

Aus dem
Department für Diagnostische Labormedizin
der Universität Tübingen
Institut für Medizinische Genetik und angewandte Genomik

**Untersuchung des Einflusses von Polymorphismen auf die
Expression von Proteinen des nukleozytoplasmatischen
Transports als modifizierende Faktoren der
Spinocerebellären Ataxie Typ 3**

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

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

vorgelegt von

Köbsch, Annemarie Brigitte Waltraud

2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. O. Rieß

2. Berichterstatter: Professor Dr. B. Wissinger

Tag der Disputation: 29.03.2021

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis.....	7
Abbildungsverzeichnis.....	8
1 Einleitung.....	10
1.1 Spinozerebelläre Ataxie (SCA).....	10
1.2 weltweite Prävalenz der SCAs	11
1.3 Frühsymptome und Erkrankungsalter der SCA3.....	12
1.4 Symptomatik der SCA3	13
1.5 Genetische Einflussfaktoren der SCA3	14
1.6 Therapieansätze der SCA3	16
1.7 Ätiologie der SCA3: die Rolle des Ataxin-3, nukleärer Einschlusskörper und Mechanismen des nukleozytoplasmatischen Transports	18
1.8 High Resolution Melting (HRM).....	21
1.9 Zielsetzung.....	25
2 Material und Methoden	27
2.1 Material	27
2.1.1 Chemikalien	27
2.1.2 Puffer	27
2.1.3 Kits.....	28
2.1.4 Geräte.....	28
2.1.5 Verbrauchsmaterialien	29
2.1.6 Software	29
2.1.7 DNA-Proben.....	30
2.2 Methoden	31
2.2.1 Design der Primer und Oligonukleotidsonden.....	31
2.2.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	33

2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese (AGE)	35
2.2.4 Genotypisierung durch High Resolution Melting (HRM)	36
2.2.5 DNA-Aufreinigung mit AgencourtAMPure	38
2.2.6 DNA-Aufreinigung aus dem Agarosegel mit dem QIAquick Gel-Extraction Kit	39
2.2.7 DNA-Quantifizierung mittels AGE	39
2.2.8 Sequenzier-Reaktion nach Sanger	40
2.2.9 Ethanol-Präzipitation	41
2.2.10 Fragmentanalyse	42
2.2.11 Testen der Typisierungsergebnisse auf Vereinbarkeit mit dem Hardy Weinberg-Gesetz (HWE)	43
2.2.12 Statistische Auswertung	44
3 Ergebnisse.....	46
3.1 Fünfzehn Polymorphismen wurden für die weitere Analyse ausgewählt.....	46
3.2 Primer-Design für das Etablierungsverfahren.....	47
3.3 Fünf Polymorphismen wurden erfolgreich für die LightCycler-PCR etabliert...	49
3.4 Das Amplicon Melting eignete sich am besten zur Genotypisierung	51
3.5 Das durchschnittliche Erkrankungsalter der untersuchten Patienten betrug 40 Jahre, die Daten zeigten eine Normalverteilung.....	55
3.6 Deutliche Unterschiede beim Erkrankungsalter bei den Polymorphismen <i>IPO13</i> <i>Prom53</i> , <i>KPNA3 Prom35</i> und <i>-Prom43</i>	57
3.7 Der <i>KPNA3</i> -Polymorphismus <i>Prom43</i> beeinflusste signifikant das Erkrankungsalter der <i>SCA3</i> -Patienten	61
4 Diskussion	67
4.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse.....	67
4.2 Grundlagen der Polymorphismen-Recherche	68
4.3 Rückschlüsse aus dem Etablierungsverfahren.....	69

4.4 alternative Genotypisierungsverfahren im Vergleich	70
4.5 unterschiedliche statistische Herangehensweisen	71
4.6 Der scheinbare Einfluss des SNP <i>IPO13</i> Prom53 auf das Erkrankungsalter konnte nicht bewiesen werden	72
4.7 Der SNP <i>CRM1</i> Prom308 scheint keine Rolle bei der SCA3 zu spielen	74
4.8 Der SNP <i>KPNA3</i> Prom43 modifiziert das Erkrankungsalter von SCA3 Patienten	75
4.9 Schlussfolgerung	77
5 Zusammenfassung	79
6 Literaturverzeichnis	80
7 Erklärung zum Eigenanteil	89
8 Danksagung	90

Abkürzungsverzeichnis

AD	Alzheimer Disease, Alzheimer Demenz
AGE	Agarose Gelelektrophorese
ANCOVA	Analysis of Covariance, Kovarianzanalyse
<i>ATN1</i>	<i>Atrophin 1-Gen</i>
<i>ATXN3</i>	<i>Ataxin-3-Gen</i>
CEPH	Centre d'Etude du Polymorphisme Human
<i>CRM1</i>	<i>Chromosome-Region-Maintenance 1-Gen</i>
DNA	Deoxyribonucleic Acid, Desoxyribonukleinsäure
DRPLA	Dentato-Rubrale-Pallido-Luysische Atrophie
HD	Huntingtons Disease, Chorea Huntington
HPLC	High Performance Liquid Chromatography, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRM	High Resolution Melting
<i>HTT</i>	<i>Huntingtin-Gen</i>
HWE	Hardy-Weinberg-Equilibrium, Hardy-Weinberg-Gesetz
In	Intron
<i>IPO13</i>	<i>Importin 13-Gen</i>
KI	Konfidenzintervall
<i>KPNA3</i>	<i>Karyopherin α3-Gen</i>
<i>KPNB1</i>	<i>Karyopherin β1-Gen</i>
MJD	Machado-Joseph-Disease, Machado Joseph Krankheit
<i>MT-ND3</i>	<i>Mitochondriale NADH-Dehydrogenase Subunit 3-Gen</i>
NPC	Nuclear Pore Complex
NTP	Nukleosidtriphosphate (dNTP – desoxi-NTP, ddNTP – didesoxi-NTP)
PCR-RFLP	PCR-Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
PD	Parkinsons Disease, Parkinsonsche Krankheit
Prom	Promotor
SCA	Spinocerebellar Ataxia, Spinozerebelläre Ataxie
SD	Standard deviation, Standardabweichung
SNP	Single Nucleotide Polymorphism, Einzelnukleotidpolymorphismus

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Eine Isoform von Ataxin-3 dargestellt in Neuronen von SCA3-Patienten.....	19
Abb. 2: Schematische Darstellung der Entstehung von DNA-Duplizies	24
Abb. 3: Schematische Darstellung einer asymmetrischen PCR	25
Abb. 4: Schematisch dargestellter Temperaturverlauf im LightCycler	38
Abb. 5: Beispiel einer AGE zur Ermittlung der DNA-Konzentration.	40
Abb. 6: Beispiel einer durch Sanger Sequenzierung ermittelten Basenabfolge.....	43
Abb. 7: Online frei verfügbares Programm „HWE-calculator program“	44
Abb. 8: Vergleich der Schmelzkurven der Melt Curve Genotyping-Analyse.	49
Abb. 9: Agarose-Gelelektrophorese einer PCR nach dem Standardprotokoll.	50
Abb. 10: Melt Curve Genotyping-Analyse.....	52
Abb. 11: Kurvenscharen der Gene-Scanning-Analysen im LightCycler.....	53
Abb. 12: Genotypisierung mittels Gene-Scanning-Analyse	54
Abb. 13: Verteilung der Erkrankungsalter im untersuchten Patientenkollektiv	56
Abb. 14: Verteilung der Anzahl der CAG-Wiederholungen	57
Abb. 15: Erkrankungsalter und Anzahl der CAG-Wiederholungen	60
Abb. 16: Erkrankungsalter-Verteilung über der Anzahl der CAG-Wiederholungen...	62
Abb. 17: Regressionsgeraden aus der Kovarianzanalyse	65

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: verwendete Standardparameter für das Primer-Design	31
Tab. 2: Sequenzen der verwendeten Primer und Oligonukleotidsonden.....	32
Tab. 3: verwendete Chemikalien und Volumina für eine Touchdown-PCR	34
Tab. 4: Cyler-Protokoll für eine Touchdown-PCR	35
Tab. 5: verwendete Chemikalien und Volumina für eine symmetrische LightCycler-PCR.....	37
Tab. 6: verwendete Chemikalien und Volumina für eine asymmetrische LightCycler-PCR mit Oligonukleotidsonde.....	37
Tab. 7: LightCycler-Protokoll für eine PCR mit High Resolution Melting	37
Tab. 8: benötigte Chemikalien und Volumina für eine Sequenzierreaktion	41
Tab. 9: Cyler-Protokoll für eine Sequenzierreaktion	41
Tab. 10: Ethanolpräzipitation: Volumina und Konzentrationen von Ethanol (-20 °C)	42
Tab. 11: Polymorphismen, die für die weitere Analyse ausgewählt wurden.	47
Tab. 12: SNPs, für die Bedingungen für eine LightCycler PCR hergestellt wurden..	50
Tab. 13: Beschreibung des Gesamtdatensatzes.....	56
Tab. 14: Anzahl der typisierten Proben von der gesamten Probenmenge und Verteilung der Proben auf die Polymorphismenvarianten.....	58
Tab. 15: Häufigkeit der Haplotypen von KPNA3 <i>rs12868235</i> und <i>rs9535343</i>	59
Tab. 16: Ergebnisse der Genotypisierung der Patienten-DNA-Proben.....	61
Tab. 17: Regressionsgeradengleichungen.....	66

