tang, T.-S. (2015). Toward therapeutic targets for SCA3: Insight into the role of Machado-Joseph disease protein ataxin-3 in misfolded proteins clearance. *Prog Neurobiol*, 132, 34–58.
- Liew, M., Pryor, R., Palais, R., Meadows, C., Erali, M., Lyon, E., Wittwer, C. (2004). Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms by High-Resolution Melting of Small Amplicons. *Clin Chem*, 50(7), 1156-1164.
- Lima, M., Mayer, F., Coutinho, P., Abade, A. (1998). Origins of a mutation: population genetics of Machado-Joseph disease in the Azores (Portugal). *Human Biology*, 70(6), 1011–1023.
- Lindblad, K., Savontaus, M.-L., Stevanin, G., Holmberg, M., Digre, K., Zander, C., Ehrsson, H., David, G., Benomar, A., Nikoskelainen, E., Trottier, Y., Holmgren, G., Ptacek, L., Anttinen, A., Brice, A., Schalling, M. (1996). An expanded CAG repeat sequence in spinocerebellar ataxia type 7. *Genome Res*, 6(10), 965–971.
- Macedo-Ribeiro, S., Cortes, L., Maciel, P., Carvalho, A. L. (2009). Nucleocytoplasmic shuttling activity of ataxin-3. *PLoS ONE*, 4(6).
- Maciel, P., Costa, M., Ferro, A., Rousseau, M., Santos, C., Gaspar, C., Barros, J., Rouleau, G., Coutinho, P., Sequeiros, J. (2001). Improvement in the molecular diagnosis of machado-joseph disease. *Arch Neurol*, 58(11), 1821–1827.
- Mahley, R. (1988). Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*, 240(4852), 622-630. *Hum Mol Genet*, 22(7), 1383-1394.
- Maiuri, T., Woloshansky, T., Xia, J., Truant, R. (2013). The huntingtin N17 domain is a multifunctional CRM1 and Ran-dependent nuclear and cilial export signal. *Hum Mol Genet*, 22(7), 1383-1394.

- Matsuura, T., Yamagata, T., Burgess, D. L., Rasmussen, A., Grewal, R. P., Watase, K., Khajavi, M., McCall, A.E., Davis, C.F., Zu, L., Achari, M., Pulst, S.M., Alonso, E., Noebels, J.L., Nelson, D.L., Zoghbi, H.Y., Ashizawa, T. (2000). Large expansion of the ATTCT pentanucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 10. *Nat Genet*, 26(2), 191–194.
- Melchior, F., Paschal, B., Evans, J., Gerace, L. (1993). Inhibition of nuclear protein import by nonhydrolyzable analogues of GTP and identification of the small GTPase Ran/TC4 as an essential transport factor. *J Cell Biol*, 123(6Pt2), 1649-1659.
- Mingot, J.-M., Vega, S., Maestro, B., Sanz, J. M., & Nieto, M. A. (2009). Characterization of Snail nuclear import pathways as representatives of C2H2 finger transcription factors. *J Cell Sci*, 122(9), 1452-1460.
- Morris, C. P., Baune, B. T., Domschke, K., Arolt, V., Swagell, C. D., Hughes, I. P., Lawford, B.R., McD Young, R., Voisey, J. (2012). KPNA3 variation is associated with schizophrenia, major depression, opiate dependence and alcohol dependence. *Dis Markers*, 33(4), 163–170.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51(1), 263-273.
- Myers, R., Airey, D., Manier, D., Shelton, R., Sanders-Bush, E. (2007). Polymorphisms in the regulatory region of the human serotonin 5-HT2A receptor gene (HTR2A) influence gene expression. *Biol Psychiatry*, 61(2), 167-173.
- Nachury, M. V., Ryder, U. W., Lamond, A. I., & Weis, K. (1998). Cloning and characterization of hSRP1, a tissue-specific nuclear transport factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(2), 582–587.
- Nachury, M. V., Weis, K. (1999). The direction of transport through the nuclear pore can be inverted. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96(17), 9622–9627.
- Neumann, M., Sampathu, D., Kwong, L., Truax, A., Micsenyi, M., Chou, T., Bruce, J., Schuck, T., Grossman, M., Clark, C., McCluskey, L., Miller, B., Masliah, E., Mackenzie, I., Feldman, H., Feiden, W., Kretzschmar, H., Trojanowski, J., Lee, V. (2006). Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, 314(5796), 130-133.
- Nickerson, D., Taylor, S., Weiss, K., Clark, A., Hutchinson, R., Stengård, J., Salomaa, V., Vartiainen, E., Boerwinkle, E., Sing, C. (1998). DNA sequence diversity in a 9.7-kb region of the human lipoprotein lipase gene. *Nat Genet*, 19(3), 233–240.
- Nishimura, A., Župunski, V., Troakes, C., Kathe, C., Fratta, P., Howell, M., Gallo, J., Hortobágyi, T., Shaw, C., Rogelj, B. (2010). Nuclear import impairment causes cytoplasmic trans-activation response DNA-binding protein accumulation and is associated with frontotemporal lobar degeneration, *Brain*, 133, (6), 1763–1771.
- Orr, H., Ming-yi, C., Banfi, S., Kwiatkowski, T., Servadio, A., Beaudet, A., McCall, A., Duvick, L., Ranum, L., Zoghbi, H. (1993). Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in Spinocerebellar ataxia type 1. *Nat Genet*, 4(3), 221–226.
- Paulson H. (2012). Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3. *Handb Clin Neurol*, 103, 437-49.
- Paulson, H. L., Das, S. S., Crino, P. B., Perez, M. K., Patel, S. C., Gotsdiner, D.,