1 Einleitung

1.1 Spinozerebelläre Ataxie (SCA)

Menschen, die an einer spinozerebellären Ataxie leiden, haben im Verlauf ihrer Erkrankung zunehmende Schwierigkeiten damit, ihre Bewegungen zu koordinieren. Das betrifft vor allem das Gehen und Stehen und führt bei den Meisten früher oder später dazu, dass sie eine Gehhilfe oder einen Rollstuhl benötigen. Die beeinträchtigten Muskelgruppen sind zahlreich – es sind u.a. die Augenbewegungen, die Sprache und die Feinmotorik der Arme und Hände betroffen (Schöls et al., 1997). Trotz erhaltener Muskelkraft können Bewegungen, die das Zusammenspiel verschiedener Muskeln erfordern, nur noch schwer oder gar nicht mehr durchgeführt werden. Eine Ataxie kann durch verschiedene Erkrankungen verursacht werden, die das Kleinhirn oder die sensiblen Bahnen des Rückenmarks befallen. Dazu zählen Schlaganfälle des Kleinhirns, entzündliche Erkrankungen, Vergiftungen, Metastasen, sowie erbliche Erkrankungen – wie z.B. die Gruppe der Spinozerebellären Ataxien (SCAs). Diese werden autosomal dominant vererbt und führen zu einer fortschreitenden Neurodegeneration im Kleinhirn und aufsteigenden Rückenmark. Aktuell sind über 40 verschiedene Typen bekannt, sie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Symptomatik und ihren verursachenden Mutationen (Coarelli et al., 2018).

Eine der weltweit häufigsten Spinozerebellären Ataxien ist die SCA Typ 3 (SCA3), diese Form wird auch Machado Joseph–Krankheit (MJD) genannt. Die Erstbeschreibung erfolgte 1972 durch Nakano *et al.*, diese Arbeit beschrieb eine hereditäre Ataxie-Form in einer Familie, die von den portugiesischen Azoren in die USA emigriert war, und deren ältestes bestimmbares Mitglied William Machado hieß (Nakano et al., 1972). Rosenberg *et al.* beschrieben kurz darauf eine weitere Großfamilie aus den Azoren, die Joseph-Familie, welche ebenfalls an der neuen erblichen Ataxie-Form litt (Rosenberg et al., 1976). Im Verlauf wurde das Krankheitsbild auch in Familien diagnostiziert, die keine Wurzeln in den Azoren aufwiesen. Der Genort der verursachenden Mutation wurde 1993 durch Takiyama *et al.* veröffentlicht (Takiyama et al., 1993). Kawaguchi *et al.* beschrieben 1995 die verursachende Mutation, diese befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 14 in der Sequenz, die für das Protein Ataxin-3 kodiert (Kawaguchi et al., 1994). Es handelt sich bei der Mutation um eine

verlängerte CAG-Wiederholungssequenz, welche bei gesunden Menschen 12 bis 44 CAG-Wiederholungen aufweist, bei an SCA3 erkrankten Menschen jedoch 61 bis 81 Wiederholungen (Bettencourt and Lima, 2011). Da die Basensequenz CAG für die Aminosäure Glutamin kodiert, bezeichnet man Erkrankungen, die durch eine verlängerte CAG-Basensequenz im kodierenden Bereich verursacht werden, als Polyglutaminerkrankungen. Zu diesen gehören ebenfalls die SCA-Untertypen SCA1, 2, 6, 7 und 17, sowie die neurodegenerativen Erkrankungen Dentato-Rubrale-Pallido-Luysische Atrophie (DRPLA), Morbus Huntington (HD), und die Spinobulbäre Muskelatrophie (SBMA) (Gatchel and Zoghbi, 2005). Die Anzahl der CAG-Wiederholungen ist negativ mit dem Erkrankungsalter korreliert, sowie positiv mit der Schwere der Symptomatik (Maciel et al., 1995).

1.2 weltweite Prävalenz der SCAs

Ruano *et al.* haben 2014 eine Übersichtsarbeit über insgesamt 22 SCA-Prävalenzstudien aus 16 Ländern veröffentlicht, welche im Zeitraum von 1983 - 2013 publiziert worden waren. In dieser Arbeit hatten die SCAs global gesehen eine Prävalenz von etwa 2,7/100.000 Einwohnern, wobei die Spannweite je nach Prävalenzstudie von 0 bis 5,6/100.000 Einwohnern reichte. Die Studien stammten aus europäischen, asiatischen, nordafrikanischen und südamerikanischen Ländern. Keine Daten lagen vor für Nordamerika, Afrika südlich der Sahara und Ozeanien. Die häufigste autosomal dominant vererbte Ataxie-Form war die SCA3. Sie trat in fast jeder untersuchten Population auf, mit Ausnahmen in Wales und Italien, und war in den meisten Studien die häufigste Form, gefolgt von SCA2 und SCA6 (Ruano et al., 2014). In den Niederlanden schätzten Van de Warrenburg et al. für den 01.11.2000 eine SCA-Mindestprävalenz von 3:100.000, das entsprach einer Anzahl von 473 Betroffenen im Land (van de Warrenburg et al., 2002). In Norwegen wurde die Prävalenz von SCA3 am 01.02.2008 auf 4,2:100.000 geschätzt (Erichsen et al., 2009). Für Deutschland lagen keine vergleichbaren Daten vor. Schöls *et al.* untersuchten 1995 38 deutsche Familien, die von einer SCA betroffen waren, hinsichtlich ihrer verursachenden Mutationen und ermittelten einen SCA3-Anteil von etwa 50 %, das entsprach 19 Familien (Schöls et al., 1995). Im Jahr 1997 untersuchten sie insgesamt 77 SCA-Familien in Deutschland, die SCA3 war auch in dieser Studie die häufigste Form und nahm einen Anteil von 42 % der Familien ein (Schöls et al., 1997).

1.3 Frühsymptome und Erkrankungsalter der SCA3

Zahlreiche Studien haben die Krankheitssymptome von SCA3 und deren Dynamik untersucht. SCA3-Patienten kommen zunächst gesund auf die Welt, die ersten Symptome treten selten vor der zweiten Lebensdekade auf. Ein Schwerpunkt lag daher in vielen Studien bei der Ermittlung des wahrscheinlichen Erkrankungsalters und der Erkennung von Frühsymptomen. Veränderungen der Augenbewegungen gelten als möglicher Parameter zur Früherkennung, u.a. ist bei der SCA2 die Sakkadengeschwindigkeit präklinisch vermindert (Velazquez-Perez et al., 2009). Wu *et al.* zeigten auch bei der SCA3, dass Betroffene im präklinischen Stadium im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden vermehrt SCA3-typische Augenbewegungsstörungen aufweisen (Wu et al., 2017). Globas *et al.* beschrieben zuvor Doppelbilder als ein Frühsymptom von SCA3 (Globas et al., 2008).

Je nach Studie erkrankten die Betroffenen mit durchschnittlich 37 bzw. 40 Jahren, wobei die Spannweite von 5 bis 66 Jahren bzw. 10 bis 78 Jahren reichte (Jacobi et al., 2011, Tezenas du Montcel et al., 2014b). Durch die linear negative Korrelation des Erkrankungsalters mit der Länge der pathologischen CAG-Wiederholungssequenz lassen sich etwa 50 - 80 % der Variabilität des Erkrankungsalters erklären (van de Warrenburg et al., 2002). Eine etwas präzisere Vorhersage des Erkrankungsalters ermöglichten Tezenas du Montcel *et al.*, indem sie eine logarithmische Beziehung zwischen der Wiederholungssequenz-Länge und dem Erkrankungsalter herstellten und dabei auch das aktuelle Alter der präsymptomatischen Mutationsträger miteinbezogen. Nach diesen Berechnungen kann man beispielsweise aussagen, dass bei einem Betroffenen mit 54 CAG-Wiederholungen zum Zeitpunkt der Geburt das durchschnittliche Erkrankungsalter 87,2 Jahre mit einem 90 % Konfidenzintervall (KI) von 59,3 bis 122,3 Jahren betragen würde. Bei der gleichen Wiederholungszahl und einem aktuellen Lebensalter von 50 Jahren wäre das durchschnittliche Erkrankungsalter jedoch 87,7 Jahre (90 % KI: 60,2 - 122,4 Jahre). Bei einem Betroffenen mit 77 Wiederholungen wäre zum Zeitpunkt der Geburt das durchschnittliche Erkrankungsalter 23,8 Jahre (90 % KI: 16,2 - 33,3 Jahre). Bei der gleichen Wiederholungszahl und einem Lebensalter von 50 Jahren wäre das durchschnittliche Erkrankungsalter jedoch 52,9 Jahre (90 % KI: 50,1 - 58,6 Jahre) (Tezenas du Montcel et al., 2014b). An diesen Beispielen erkennt man, dass die

Vorhersagespanne des Erkrankungsalters nach diesem Modell akkurater wird, je länger die CAG-Wiederholungssequenz des Betroffenen ist. Bei kleineren Wiederholungszahlen ist die berechnete Altersspanne jedoch sehr groß.

1.4 Symptomatik der SCA3

Der Verlust von Nervenzellen führt bei SCA3-Patienten zur Dysfunktion der betroffenen Areale, dies verursacht ein breites Symptomspektrum. Zu diesem gehören eine progressive Ataxie, Spastik, Dystonie, Dysarthrie, Ophthalmoplegie und Neuropathie (Matos et al., 2011). Wie in den anderen häufigen SCAs (SCA1, 2 und 6) ist das dominante Symptom bei der SCA3 die progressive Ataxie (Jacobi et al., 2011). Diese ist charakterisiert durch Gang- und Standstörungen, eine gestörte Okulomotorik, einen Intentionstremor und Dysdiadochokinese. Das Erkrankungsalter wird in den meisten Studien definiert durch das Alter beim erstmaligen Auftreten von Gangstörungen (Globas et al., 2008). In einer Studie zur Dynamik der SCA3-Symptomatik dauerte es ab diesem Zeitpunkt in Deutschland durchschnittlich 13,9 Jahre bis zum Erreichen der Rollstuhlpflicht (Schöls et al., 1997). Es gibt zudem zahlreiche Nicht-Ataxie-Symptome, die bei der SCA3 auftreten können, aber nicht müssen. Zu diesen gehören Dysarthrie und Schluckstörungen, Muskelkrämpfe und -faszikulationen, autonome Dysfunktionen wie Orthostase, Nykturie und Kälteintoleranz, Schlafstörungen, Gedächtnisstörungen und verlangsamte Sakkaden bzw. sakkadenartige Augenfolgebewegungen (D'Abreu et al., 2009, Kawai et al., 2004, Yeh et al., 2005, Opal and Zoghbi, Franca et al., 2008). Als Komorbiditäten wurden vermehrt Depression, Fatigue und eine exzessive Tagesmüdigkeit beobachtet (Martinez et al., 2017). Im Laufe der Krankheit nahmen oftmals auch die kognitiven Fähigkeiten der Patienten ab. In einer chinesischen SCA3-Kohorte aus 22 Patienten und 18 gematchten Kontrollprobanden wurden bei den Patienten vergleichsweise ein unterbrochener phonemischer Sprachfluss und eine frontale exekutive Dysfunktion, sowie weniger häufig Defizite im semantischen Sprachfluss, ein schlechteres verbales Gedächtnis und eine schlechtere visuelle räumliche Wahrnehmung beobachtet (Feng et al., 2014). Die Dysarthrie behinderte die Patienten in ihrer sozialen Kommunikation, der Expression ihrer Persönlichkeit und ihrer beruflichen Entwicklung (Wolf et al., 2017). Zudem zeigte sich in einer Studie ein erhöhtes Verletzungsrisiko durch Stürze: 56,1 % der SCA3-Patienten gaben darin an, mindestens einmal pro Monat zu stürzen.

Von diesen gaben 62,1 % an, ihre täglichen Aktivitäten aus diesem Grund einzuschränken, 83,3 % gaben an, sich bei einem Sturz innerhalb des letzten Monats eine Verletzung zugezogen zu haben (Fonteyn et al., 2010). Besonders die Nicht-Ataxie-Symptomatik ist insgesamt sehr heterogen und variiert nicht nur stark zwischen Patienten mit gleicher Repeat-Länge, sondern auch zwischen Betroffenen aus der gleichen Familie (Moro et al., 2014). Schlussendlich verkürzt die Krankheit auch das Leben der Betroffenen - das Überleben ab Erkrankungsbeginn betrug in einer Studie aus dem Jahr 1998 durchschnittlich: 20-25 Jahre (Klockgether et al., 1998).

1.5 Genetische Einflussfaktoren der SCA3

Es gibt verschiedene Einflussfaktoren, die die Schwere der Krankheit oder das Erkrankungsalter von SCA3-Patienten modifizieren. Beispielsweise beeinflussen das Geschlecht und die Krankheitsdauer den Krankheitsverlauf. Bei Frauen nehmen die Nicht-Ataxie-Symptome nach Krankheitsbeginn schneller zu als bei Männern, und je weiter der Krankheitsbeginn zurückliegt, desto stärker nimmt die Ataxie-Symptomatik bei beiden Geschlechtern zu (Jacobi et al., 2011). Besonders stark sind Homozygote von der Krankheit betroffen, also Patienten, die auf beiden Allelen eine verlängerte CAG-Anzahl aufweisen (Lerer et al., 1996). Es gibt zudem einen Antizipationseffekt, der verstärkt bei paternaler Vererbung auftritt (Takiyama et al., 1995). Es sind verschiedene modifizierende Polymorphismen bekannt, dabei handelt es sich um Abschnitte im Genom, von denen es in der Bevölkerung unterschiedliche Ausführungen (Allele) gibt. Wenn eine genetische Variante eine Häufigkeit von 1 % in der Normalbevölkerung aufweist, gilt diese als Polymorphismus. Bei einem Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) handelt es sich um einen Polymorphismus, der nur aus einer einzelnen Basenänderung besteht. Gaspar *et al.* untersuchten 2001 in einer weltweiten Studie über die Haplotypen von drei intragenetischen SNPs auf dem MJD-Genlocus die genetischen Ursprünge der SCA3. Sie etablierten die Hypothese, dass alle weltweiten Fälle auf zwei Ursprungsmutationen zurückzuführen sind, welche hauptsächlich auf den Azoreninseln Flores und São Miguel gefunden wurden (Gaspar et al., 2001). Chen *et al.* haben den SNP rs2853826 untersucht, dieser liegt auf dem Exon 1 des Gens *MT-ND3*, welches für die mitochondriale NADH-Dehydrogenase subunit 3 kodiert. Die Allelfrequenzen betragen ca. 40 % für die Base A und 60 % für G, der Polymorphismus führt zu einem Basenaustausch von

Threonin (ACC) zu Alanin (GCC). Das Vorhandensein eines A-Allels beim SNP rs2853826 senkte in dieser Arbeit das Erkrankungsalter von männlichen SCA3-Patienten um durchschnittlich drei Jahre (Chen et al., 2016). In einer weiteren Arbeit von Long *et al.* zeigte sich, dass SCA3-Patienten, die ein A-Allel im rs709930-Polymorphismus und ein T-Allel im rs910369-Polymorphismus besitzen, zwei bis vier Jahre früher erkranken als die Träger der anderen Varianten. Beide SNPs befinden sich im 3' untranslatierten Bereich von *ATXN3* (Long et al., 2015). Das Apolipoprotein E, u.a. ein Protein des Fettstoffwechsels und des Hormontransports, wurde im Hinblick auf die drei häufigsten Isoformen, welche durch die Allele *APOE* ϵ 2, ϵ 3 und ϵ 4 kodiert werden, im Zusammenhang mit SCA3 untersucht. Es wurde ein niedrigeres Erkrankungsalter bei Vorhandensein des Allels ϵ 2 beschrieben (Bettencourt et al., 2011, Peng et al., 2014). Jedoch wurde dieser Zusammenhang wenig später durch Zhou *et al.* bezweifelt, da in deren Studien eine Kovarianzanalyse keinen Zusammenhang ergab (Zhou et al., 2014). Tezenas du Montcel *et al.* untersuchten den Zusammenhang zwischen der Länge der CAG-Wiederholungssequenzen anderer Polyglutaminerkrankungen und dem Erkrankungsalter bei SCA3. Sie beobachteten einen Einfluss durch bestimmte Allele in den Genen *Ataxin 2* (*ATXN2*), *Atrophin 1* (*ATN1*) und *Huntingtin* (*HTT*), welche ursächlich für die Erkrankungen SCA2, Dentato-Rubrale-Pallido-Luysische Atrophie (DRPLA) und Morbus Huntington (HD) sind. Sie beobachteten ein früheres Erkrankungsalter bei Patienten, die 27-29 CAG-Wiederholungen in einem *ATXN2*-Allel vorwiesen. Die gemeinsame Berücksichtigung des langen *ATXN3*-Allels und des kürzeren *HTT*-Allels zeigte bei SCA3-Patienten ein späteres Erkrankungsalter. Die gemeinsame Berücksichtigung des längeren *ATXN3*-Allels, sowie des längeren *ATN1*-Allels zeigte wiederum ein früheres Erkrankungsalter. Die drei Beobachtungen wurden in folgenden Studien mit kleineren Fallzahlen nicht reproduziert (Tezenas du Montcel et al., 2014a).

Der stärkste bekannte genetische Einflussfaktor auf das Erkrankungsalter der SCA3 ist die Anzahl der CAG-Wiederholungen im verlängerten *ATXN3*-Allel. Je mehr CAG-Wiederholungen in der mutierten Wiederholungssequenz vorhanden sind, um so früher treten die ersten Symptome auf und die Betroffenen zeigen eine schwerere Symptomatik (Maciel et al., 1995). Trotz gleicher Wiederholungszahl gibt es jedoch große interindividuelle Unterschiede im Erkrankungsalter, es können nur etwa 50 - 80

% der Variabilität mit der Anzahl der CAG-Wiederholungen erklärt werden (van de Warrenburg et al., 2002). Präsymptomatische Träger der SCA3-Mutation haben somit keine sichere Möglichkeit zu erfahren, in welchem Alter sie voraussichtlich erkranken werden. Aus diesem Grund sind die genetischen Einflussfaktoren auf den Krankheitsverlauf und das Erkrankungsalter weiterhin ein Gegenstand der Forschung. Ziel wäre es, den Zeitraum bis zum Erkrankungsbeginn asymptomatischer Mutationsträger basierend auf der Kenntnis genetischer Faktoren besser einzugrenzen. Die Kenntnis ihres wahrscheinlichen Erkrankungsalters würde es den Patienten erleichtern, vorzuplanen und Vorkehrungen zu treffen.