- Fischbeck, K., Pittman, R. N. (1997). Machado-Joseph disease gene product is a cytoplasmic protein widely expressed in brain. *Ann Neurol*, 41(4), 453–462.
- Paulson, H. L., Perez, M. K., Trotter, Y., Trojanowski, J. Q., Subramony, S. H., Das, S. S., Mandel, J., Fischbeck, K., Pittman, R. N. (1997). Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinocerebellar ataxia type 3. *Neuron*, 19(2), 333–344.
- Poulson, M. & Wittwer, C. (2007). Closed-tube genotyping of apolipoprotein E by isolated-probe PCR with multiple unlabeled probes and high-resolution DNA melting analysis. *Biotechniques*, 43(1), 87-91.
- Pearson, K., (1900). On the criterion that a given system of deviations from the probable in the case of a correlated system of variables is such that it can be reasonably supposed to have arisen from random sampling. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 50(302), 157-175.
- Peiró, G., Diebold, J., Baretton, G. B., Kimmig, R., & Löhrs, U. (2001). Cellular apoptosis susceptibility gene expression in endometrial carcinoma: correlation with Bcl-2, Bax, and caspase-3 expression and outcome. *Int J Gynecol Pathol.*, 20(4), 359–367.
- Pichler, M., Balic, M., Stadelmeyer, E., Ausch, C., Wild, M., Guelly, C., Bauernhofer, T., Samonigg, H., Hoefler, G., Dandachi, N. (2009). Evaluation of high-resolution melting analysis as a diagnostic tool to detect the BRAF V600E mutation in colorectal tumors. *J Mol Diagn*, 11(2), 140–147.
- Pimiento, J. M., Neill, K. G., Henderson-Jackson, E., Eschrich, S. A., Chen, D.-T., Husain, K., Shibata, D., Coppola, D., Malafa, M. P. (2016). Knockdown of CSE1L Gene in Colorectal Cancer Reduces Tumorigenesis in Vitro. *Am J Pathol*, 186(10), 2761–2768.
- Popken, P., Ghavami, A., Onck, P. R., Poolman, B., Veenhoff, L. M. (2015). Size-dependent leak of soluble and membrane proteins through the yeast nuclear pore complex. *Mol Biol Cell*, 26(7), 1386–1394.
- Pulst, Stefan-M.; Nechiporuk, Alex; Nechiporuk, Tamilla; Gispert, Suzana; Chen, Xiao-Ning; Lopes-Cendes, Iscia; Pearlman, Susan; Starkman, Sidney; Orozco-Diaz, Guillermo; Lunkes, Astrid; DeJong, Pieter; Rouleau, Guy A.; Auburger, Georg; Korenberg, Julie R, S. (1996). Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. *Nat Genet*, 14(3), 353–356.
- Radu, A., Blobel, G., & Moore, M. S. (1995). Identification of a protein complex that is required for nuclear protein import and mediates docking of import substrate to distinct nucleoporins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(5), 1769–1773.
- Reed, G., Wittwer, C. (2004). Sensitivity and Specificity of Single-Nucleotide Polymorphism Scanning by High-Resolution Melting Analysis. *Clin Chem*, 50(10), 1748-1754.
- Riess, O., Schmidt, T., & Schöls, L. (2001). Autosomal dominant vererbte spinocerebellare Ataxien. *Deutsches Ärzteblatt*, 98, A1546–A1558.
- Roche Diagnostics GmbH. (2008). High Resolution Melting : Optimization Strategies High. *Roche Applied Science*, (1).
- Rosenberg, R. N. (1992). Machado-Joseph disease: An autosomal dominant motor