1.6 Therapieansätze der SCA3

Bisher gibt es keine Therapie, die den Krankheitsverlauf von SCA3 verlangsamt oder aufhält. In den Therapieempfehlungen stehen daher die bedarfsgerechte Versorgung mit Hilfsmitteln, Physiotherapie, Logopädie, Osteoporoseprophylaxe und die medikamentöse Behandlung einzelner Symptome im Vordergrund (Storey, 2014). Diverse Medikamente unterschiedlicher Substanzklassen, welche den Abbau fehlgefalteter Proteine fördern, sind in verschiedenen SCA3-Tiermodellen sowie an Patienten mit verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen erforscht worden (Li et al., 2015). Am vielversprechendsten erscheinen aktuell die Substanzen: Lithium, Vareniclin, Riluzol, Amantadin und Valproinsäure.

Saute *et al.* untersuchten 2014 in einer randomisierten, placebo-kontrollierten, doppelblinden Phase 2-Studie mit 63 SCA3-Patienten über 48 Wochen den Effekt von Lithiumcarbonat auf verschiedene klinische Scores für Ataxie- und andere Symptome. Es zeigte sich eine geringere Progredienz in der zerebellären Symptomengruppe des NESSCA (Neurological Examination Score for the Assessment of Spinocerebellar Ataxia) in der Lithiumcarbonat-Gruppe im Vergleich zur Placebo-Gruppe. Es zeigte sich jedoch kein Effekt auf den SARA (Score for the Assessment and Rating of Ataxia), welcher ebenfalls die Ataxie-Symptomatik erfasst. Es wurde daher geschlossen, dass größere randomisierte kontrollierte Studien nötig sind (Saute et al., 2015).

In einer doppelblinden, randomisierten, Placebo-kontrollierten Studie mit 20 SCA3-Patienten wurde Vareniclin, ein partieller $\alpha 4\beta 2$ Agonist an neuronalen nikotinergen Acetylcholinrezeptoren, an SCA3 Patienten erprobt. Es zeigte sich vorrangig eine

Verbesserung der Stand- und Gangataxie bei einer Gabe von 2x1 mg/d (Zesiewicz et al., 2012). Eine Bestätigung in größeren Fallgruppen steht bisher noch aus.

Riluzol, welches zum einen spannungsgesteuerte Natriumkanäle blockiert und somit antiglutamaterg wirkt, und zum anderen Kalzium-gesteuerte Kaliumkanäle öffnet und somit die neuronale Übererregbarkeit in Kleinhirnkernen reduziert, wurde in einer doppelblinden, Placebo-kontrollierten Studie mit 40 Patienten mit zerebellärer Ataxie unterschiedlicher Ätiologie untersucht. Es zeigte sich bei einer Verabreichung von 100 mg/d nach acht Wochen ebenfalls eine leichte Verbesserung der Ataxie-Symptomatik (Ristori et al., 2010). Im Anschluss an diese Ergebnisse wurde eine weitere Studie mit einer Laufzeit von zwölf Monaten an 60 Patienten mit SCA und Friedreich-Ataxie durchgeführt. Es zeigte sich eine signifikante Verminderung der Ataxie-Symptome in der Riluzol-Gruppe (Romano et al., 2015). In einer transgenen SCA3-Mausmodell-Studie, in der über zehn Monate jeweils 10 mg/kg Riluzol im Trinkwasser verabreicht wurden zeigte sich kein Einfluss auf die motorischen Symptome, jedoch eine reduzierte Menge von löslichem Ataxin-3 im Hirngewebe. Es wurde jedoch unerwartet eine Schädigung von Purkinje-Zellen beobachtet und daher von einer Langzeittherapie mit Riluzol am Menschen abgeraten (Schmidt et al., 2016).

Amantadin, ein nicht-kompetitiver N-Methyl-D-Aspartat-Agonist hat in zwei Studien einen positiven Effekt auf die Ataxie-Symptomatik von Patienten mit degenerativer zerebellärer Ataxie bei kontinuierlicher Gabe von 300 mg/d gezeigt (Botez et al., 1996, Botez et al., 1991). Obwohl die exakten Wirkungsweisen von Vareniclin, Riluzol und Amantadin in Bezug auf SCA3 nicht bekannt sind, wurden diese in einem Konsensus-Artikel als mögliche symptomlindernde Medikation beschrieben (van de Warrenburg et al., 2014).

Lei *et al.* führten eine randomisierte, doppelblinde, placebokontrollierte Studie mit Valproinsäure, einem Inhibitor der Histon-Deazetylierung, an 36 SCA3-Patienten für zwölf Wochen durch. Valproinsäure wird für die Behandlung von Bipolaren Störungen und Epilepsien eingesetzt. Es zeigte sich eine signifikante Abnahme der Ataxie-Symptomatik sowohl bei der Verabreichung einer Dosis von 1200 mg/d und 800 mg/d (Lei et al., 2016).

Die aufgezeigten Studien konnten bislang nur leichte Effekte auf die Ataxie-Symptomatik nachweisen und die Nicht-Ataxie-Symptome blieben nahezu unbeeinflusst. Aufgrund der fehlenden Möglichkeit, die Erkrankung kausal zu therapieren oder den Fortschritt zu verlangsamen, besteht neben weiteren randomisierten, kontrollierten, doppelblinden Medikamentenstudien mit größeren Fallzahlen weiterhin Bedarf an Grundlagenforschung bspw. über bessere Erkennung von Frühsymptomen oder die Identifizierung weiterer genetischer Einflussfaktoren.

1.7 Ätiologie der SCA3: die Rolle des Ataxin-3, nukleärer Einschlusskörper und Mechanismen des nukleozytoplasmatischen Transports

Ataxin-3 ist im menschlichen Körper ubiquitär vorhanden und kommt sowohl im Zellkern, als auch im Zytoplasma vor (Paulson et al., 1997). Seine physiologische Funktion besteht u.a. darin, fehlgefaltete Proteine zu ubiquitinieren und ist somit ein Teil des zellulären Systems zur Qualitätskontrolle für Proteine (Li et al., 2015). Bei SCA3-Patienten führt die Mutation zum neuronalen Zelluntergang in verschiedenen Hirnregionen, insbesondere im Zerebellum, den Pontinen Kernen, der Substantia nigra, dem Striatum und dem Rückenmark (Matos et al., 2011). Welche Mechanismen letztendlich zum Zelluntergang führen, ist nicht abschließend geklärt. Beteiligte Mechanismen sind die Proteinefehlfaltung des mutierten Ataxin-3 und die Bildung von unlöslichen Aggregaten in neuronalen Zellkernen, die proteolytische Spaltung des mutierten Ataxin-3 durch Proteasen und die Entstehung toxischer Fragmente, der nukleäre Transport, mitochondriale Dysfunktion, Proteinabbau durch Proteasome bzw. Autophagie und Lysosomen (Warrick et al., 1998, Weber et al., 2014). Wie auch bei anderen Polyglutaminerkrankungen findet man in neuronalen Zellkernen von SCA3-Patienten sehr stabile, Amyloid-ähnliche, fibrilläre Einschlusskörper, welche u.a. Fragmente des mutierten Ataxin-3 einschließlich des Polyglutaminstranges enthalten (Ellisdon et al., 2006, Schmidt et al., 1998) (Abb. 1). Sie enthalten weiterhin molekulare Chaperone und Proteine des Ubiquitin-Proteasom-Systems. Auf verschiedene Weisen stören sie das zelluläre Protein-Qualitäts-Kontrollsystem und stehen somit neben diversen anderen Mechanismen im Zusammenhang mit dem Zelluntergang von Neuronen, welche dafür besonders anfällig zu sein scheinen (Li et al., 2015, Warrick et al., 1998). Das Auftreten von nukleären Einschlusskörpern wird bei Polyglutaminerkrankungen häufig als Parameter zur Beurteilung des Krankheits-

fortschrittetes herangezogen. In einer Studie zu Morbus Huntington zeigte sich jedoch, dass in Hirnregionen, die besonders stark vom Zelluntergang betroffen waren, häufig weniger Inklusionen zu finden waren als in gesunden Regionen. Es wurde daher sogar vermutet, dass sich bestimmte Aggregate zytoprotektiv auswirken könnten (Kuemmerle et al., 1999). Ataxin-3-Fragmente von intermediärer Länge, die den Polyglutaminstrang enthielten, zeigten in Zellkultur und im Mausmodell jedoch einen zytotoxischen Effekt, ebenso der Polyglutaminstrang allein (Ikeda et al., 1996). Die exakte Rolle der nukleären Aggregate bei Polyglutaminerkrankungen ist demnach ungeklärt. Eine Vermutung lautet, dass die intermediären mutierten Ataxin-3-Fragmente eine toxische Vorstufe zu den wahrscheinlich nicht toxischen größeren nukleären Inklusionen darstellen (Weber et al., 2014).

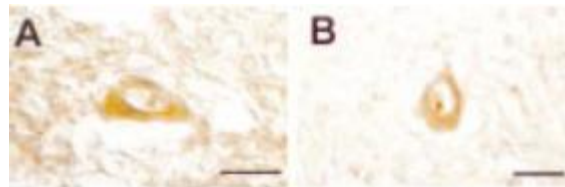


Abb. 1: Eine Isoform von Ataxin-3 dargestellt in Neuronen von SCA3-Patienten. Durch Einfärbung mittels Antikörper gegen verschiedene Ataxin-3 Strukturen zeigen sich die typischen nukleären Einschlusskörper, bestehend u.a. aus dem fehlgefalteten Ataxin-3 in Neuronen der Pons (A+B). Verändert nach Schmidt et al. (Schmidt et al., 1998).

Auffällig ist, dass Wildtyp-Ataxin-3 eher ein zytoplasmatisches Protein ist, während die Inklusionen mit dem mutierten Ataxin-3 eher nukleär lokalisiert sind (Schmidt et al., 1998, Paulson et al., 1997). Zudem wurde am Mausmodell beobachtet, dass die nukleäre Lokalisation des mutierten Ataxin-3 obligat zur Ausbildung des SCA3-Phänotyps ist und umgekehrt bei zytoplasmatischer Lokalisation wesentlich mildere Symptome auftreten (Bichelmeier et al., 2007). An der intrazellulären Lokalisation von Ataxin-3 sind verschiedene Mechanismen beteiligt. Faktoren, die eine nukleäre Ansammlung von sowohl mutiertem als auch von Wildtyp-Ataxin-3 *in vitro* verursachen, sind u.a. proteolytischer Stress in Form von Hitzeschocks, sowie oxidativer Stress. Die Ansammlung im Zellkern scheint hierbei eine protektive Wirkung zu haben (Reina et al., 2010). Zum anderen scheint die Casein-Kinase 2 (CK-2) – abhängige Phosphorylierung von Ataxin-3 die nukleäre Lokalisation von Ataxin-3 ebenfalls zu kontrollieren (Mueller et al., 2009).

Der nukleozytoplasmatische Transport von Proteinen wird im Allgemeinen über den Nuclear Pore Complex (NPC) vermittelt. Es handelt sich dabei um eine Gruppe von Transportproteinen, die spezielle Rezeptorproteine, die Karyopherine, erkennen und binden. Diese wiederum erkennen ihre spezifische Ladung anhand von Import- und Exportsignalen (nuclear localisation signal - NLS, nuclear export signal - NES), oder einer Kombination aus beiden (Pemberton and Paschal, 2005). In der Sequenz von Ataxin-3 wurden zwei NES, sowie ein NLS identifiziert (Antony et al., 2009). Die Gruppe der Karyopherine kann in Importine und Exportine unterteilt werden. Beim nukleären Import binden Importine ihre Ladung im Zytoplasma, binden dann wiederum selbst an den NPC und translozieren über die Kernmembran. Intranukleär dissoziiert der Komplex vom NPC und die Ladung löst sich durch Bindung der GTPase Ran an das Importin. Beim nukleären Export binden Exportine ihre Ladung zusammen mit RanGTP intranukleär, binden wiederum an den NPC, translozieren über die Kernmembran und dissoziieren vom NPC unter Umwandlung von GTP in GDP, wodurch die Ladung im Zytoplasma frei wird (Cook et al., 2007).

Sowa *et al.* untersuchten verschiedene Karyopherine, insbesondere Karyopherin subunit $\alpha 3$ (*KPNA3*), Exportin 1 (*CRM1/XPO1*) und Importin 13 (*IPO13*) in Zellkultur, sowie am SCA3-Drosophila- und -Mausmodell. Es stellte sich heraus, dass *KPNA3* eine Schlüsselrolle beim Transport von Ataxin-3 in den Zellkern spielt. Bei einer Überexpression von *KPNA3* in Ataxin-3-produzierenden HEK-Zellen nahm die Anzahl der Aggregate im Zellkern nach 96 h signifikant zu. Im SCA3-Drosophila- und -Mausmodell zeigte sich eine Verbesserung von charakteristischen Krankheitsmerkmalen wie die Lebenszeit und die Gesamtaktivität bei einem Knockout von *KPNA3*. Umgekehrt wirkte sich eine Überexpression von *KPNA3* entsprechend negativ aus (Sowa et al., 2018). Für *CRM1/XPO1* wurde eine nukleäre Export-Aktivität bei mutiertem Ataxin-3, nicht aber bei Wildtyp-Ataxin-3 festgestellt (Chan et al., 2011). Ein Knockout von *CRM1* im SCA3-Drosophila-Modell führte zu einer schweren Schädigung der Augenmorphologie, ebenso negativ beeinträchtigt wurde die Lebenszeit und die motorische Aktivität (Sowa et al., 2018). Bei *IPO13* verhielt es sich gegensätzlich, eine Überexpression bei HEK-Zellen führte zu einer verminderten Aggregatmenge im Zellkern. Im SCA3-Drosophila-Modell beeinflusste eine Regulation von *IPO13* weder die Augen noch das Verhalten, führte jedoch zu einer stark verminder-

ten Anzahl an Nachkommen (Sowa et al., 2018). Daraus folgt, dass Transportproteine eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der SCA3 zu spielen scheinen. Basierend auf der Arbeit von Sowa *et al.* wurden daher in dieser Arbeit Polymorphismen in den Promotorregionen von *KPNA3*, *CRM1*, *IPO13* und weiteren nukleozytoplasmatischen Transportproteinen hinsichtlich ihres Einflusses auf das Erkrankungsalter von SCA3-Patienten untersucht. Promotor-SNPs könnten die Bindung von Transkriptionsfaktoren an dieser Stelle beeinflussen und somit zu einer veränderten Expression dieser Proteine führen. Bei den Trägern einer bestimmten Variante könnten sie auf diese Weise einen Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung und das Erkrankungsalter nehmen.

Dass Einzelnukleotidpolymorphismen das Erkrankungsalter von neurodegenerativen Erkrankungen beeinflussen können, wurde u.a. für Morbus Huntington (HD), die Parkinsonsche Krankheit (PD), Alzheimer Demenz (AD) und andere SCAs gezeigt. Beispielsweise zeigten Coppede *et al.* für HD ein signifikant früheres Erkrankungsalter bei Trägern einer Variante eines Ser326Cys-Polymorphismus im DNA-Reparatur-Enzym hOGG1 (Coppede et al., 2010). In einer Kubanischen Studie zeigte sich für einen Polymorphismus im Komplex I-Gen (10398G) der mitochondrialen DNA eine Assoziation mit einem früheren Erkrankungsalter bei SCA2 (Simon et al., 2007). Der gleiche Polymorphismus wurde zuvor beschrieben als protektiver Faktor bei PD (van der Walt et al., 2003).

1.8 High Resolution Melting (HRM)

Eine schnelle und effektive Methode zur Genotypisierung von Einzelnukleotidpolymorphismen ist die High Resolution Melting-Analyse. Ririe *et al.* beschrieben 1997 erstmals eine Methode zur Genotypisierung mittels Schmelzkurvenanalyse im Anschluss an eine Real Time-PCR (Wittwer et al., 2003). 2004 beschrieben Liew *et al.* eine Weiterentwicklung dieser Methode für die Unterscheidung von SNPs in kurzen PCR-Produkten (Liew et al., 2004). Reed *et al.* untersuchten die Spezifität und Sensitivität des Verfahrens bei der Zuordnung von SNPs in Hetero- und Homozygote. Es zeigte sich eine fehlerfreie Zuordnung bei einer Produktlänge von 300 bp oder weniger, bei einer Produktlänge zwischen 400 und 1000 bp zeigte sich eine Sensitivität von 96,1 % und einer Spezifität von 99,4 % (Reed and Wittwer, 2004).

Für eine HRM-Analyse wird zunächst eine PCR durchgeführt, es wird ein kurzer Abschnitt amplifiziert, der den entsprechenden SNP enthält. Dem Reaktionsgemisch wird neben den üblichen Reagenzien ein Farbstoff hinzugefügt, welcher mit doppelsträngiger DNA interkaliert und fluoresziert. Für die Genotypisierung von SNPs stehen zwei Methoden zur Verfügung – das Amplicon Melting und die Genotypisierung mittels Oligonukleotidsonde (Liew et al., 2007).

Beim Amplicon Melting wird dem Reaktionsgemisch keine weitere Zutat hinzugefügt. Im Anschluss an die PCR wird die amplifizierte DNA erhitzt, bis sich die Doppelstränge voneinander lösen und anschließend wieder abgekühlt, sodass sich die Einzelstränge wieder zu Doppelsträngen, in diesem Fall Duplizies genannt, zusammensetzen. Durch die Denaturierung und das zufällige Reannealing fügen sich in den Reaktionsgefäßen, die heterozygote DNA enthalten, ein Teil der Doppelstränge „fehlerhaft“ zu Heteroduplizies zusammen (Abb. 2). Im Anschluss an die Denaturierung und das Reannealing wird die DNA kontinuierlich von 40 °C auf 90 °C erhitzt, dabei wird das Farbsignal durchgehend aufgezeichnet, durch Software-Berechnungen entstehen Schmelzkurven. Aufgrund des mismatches über dem SNP bei den Heteroduplizies unterscheidet sich die Form derer Schmelzkurven von denen der Homoduplizies, entsprechend können die Proben in homo- und heterozygote Varianten unterteilt werden. Die Unterscheidung zwischen den verschiedenen Homozygoten ist aufgrund der Temperaturdifferenz zwischen den jeweiligen Schmelzkurven möglich (Wittwer et al., 2003).

Für die Genotypisierung mittels Oligonukleotidsonde wird dem Reaktionsgemisch neben den Primern ein weiteres Oligonukleotid hinzugefügt, welches aus einer kurzen Sequenz besteht, die den Polymorphismus enthält. Die Sonde ist am 3' Ende blockiert, um eine Elongation durch die DNA-Polymerase zu verhindern. Der DNA-Strang, der zur Sonde komplementär ist, wird bei dieser Methode stärker amplifiziert als der Gegenstrang. Dies wird durch ein asymmetrisches Verhältnis der entsprechenden Primer erreicht. Im Anschluss an die PCR erfolgt wie beim Amplicon Melting die Denaturierung, das Reannealing und die kontinuierliche Erhitzung. In der Schmelzkurvenanalyse wird jedoch nicht die Abschmelzung der Duplizies voneinander beurteilt, sondern die Abschmelzung der Oligonukleotidsonde vom komplementären DNA-Strang (Abb. 3). Es können ebenfalls homo- und heterozygote DNAs

anhand der Formen der Schmelzkurven unterschieden werden, die Unterscheidung der verschiedenen Homozygoten ist durch die Temperaturdifferenz möglich (Zhou et al., 2004).