- system degeneration. *Mov Disord*, 7(3), 193–203.
- Rosenberg, R. N., Nyhan, W. L., Bay, C., & Shore, P. (1976). Autosomal dominant striatonigral degeneration. *Neurology*, 26(8), 703–714.
- Ruijter, J., Ramakers, C., Hoogaars, W., Karlen, Y., Bakker, O., van den Hoff, M., & Moorman, A. (2009). Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res*, 37(6), e45.
- Sando, S., Melquist, S., Cannon, A., Hutton, M., Sletvold, O., Saltvedt, I., White, L.R., Lydersen, S., Aasly, J. O. (2008). APOE epsilon 4 lowers age at onset and is a high risk factor for Alzheimer's disease; a case control study from central Norway. *BMC neurol*, 8, 9.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12), 5463–5467.
- Saudou, F., Finkbeiner, S., Devys, D., & Greenberg, M. E. (1998). Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell*, 95(1), 55–56.
- Saute, J., & Jardim, L. (2015). Machado Joseph disease: clinical and genetic aspects, and current treatment. *Expert Opinion on Orphan Drugs*, 3(5), 517–535.
- Scherf, U., Pastan, I., Willingham, M. C., & Brinkmann, U. (1996). The human CAS protein which is homologous to the CSE1 yeast chromosome segregation gene product is associated with microtubules and mitotic spindle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(7), 2670–2674.
- Schmidt, T., Landwehrmeyer, G. B., Schmitt, I., Trottier, Y., Auburger, G., Laccone, F., Klockgether, T., Völpel, M., Epplen, J., Schöls, L., Riess, O. (1998). An isoform of ataxin-3 accumulates in the nucleus of neuronal cells in affected brain regions of SCA3 patients. *Brain Pathol*, 8(4), 669–679.
- Schmidt, T., Lindenberg, K. S., Krebs, A., Schöls, L., Laccone, F., Herms, J., Rechsteiner, M., Riess, O., Landwehrmeyer, B. (2002). Protein surveillance machinery in brains with spinocerebellar ataxia type 3: Redistribution and differential recruitment of 26S proteasome subunits and chaperones to neuronal intranuclear inclusions. *Ann Neurol*, 51(3), 302–310.
- Schon, E. A., & Manfredi, G. (2003). Neuronal degeneration and mitochondrial dysfunction. *J Clin Invest*, 111(3), 303–312.
- Servadio, A., Koshy, B., Armstrong, D., Antalffy, B., Orr, H. T., & Zoghbi, H. Y. (1995). Expression analysis of the ataxin-1 protein in tissues from normal and spinocerebellar ataxia type 1 individuals. *Nat Genet*, 10(1), 94–98.
- Shastry, B. (2009). SNPs: impact on gene function and phenotype. *Methods Mol Biol*, 578, 3–22.
- Sherry, S. T., Ward, M. H., Kholodov, M., Baker, J., Phan, L., Smigielski, E. M., & Sirotkin, K. (2001). dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res*, 29(1), 308–311.
- Smith, B.L., Lu, C.P., Alvarado Bremer, J. R. (2010). High-resolution melting analysis (HRMA): A highly sensitive inexpensive genotyping alternative for population studies. *Mol Ecol Resour*, 10(1), 193–196.

- Sowa, A. S., Martin, E., Martins, I. M., Schmidt, J., Depping, R., Weber, J. J., Rother, F., Hartmann, E., Bader, M., Riess, O., Tricoire, H., Schmidt, T. (2018). Karyopherin  $\alpha$ -3 is a key protein in the pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 3 controlling the nuclear localization of ataxin-3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(11), 2624–2633.
- Spada, A. R. La, Wilson, E. M., Lubahn, D. B., Harding, A. E., & Fischbeck, K. H. (1991). Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature*, 352(6330), 77–79.
- Spence, A., Bent, P., & Hospital, B. (1972). Machado disease - A hereditary ataxia in Portuguese emigrants to Massachusetts. *Neurology*, 22(1), 49–55.
- Stewart, M. (2007). Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(3), 195-208.
- Subramony, S., Hernandez, D., Adam, A., Smith-Jefferson, S., Hussey, J., Gwinn-Hardy, K., Farrer, M., Singleton, A. (2002). Ethnic differences in the expression of neurodegenerative disease: Machado-Joseph disease in Africans and Caucasians. *Mov Disord*, 17(5), 1068–1071.
- Sun, C., Fu, G., Ciziene, D., Stewart, M., & Musser, S. M. (2013). Choreography of importin- $\alpha$ /CAS complex assembly and disassembly at nuclear pores. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(17), E1584–E1593.
- Sun, Y. M., Lu, C., & Wu, Z. Y. (2016). Spinocerebellar ataxia: relationship between phenotype and genotype – a review. *Clin Genet*, 90(4), 305–314.
- Tai, C.-J., Shen, S.-C., Lee, W.-R., Liao, C.-F., Deng, W.-P., Chiou, H.-Y., Hsieh, C.I., Tung, J.N., Chen, C.S., Chiou, J.F., Li, L.T., Lin, C.Y., Hsu, C.H., Jiang, M.-C. (2010). Increased cellular apoptosis susceptibility (CSE1L/CAS) protein expression promotes protrusion extension and enhances migration of MCF-7 breast cancer cells. *Exp Cell Res*, 316(17), 2969–2981.
- Takeda, S., Fujiwara, T., Shimizu, F., Kawai, A., Shinomiya, K., Okuno, S., Ozaki, K., Katagiri, T., Shimada, Y., Nagata, M., Watanabe, T., Takaichi, A., Kuga, Y., Suzuki, M., Hishigaki, H., Takahashi, E., Shin, S., Nakamura, Y., Hirai, Y. (1997). Isolation and mapping of karyopherin  $\alpha$ 3 (KPNA3), a human gene that is highly homologous to genes encoding Xenopus importin, yeast SRP1 and human RCH1. *Cytogenet Cell Genet*, 76(1–2), 87–93.
- Talcott, B., & Moore, M. S. (2000). The nuclear import of RCC1 requires a specific nuclear localization sequence receptor, karyopherin  $\alpha$ 3/Qip. *J Biol Chem*, 275(14), 10099–10104.
- Tezenas du Montcel, S., Durr, A., Bauer, P., Figueroa, K. P., Ichikawa, Y., Brussino, A., Forlani, S., Rakowicz, M., Schöls, L., Mariotti, C., van de Warrenburg, B.P., Orsi, L., Giunti, P., Filla, A., Szymanski, S., Klockgether, T., Berciano, J., Pandolfo, M., Boesch, S., Melegh, B., Timmann, D., Mandich, P., Camuzat, A., Clinical Research Consortium for Spinocerebellar Ataxia (CRC-SCA); EUROSCA network, Goto, J., Ashizawa, T., Cazeneuve, C., Tsuji, S., Pulst, S.M., Brusco, A., Riess, O., Brice, A., Stevanin, G. (2014). Modulation of the age at onset in spinocerebellar ataxia by CAG tracts in various genes. *Brain*, 137(9), 2444–2455.
- Timney, B. L., Raveh, B., Mironska, R., Trivedi, J. M., Kim, S. J., Russel, D., Wenthe, S., Sali, A., Rout, M. P. (2016). Simple rules for passive diffusion through the nuclear pore complex. *J Cell Biol*, 215(1), 57–76.