Beide Methoden sind zur Unterscheidung von Hetero- und Homozygoten gleich gut geeignet, zur Unterscheidung der verschiedenen Homozygoten hat die Genotypisierung mittels Oligonukleotidsonde eine bessere Trennschärfe gezeigt, insbesondere bei längeren PCR-Produkten (Liew et al., 2007). Der Vorteil beider Methoden ist die Durchführung der gesamten Analyse - inklusive PCR, Denaturierung, Reannealing und HRM-Analyse - in demselben Reaktionsgefäß ohne dieses öffnen zu müssen und der DNA der Gefahr einer Verunreinigung auszusetzen. Zudem kann nach gelungener Etablierung eine große Anzahl von DNA-Proben simultan zugeordnet werden, der Großteil der Zuordnung wird durch die entsprechende Software durchgeführt.

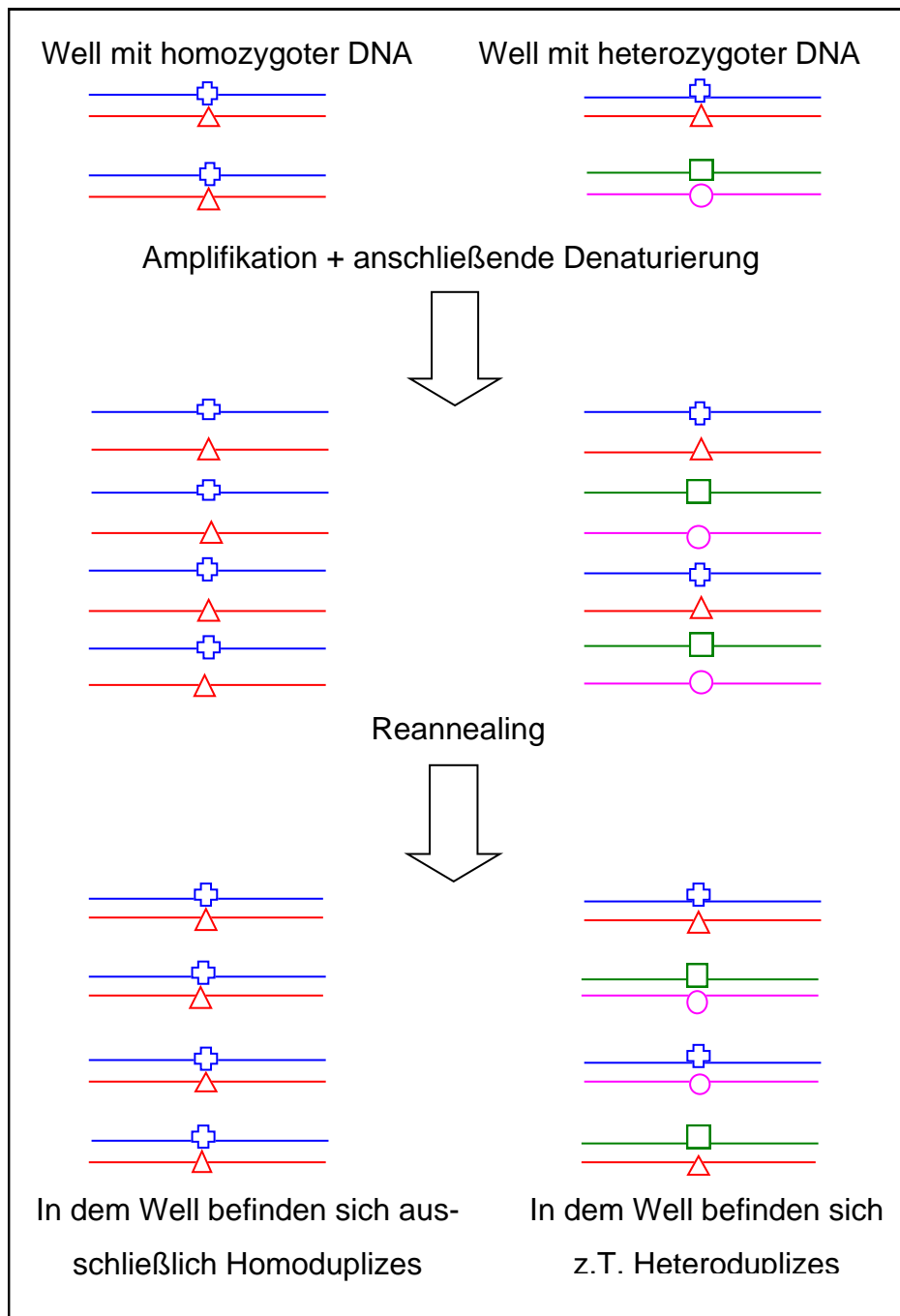


Abb. 2: Schematische Darstellung der Entstehung von DNA-Duplizies für eine Amplicon Melting-Analyse. Beim Amplicon Melting wird zunächst eine PCR durchgeführt, anschließend wird das Produkt erhitzt, sodass es zur Denaturierung der DNA-Doppelstränge kommt. Durch Abkühlung wird ein Reannealing bewirkt, dabei bilden sich in den Wells, die heterozygote DNA enthalten, z.T. Heteroduplizes.

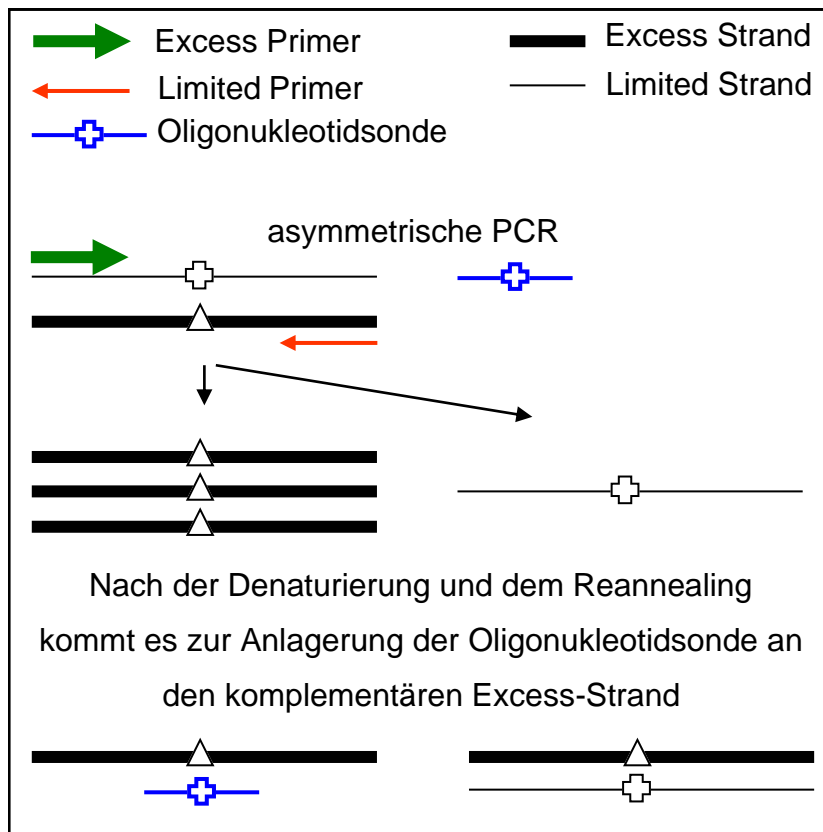


Abb. 3: Schematische Darstellung einer asymmetrischen PCR, welche der Genotypisierung mittels Oligonukleotidsonde vorausgeht. Durch eine höhere Konzentration des Excess-Primers wird bei der initialen PCR die Synthese des Excess-Strands begünstigt. Im Reaktionsgemisch befindet sich eine Oligonukleotidsonde, welche am 3'Ende blockiert ist und somit nicht elongiert wird. Nach der Denaturierung und dem Reannealing lagern sich Sonde und Excess-Strand aneinander und bilden die Grundlage für die Schmelzkurvenanalyse mittels Oligonukleotidsonde. Abbildung verändert nach Erali *et al.* (Erali *et al.*, 2008)