- MacDonald, M. E., Ambrose, C. M., Duyao, M. P., Myers, R. H., Lin, C., Srinidhi, L., Barnes, G., Taylor, S., James, M., Groot, N., MacFarlane, H., Jenkins, B., Anderson, M., Wexler, N., Gusella, J., Bates, G., Baxendale, S., Hummerich, H., Kirby, S., North, M., Youngman, S., Mott, R., Zehetner, G., Sedlacek, Z., Poustka, A., Frischauf, A., Lehrach, H., Buckler, A., Church, D., Doucette-Stamm, L., O'Donovan, M., Riba-Ramirez, L., Shah, M., Stanton, V., Strobel, S., Draths, K., Wales, J., Dervan, P., Housman, D., Altherr, M., Shiang, R., Thompson, L., Fielder, T., Wasmuth, J., Tagle, D., Valdes, J., Elmer, L., Allard, M., Castilla, L., Swaroop, M., Blanchard, K., Collins, F., Snell, R., Holloway, T., Gillespie, K., Datson, N., Shaw, D., Harper, P. S. (1993). A Novel Gene Containing a Trinucleotide That Is Expanded and Unstable on Huntington's Disease Chromosomes. *Cell*, 72(6), 971–983.
- Tsou, W. L., Hosking, R. R., Burr, A. A., Sutton, J. R., Ouyang, M., Du, X., Gomez, C.M., Todi, S. V. (2015). DnaJ-1 and karyopherin  $\alpha 3$  suppress degeneration in a new Drosophila model of Spinocerebellar Ataxia Type 6. *Hum Mol Genet*, 24(15), 4385–4396.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., & Rozen, S. G. (2012). Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res*, 40(15), e115.
- Van De Warrenburg, B. P. C., Sinke, R. J., Bemelmans, C. C. V., & Scheffer, H. (2002). Spinocerebellar ataxias in the Netherlands. *Neurology*, 58(97252), 702–708.
- Van Schaik, I., Jöbssis, G., Vermeulen, M., Keizers, H., Bolhuis, P., de Visser, M. (1997). Machado-Joseph disease presenting as severe asymmetric proximal neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 63(4), 534–536.
- Volpon, L., Culjkovic-Kraljacic, B., Osborne, M. J., Ramteke, A., Sun, Q., Niesman, A., Chook, Y., Borden, K. L. (2016). Importin 8 mediates m7G cap-sensitive nuclear import of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(19), 5263–5268.
- Vossen, R., Aten, E., Roos, A., & Den Dunnen, J. T. (2009). High-resolution melting analysis (HRMA) - More than just sequence variant screening. *Hum Mutat*, 30(6), 860–866.
- Wang, R., & Brattain, M. G. (2007). The maximal size of protein to diffuse through the nuclear pore is larger than 60kDa. *FEBS letters*, 581(17), 3164–3170.
- Wei, J., & Hemmings, G. P. (2005). The KPNA3 gene may be a susceptibility candidate for schizophrenia. *Neurosci Res*, 52(4), 342–346.
- Weisgraber, K., Rall, S., Mahley, R. (1981). Human E apoprotein heterogeneity. Cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms. *J Biol Chem*, 256(17), 9077-9083.
- Wellmann, A., Krenacs, L., Fest, T., Scherf, U., Pastan, I., Raffeld, M., & Brinkmann, U. (1997). Localization of the cell proliferation and apoptosis-associated CAS protein in lymphoid neoplasms. *Am J Pathol*, 150(1), 25–30.
- Winkler, J., Roessler, S., Sticht, C., DiGuilio, A. L., Drucker, E., Holzer, K., Eiteneuer, E., Herpel, E., Breuhahn, K., Gretz, N., Schirmacher, P., Ori, A., Singer, S. (2016). Cellular apoptosis susceptibility (CAS) is linked to integrin  $\beta 1$  and required for tumor cell migration and invasion in hepatocellular carcinoma (HCC). *Oncotarget*, 7(16), 22883–22892.