1.9 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, Faktoren zu finden, die das Erkrankungsalter von SCA3-Patienten beeinflussen. Der größte genetische Einflussfaktor auf das Erkrankungsalter ist die Anzahl der CAG-Wiederholungen im langen *ATXN3*-Allel, dies erklärt jedoch nur 50-80 % der Variabilität (van de Warrenburg *et al.*, 2002). Es sind weitere genetische Einflussfaktoren bekannt, die das Erkrankungsalter leicht modulieren (Chen *et al.*, 2016, Long *et al.*, 2015, Bettencourt *et al.*, 2011, Peng *et al.*, 2014, Tezenas du Montcel *et al.*, 2014a). Untersuchungen über den Einfluss verschiedener Karyopherine auf den nukleozytoplasmatischen Transport von Ataxin-3 zeigten die wichtige Rolle, die diese bei der Modulation des SCA3-Phänotyps im Drosophila- und Mausmodell spielen. Ein Knockout des Transportprotein-Gens *KPNA3* führte dort zu

einer längeren Überlebenszeit und einer höheren Gesamtaktivität. Ein Knockout des Gens *CRM1* führte im SCA3-Drosophila-Modell zu einer geschädigten Augenmorphologie, sowie zu einer verkürzten Lebenszeit und einer verringerten motorischen Aktivität. Eine Überexpression des Gens *IPO13* führte in HEK-Zellen zu einer verminderten Aggregatmenge im Zellkern (Sowa et al., 2018). Eine veränderte Expression dieser Proteine könnte somit auch beim Menschen zu einem veränderten Phänotyp führen. Aufgrund des Einflusses von *KPNA3*, *IPO13* und *CRM1* auf die intrazelluläre Lokalisation von Ataxin-3 *in vitro*, sowie auf den Phänotyp im SCA3-Fliegen- und Mausmodell, ist auch ein Einfluss einer veränderten Expression dieser Proteine auf das Erkrankungsalter beim Menschen zu erwarten. Die Expression von Proteinen könnte durch Veränderungen in der Promotorregion des Gens beeinflusst werden, daher sollen in dieser Arbeit Polymorphismen in der Promotorregion von Karyopherinen hinsichtlich ihres Einflusses auf das Erkrankungsalter von SCA3-Patienten untersucht werden. Die Karyopherine *KPNA3*, *CRM1*, *IPO13* und weitere wurden bisher nicht in dieser Hinsicht untersucht. Eine nachgewiesene Beeinflussung durch bestimmte Polymorphismen könnte in Zukunft bei der Berechnung des voraussichtlichen Erkrankungsalters einbezogen werden und somit den Betroffenen helfen, ihre Zukunft besser zu planen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Die Eigennamen für registrierte oder unregistrierte Markennamen wurden in den folgenden Materiallisten, sowie im weiteren Text nicht gesondert gekennzeichnet.

2.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Bezeichnung, Hersteller, Ort
H ₂ O	Ampuwa Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
Taq Polymerase	One Taq DNA Polymerase, New England BioLabs, Frankfurt a.M.
5x Standard Puffer	One TaqStandard Reaktion Buffer 5x, New England BioLabs, Frankfurt a.M.
dNTP Mix	PCR Grade Nucleotide Mix, dATP, dCTP, dTTP, dGTP, 10 mM each, Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
DMSO	DMSO, BioPerformance certified, USP, Hybridoma tested (CAS: 67-68-5), Sigma Aldrich, München
Agarose	SeaKem LE Agarose for gel electrophoresis, Lonza, Köln
GelRed	GelRed Nucleic Acid Gel Stain, 10,000x in water, Biotium, Hayward, CA
pUC 19 MSPI	pUC19 DNA/MSPI (HpaII) Marker, Thermo Fisher Scientific, Dreieich
6x Loading Dye	Thermo Scientific, Dreieich

Die Standardsalze Borsäure, EDTA, Essigsäure, Natriumacetat, Natrium-EDTA und Tris, sowie Ethanol und Isopropanol wurden von den Firmen SIGMA life science, Carl Roth, SIGMA-ALDRICH und VWR Chemicals Prolabo bezogen.

2.1.2 Puffer

Puffer	Zusammensetzung
TBE 1x	89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2mM EDTA
TAE 1x	40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 1mM EDTA

2.1.3 Kits

Kit	Hersteller, Ort
LightCycler480 High Resolution Melting Master	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
Agencourt AMPureXP	Agencourt Bioscience Corporation, A Beckman Coulter Company, Krefeld
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
GenomeLab DTCS-Quick Start Kit	Beckman Coulter Company, Krefeld

2.1.4 Geräte

Gerät	Bezeichnung, Hersteller, Ort
Cycler	G-Storm, Alpha Metrix Biotech, Rödermark
LightCycler	LightCycler 480, Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
Power Supply für Elektrophorese	Consort Elektrophoresis Power supply, 300V-500mA, E835, Sigma Aldrich, München
UV- und Weißlicht-Transilluminator	Biostep, Burkhardtsdorf
UV-Transilluminator	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Elektrophoresekammer (12x9,5x16 cm)	Model: 40-0708, peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Elektrophoresekammer (17x9,5x25 cm)	Model: 40-1214, peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Sequenzierer	CEQ 8000 Genetic Analysis System, Beckman Coulter Company, Krefeld
Magnetplatte	Agencourt SPRIPlate 96R, Beckman Coulter Company, Krefeld
Thermo-Schüttler	Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge groß	Centrifuge 5804, Rotor: A-2-DWP, Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Centrifuge 5417C, Rotor: FA 45-24-11, Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Thermo	Centrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg
Vakuum-Trockengerät	Concentrator 5301, Eppendorf, Rotor: F-45-48-11, Hamburg

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Material	Bezeichnung, Hersteller, Ort
Tubes 1,5 ml	Reaktion Tubes, 1,5 ml, natural, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Braune Tubes, 1,5 ml	Safe lock tubes, 1,5 ml, amber, Eppendorf, Hamburg
384 Well-Platte	Frame Star 480/ 384 with qPCR Adhesive Seal, 4titude, Berlin
96 Well-Platte	96-Well PCR Plate, non-skirted, 4titude, Berlin
Versiegelungsfolie	Easy Pierce Strong, peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
96 Well -Probenplatte	Beckman Coulter Company, Krefeld
96 Well-Pufferplatte	Beckman Coulter Company, Krefeld

2.1.6 Software

Software/ Website	Herausgeber/ URL
Primer3web version 4.0.0	Untergasser et al. (2012)
PrimerBLAST	Ye et al. (2012)
UMelt	Dwight et al. (2011)
Diseasome	Wysocki and Ritter (2011)
UCSC Genome Browser	Kent et al. (2002)
NCBI SNP database	Sherry et al. (2001)
Oligo Analyzer	http://www.idtdna.com/Scitools (26.09.2015)
Argus X1	Biostep, Burkhardtsdorf
LightCycler480 Software 1.5.0. SP3	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
Sequencer software	Genome Lab GeXP Genetic Analysis System Version 10.2
Chromas LITE Version 2.01	http://www.technelysium.com.au . (26.09.2015)
HWE calculator	http://www.tufts.edu/~mcourt01/Documents/Court%20lab%20-%20HW%20calculator.xls . (26.09.2015)
JMP 11.1.1	SAS Institute Inc., Heidelberg

2.1.7 DNA-Proben

Es lagen 434 DNA-Proben von SCA3-Patienten vor, welche im Rahmen des EuroSCA Consortiums (www.EuroSCA.org) europaweit von 2004-2008 gesammelt wurden. Die Teilnehmer haben im Rahmen dieses Projektes ausdrückliche einer Verwendung der DNA-Proben für Forschungszwecke zugestimmt. Die Ursprungs-DNA wurde mittels der Repli g-Methode (QIAGEN, Hilden) vermehrt und zu Analyse-zwecken in einem Verhältnis von 3:200 verdünnt. Die Verwendung der Proben für dieses Projekt wurde von der Ethikkommission der Universität Tübingen am 05.03.2013 mit der Bearbeitungsnummer 046/2013B02 genehmigt. Während der Etablierungsversuche wurde zudem DNA von gesunden Individuen der CEPH-Kohorte (Centre d'Etude du Polymorphisme Human) verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Design der Primer und Oligonukleotidsonden

Die nukleozytoplasmatischen Transportproteine wurden auf Grundlage der Erkenntnisse von Sowa *et al.* (Sowa *et al.*, 2018) ausgewählt, der Auswahl der Polymorphismen ging eine ausführliche Datenbank-Recherche voraus (siehe Ergebnis-Teil). Zum Primer-Design wurden die Programme Primer3web version 4.0.0 (Untergasser *et al.*, 2012) und PrimerBLAST (Ye *et al.*, 2012) unter Angabe der Standardparameter (Tab. 1) verwendet. Die Basensequenzen stammten von der Datenbank dbSNP des NCBI (Sherry *et al.*, 2001), die Primer wurden mithilfe des Oligoanalyzer (<http://www.idtdna.com/Scitools>) *in silico* hinsichtlich ihrer Neigung, Dimere oder Haarnadelstrukturen zu bilden, überprüft. Es folgte ein *in silico*-Test der PCR-Produkte mithilfe der Software uMelt (Dwight *et al.*, 2011), um das voraussichtliche Schmelzverhalten im LightCycler480 (Roche, Mannheim) zu simulieren.

Die Oligonukleotidsonden wurden mit einer Länge von 20-35 Basen designt, der Polymorphismus sollte sich mittig in der Sonde befinden. Die Anlagerungstemperatur wurde etwa 5 °C oberhalb der Primer gewählt, durch eine Blockierung des 3' Ende mit Phosphat sollte eine Elongation durch die DNA-Polymerase verhindert werden. Die Primer und Oligonukleotidsonden wurden von der Firma Metabion bezogen (Tab. 2).

Tab. 1: verwendete Standardparameter für das Primer-Design mit Primer3 und PrimerBLAST

Parameter	Wert
Länge	20 Nukleotide
Anlagerungstemperatur	60 °C
GC-Gehalt	50 %
Letzte Base	Einzelnes C oder G
Mindestabstand zum Polymorphismus	50 bp
Länge des PCR-Produktes	250 bp – max. 400 bp

Tab. 2: Sequenzen der verwendeten Primer und Oligonukleotidsonden. Diese wurden nach den beschriebenen Kriterien für die ausgewählten Polymorphismen designt und anschließend für die Etablierungsversuche verwendet. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion bezogen.