- Wittwer, C.T. (2009). High-resolution DNA melting analysis: advancements and limitations. *Hum Mutat*, 30(6), 857-859.
- Wittwer, C.T., Herrmann, M., Gundry, C., Elenitoba-Johnson, K. (2001). Real-time multiplex PCR assays. *Methods*, 25(4), 430-442.
- Wu, C., Chen, D., Feng, L., Zhou, X., Zhang, J., You, H., Liang, X., Li, X. (2017). Oculomotor deficits in spinocerebellar ataxia type 3: Potential biomarkers of preclinical detection and disease progression. *CNS Neurosci Ther.*, 23(4), 321-328.
- Yamada, M., Hayashi, S., Tsuji, S., & Takahashi, H. (2001). Involvement of the cerebral cortex and autonomic ganglia in Machado-Joseph disease. *Acta Neuropathol*, 101(2), 140–144.
- Yang, W. (2002). Aggregated polyglutamine peptides delivered to nuclei are toxic to mammalian cells. *Hum Mol Genet*, 11(23), 2905–2917.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics*, 13, 134.
- Zhang, H., Ju, G., Wei, J., Hu, Y., Liu, L., Xu, Q., Chen, Y., Sun, Z., Liu, S., Yu, Y., Guo, Y., Shen, Y. (2006). A combined effect of the KPNA3 and KPNB3 genes on susceptibility to schizophrenia. *Neurosci Lett*, 402(1), 173–175.
- Zhang, J., Chen, Y., Shao, Y., Wu, Q., Guan, M., Zhang, W., Wan, J., Yu, B. (2012). Identification of TNIP1 Polymorphisms by High Resolution Melting Analysis with Unlabelled Probe: Association with Systemic Lupus Erythematosus. *Autoimmune Dis.*, 2012, 265823.
- Zhang, X., Zhou, J., Chin, M., Schepmoes, A., Petyuk, V., Weitz, K., Petritis, B., Monroe, M., Camp, D., Wood, S., Melega, W., Bigelow, D., Smith, D., Quian, W., Smith, R. (2010). Region-specific protein abundance changes in the brain of MPTP-induced Parkinson's disease mouse model. *J Proteome Res*, 9(3), 1496–1509.
- Zhou, L., Myers, A., Vandersteen, J., Wang, L., Wittwer, C. (2004). Closed-tube genotyping with unlabeled oligonucleotide probes and a saturating DNA dye. *Clin Chem*, 50(8), 1328-1335.
- Zhou, L., Wang, L., Palais, R., Pryor, R., & Wittwer, C. T. (2005). High-resolution DNA melting analysis for simultaneous mutation scanning and genotyping in solution. *Clin Chem*, 51(10), 1770–1777.
- Zhu, J. H., Hong, D. F., Song, Y. M., Sun, L. F., Wang, Z. F., & Wang, J. W. (2013). Suppression of cellular apoptosis susceptibility (CSE1L) inhibits proliferation and induces apoptosis in colorectal cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev*, 14, 1017–1021.
- Zhuchenko, O., Bailey, J., Bonnen, P., Ashizawa, T., Stockton, D. W., Amos, C., Dobyns, W., Subramony, S., Zoghbi, H., Lee, C. (1997). Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansion in the  $\alpha$ 1A-voltage-dependent calcium channel. *Nat Genet*, 15(1), 62–69.
- Zoghbi, H. Y., & Orr, H. T. (1999). Polyglutamine diseases: Protein cleavage and aggregation. *Curr Opin Neurobiol*, 9(5), 566–570.



## 6.1 Internetquellen

- Gene Cards Org*, KPNA2. Abgerufen von <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=KPNA2> [Zugriff: 08.04.2019]
- Gene Cards Org*, IPO4. Abgerufen von <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IPO4> [Zugriff: 25.04.2019]
- Gene Cards Org*, IPO8. Abgerufen von <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=IPO8> [Zugriff: 25.04.2019]
- National Center for Biotechnology Information*, rs11618521. Abgerufen von <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs11618521> [Zugriff: 09.04.2019]
- National Center for Biotechnology Information*, rs12809335. Abgerufen von <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs12809335> [Zugriff: 08.04.2019]
- National Center for Biotechnology Information*, rs2426109. Abgerufen von <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs2426109> [Zugriff: 09.04.2019]
- National Center for Biotechnology*, rs34647. Abgerufen von <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs34647> [Zugriff: 08.04.2019]
- National Center for Biotechnology Information*, rs4794016. Abgerufen von <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs4794016> [Zugriff: 08.04.2019]
- National Center for Biotechnology Information*, rs62084683. Abgerufen von <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs62084683> [Zugriff: 08.04.2019]
- National Center for Biotechnology*, rs713982. Abgerufen von <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs713982> [Zugriff: 08.04.2019]
- National Center for Biotechnology Information*, rs7146310. Abgerufen von <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs7146310> [Zugriff: 09.04.2019]
- UCSC Genome Browser*, rs11618521. Abgerufen von [https://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr13%3A4979376549794265&hgside=227582994\\_6EdgLTxHtWBSBeyAT7bMPnuygsII](https://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr13%3A4979376549794265&hgside=227582994_6EdgLTxHtWBSBeyAT7bMPnuygsII) [Zugriff: 09.04.2019]
- UCSC Genome Browser*, rs12809335. Abgerufen von [120](https://genome-</a></p></div><div data-bbox=)

euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr12%3A3069549130695991&hgsid=227582827\_jWICUa7NNmTkaA0MH4ByHLs9vINO [Zugriff: 08.04.2019]

*UCSC Genome Browser*, rs2426109. Abgerufen von [https://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr20%3A4904584049046340&hgsid=227582960\\_Sqcp7vArAQAxATEAiTDkCcSJ20G6](https://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr20%3A4904584049046340&hgsid=227582960_Sqcp7vArAQAxATEAiTDkCcSJ20G6) [Zugriff: 09.04.2019]

*UCSC Genome Browser*, rs34647. Abgerufen von [https://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr5%3A7281635372816853&hgsid=227582923\\_OtulY4NrEnx1duJe9BWu1ysFNxol](https://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr5%3A7281635372816853&hgsid=227582923_OtulY4NrEnx1duJe9BWu1ysFNxol) [Zugriff: 08.04.2019]

*UCSC Genome Browser*, rs4794016. Abgerufen von [https://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr17%3A47648315-47648815&hgsid=227582895\\_UScDIACc7VM4MRvpZ9Rp35ardUZZ](https://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr17%3A47648315-47648815&hgsid=227582895_UScDIACc7VM4MRvpZ9Rp35ardUZZ) [Zugriff: 08.04.2019]

*UCSC Genome Browser*, rs62084683. Abgerufen von [https://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr17%3A68035359-68035859&hgsid=227582827\\_jWICUa7NNmTkaA0MH4ByHLs9vINO](https://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr17%3A68035359-68035859&hgsid=227582827_jWICUa7NNmTkaA0MH4ByHLs9vINO) [Zugriff: 08.04.2019]

*UCSC Genome Browser*, rs713982. Abgerufen von [https://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr22%3A2011704620117546&hgsid=227582711\\_hRWiV3o4I2FnZDn0YppFw6ed3FAA](https://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr22%3A2011704620117546&hgsid=227582711_hRWiV3o4I2FnZDn0YppFw6ed3FAA) [Zugriff: 08.04.2019]

*UCSC Genome Browser*, rs7146310. Abgerufen von [https://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr14%3A2418449824184998&hgsid=227582878\\_XBLeynAPu8gtAspCDVeVovHmмуEf](https://genome-euro.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?db=hg38&lastVirtModeType=default&lastVirtModeExtraState=&virtModeType=default&virtMode=0&nonVirtPosition=&position=chr14%3A2418449824184998&hgsid=227582878_XBLeynAPu8gtAspCDVeVovHmмуEf) [Zugriff: 09.04.2019]

## **7. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift**

Die Arbeit wurde in dem Institut für medizinische Genetik und angewandte Genomik unter Betreuung von Prof. Dr. Olaf Rieß durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Thorsten Schmidt, Leiter der Arbeitsgruppe SCA3. Die untersuchten Polymorphismen wurden im Rahmen der Promotion von der medizinischen Doktorandin Annemarie Koebisch, Eberhardt-Karls-Universität Tübingen, für das Projekt ausgewählt.

Sämtliche Versuche wurden (nach Einarbeitung durch Dr. Thorsten Schmidt) von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Beratung von Prof. Dr. Martin Eichner, Institut für Biometrie, durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Menschen bedanken, ohne deren Unterstützung die Fertigstellung dieser Dissertation nicht möglich gewesen wäre. An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Rieß, danken, der mir mit Rat und Tat zur Seite stand, mir die Forschung in seinem Labor und das Schreiben dieser Dissertation ermöglicht hat. Mein weiterer großer Dank gilt Dr. Thorsten Schmidt für meine Betreuung, die Hilfestellungen im Labor und die Unterstützung bei sämtlichen wissenschaftlichen Fragen. Besonderen Dank möchte ich auch allen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe aussprechen, die mich herzlich als Mitglied aufgenommen haben und zu jeder Zeit ein offenes Ohr für Fragen hatten. Hier möchte ich insbesondere Annemarie Koebisch nennen, ohne deren Recherche und Vorarbeit meine Forschung nicht zustande gekommen wäre, darüber hinaus auch Jonasz Weber und Daniel Weishäupl, die mir bei meiner Forschung im Labor immer zur Seite standen.

Ich danke dem Universitätsklinikum Tübingen für die Doktorandenstelle am Institut für medizinische Genetik und angewandte Genomik und den an diesem Institut arbeitenden Mitgliedern für die Unterstützung meiner Arbeit. Ein Dankeschön geht auch an die Patienten, die ihre DNA-Proben für meine Forschung zur Verfügung gestellt haben.

Für die finanzielle und professionelle Unterstützung meiner Dissertation und das Rahmenprogramm, bei dem ich sehr viel gelernt habe, danke ich dem IZKF Promotionskolleg. Ein besonderes Dankeschön möchte ich Frau Dr. Inka Montero für ihre verständnisvolle persönliche Beratung aussprechen. Bei Herrn Prof. Dr. Martin Eichner möchte ich mich für die hervorragende statistische Beratung bedanken. Und zu guter Letzt danke ich meiner Familie und meinen Freunden für ihre emotionale Unterstützung.