Polymorphismus	Art	Name	Sequenz (5' - 3')
rs1562308 (<i>CRM1</i> Prom308)	Forward	R292	GAGCCACCTTGCCCAGTC
		R294	CCTGAGCCACCTTGCCCA
	Reverse	R293	ACTGCTGATTCTGCTCCTGA
		R295	TGCTCCTGATTGATTTGAGGCT
Sonde	R296	AGATAAAGTCTGGGTTGCACCCCTATTT	
rs7146310 (<i>IPO4</i> mis310)	Forward	R323	CAGGCTCTGGATCTGCACAG
		R325	GAACCTCTCACTCACCCAGG
	Reverse	R324	CCATTGGTGAGGAGAGAGGC
		R326	GAGCCATTGGTGAGGAGAGA
rs11550452 (<i>IPO4</i> mis52)	Forward	R480	CTTTGGTCCCGTAGCCCA
		R482	CTGGCTGAGGAATGCTGC
	Reverse	R481	CAGTGGGAAGACAGGAGGG
		R483	GAACACCTGGCTATGGTCC
rs12809335 (<i>IPO8</i> UTR35)	Forward	R200	ATCCGGTTGAGGTCCATCTC
	Reverse	R201	GAATGGAGAGCGAGTTGTGG
rs62084683 (<i>KPNA2</i> 5UTR83)	Forward	R318	CTTGACGGGATCTGGAGTCC
		R320	CCTATGGAAACACGAACGGC
	Reverse	R319	GATTGGCTGGTTCGAGCC
		R321	CTGGTTCGAGCCTAAGCTGT
	Sonde	R322	CCAAGCCCTGTGACTCCCTCCC
rs9535343 (<i>KPNA3</i> Prom43)	Forward	R163	CCTTGGCCTGAAACTTCTCTG
		R164	TCATCATCCTTGGCCTGAAAC
	Reverse	R165	GGGAAGGTGGAGAGTGAGTC
		R166	GGTGGAGAGTGAGTCAGAGG
	Sonde	R167	AGGGGGTCTCGGGGGAGACAG
rs12868235 (<i>KPNA3</i> Prom35)	Forward	R220	TGCCCTTTTGCCTGGATCTA
		R222	CTTCACACCCAGTCCAAAGC
	Reverse	R221	CCCTGGAGGTGGTCATTTCC
		R223	AGCACCAAATTTGAGTCCCTG
rs11618521 (<i>KPNA3</i> Prom21)	Forward	R216	GGAGGGCAGATCACAAGG
		R218	CTTTCGGCCGGGTGTGGT
	Reverse	R217	ACATACCTGCTCATGTCTACCA
		R219	AAGCAAATGAAGCCCACCTG
rs2273816 (<i>KPNA3</i> In5)	Forward	R168	GAGGACACATAAAGCTGGCA
	Reverse	R169	AGGTACATTA ACTTCTGCCAGA

rs713982 (<i>RANBP1</i> Pro82)	Forward	R314	GCCGAGCGTCTCTATGATCC
		R316	CTCTATGATCCTGGCTTCTGG
	Reverse	R315	GAGGCGGACACTCTCATTGT
		R317	GCGATTCAAACCCAGTACAGC
rs34647 (<i>TNPO1</i> Ex1UTR)	Forward	R172	CGGAACAAAGAGAATCTGGGC
		R174	TGAAATGGCTGCGGAACAAA
	Reverse	R173	AGGCAGCAATTTTCCTAGCC
		R175	CAGCAATTTTCCTAGCCCCG
	Sonde	R176	GGAGCCCGCCGCGGGAACA
rs4704040 (<i>TNPO1</i> Prom40)	Forward	R180	TGTTTTCTCCCTCAGATGCT
		R183	TGTCATTCCCTAGGTGAAAGCT
	Reverse	R181	TTTTCTTTGACAGTTTGCACA
		R185	TGACAGTTTGCACATATAATAGCA
rs2426109 (<i>CSE1L</i> Prom09)	Forward	R297	ACCCTATGTGCACGACCTTG
		R299	CCAAGAGGGGCAGGAAGTTC
	Reverse	R298	TCTTTGGCTCTGACCATGCC
		R300	TGCTCTTTGGCTCTGACCAT
Sonde	R301	TCAAATGGGTCACAAGCCAGCAGCCG	
rs4794016 (<i>KPNB1</i> Prom16)	Forward	R189	GCCTGAGCCACATACTGTAT
		R191	AAGCGATCCTCCCAAAGTCC
	Reverse	R190	CAGTTCTCAACCCCGGAAGA
		R192	CATGAATGCCTTTTCTTAGCAAAAT
rs4448553 (<i>IPO13</i> Prom53)	Forward	R195	TAAATGGGCCCCTCTCCTTC
		R197	ATGCCAGCTTCCTCCATTTG
	Reverse	R196	TTAACTCCTGCCAGCTACCC
		R198	CTGTCACCCCTCCAGTTGTA
	Sonde	R199	CTTTGCACTTTTAGTTTTTCTCTTCCC

2.2.2 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Mittels PCR wurden Teile genomischer DNA exponentiell vervielfältigt, durch zwei speziell designte Primer wurde der zu vervielfältigende DNA-Bereich exakt eingegrenzt. Der Reaktionsansatz, in welchem sich DNA, Primer, Nukleotide und das Enzym DNA-Polymerase befanden, durchlief in einem Cycler mehrere Zyklen mit jeweils drei Temperaturschritten. Im ersten Schritt wurden die DNA-Doppelstränge durch Erhitzung voneinander getrennt. Im zweiten Schritt lagerten sich die Primer bei niedrigerer Temperatur an ihre komplementäre Basensequenz an einem der DNA-Stränge an und bildeten im dritten Schritt den Ansatzpunkt für die DNA-Polymerase. Diese synthetisierte anhand der DNA-Matrizen einen komplementären Einzelstrang,

beginnend bei der letzten Base des Primers. In jedem Zyklus wurden die beschriebenen Schritte für jeden DNA-Strang einmal durchlaufen, wodurch der von den Primern flankierte Abschnitt exponentiell vermehrt wurde. Um neue Primer auf ihre Funktionalität zu prüfen, wurde zunächst eine Touchdown-PCR im G Storm-Cycler (Alpha Metrix Biotech, Rödermark) durchgeführt. In einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß wurde zunächst ein Master Mix hergestellt in dem alle Substanzen außer der DNA enthalten waren, anschließend wurde dieser in einer 96 Well-Platte verteilt und die DNA zugegeben (Tab. 3). Bei einer PCR zur Etablierung verschiedener neuer Primer wurde ein Master Mix hergestellt, in dem keine Primer, jedoch bereits die DNA enthalten war. Dieser wurde dann ebenfalls auf die Wells verteilt und die Primer im Nachhinein hinzugefügt. Die Tubes und Platten wurden während der Arbeitsschritte auf Eis gelagert.

Tab. 3: verwendete Chemikalien und zugehörige Volumina für eine Touchdown-PCR im Cycler

Chemikalie	Volumen
One Taq Standard Reaktion Buffer 5x (New England BioLabs, Frankfurt a.M.)	4,0 µl
10 µM Forward Primer (Metabion, Steinkirchen)	0,8 µl
10 µM Reverse Primer (Metabion, Steinkirchen)	0,8 µl
PCR Grade Nucleotide Mix, jeweils 2 mM (Roche, Mannheim)	1,6 µl
One Taq DNA Polymerase (New England BioLabs, Frankfurt a.M.)	0,1 µl
20-50 ng DNA	1,0 µl
H ₂ O Ampuwa (Fresenius Kabi, Bad Homburg)	ad 20,0 µl

Nach dem Verschweißen der Platte mit Versiegelungsfolie wurde die Platte gevortext und eine Minute bei 1.500 rpm in der Centrifuge 5804 (Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Dann wurde das Cycler-Protokoll für eine Touchdown-PCR durchlaufen (Tab. 4). Die Temperatur für die Anlagerung der Primer wurde in den ersten zehn Zyklen nach jedem Durchlauf von 65 °C um 1 °C auf 55 °C verringert, da die optimale Temperatur für diesen Schritt primerspezifisch ist und für die designten Primer nicht sicher bekannt war. Die höhere Anlagerungstemperatur am Beginn des Touchdown-Protokolls sollte eine möglichst hohe Spezifität der Primer-Bindung an der genomischen DNA bewirken. Die niedrigere Temperatur am Ende erhöhte zwar das Risiko einer unspezifischen Primer-Bindung, da zu diesem Zeitpunkt jedoch schon spezi-

fisch amplifizierte DNA vorlag, stieg die Wahrscheinlichkeit einer korrekten Bindung jedoch wieder an. Es sollte somit gewährleistet werden, dass trotz unzureichend bekannter optimaler Anlagerungstemperatur der Primer ausreichend spezifisches PCR-Produkt amplifiziert wird.

Tab. 4: Cycler-Protokoll für eine Touchdown-PCR

Reaktionsschritt	Wiederholungen	Zeit	Endtemperatur
Initiale Denaturierung	1	4:00 min	94 °C
Denaturierung	10	0:15 min	94 °C
Annealing der Primer		0:30 min	65 °C (-1 °C/Zyklus)
Elongation		1:00 min	68 °C
Denaturierung	25	0:15 min	94 °C
Annealing der Primer		0:30 min	55 °C
Elongation		1:00 min	68 °C
Elongation	1	6:00 min	68 °C
Aufbewahrung	1	∞	10 °C

2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese (AGE)

Mit der AGE konnten DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge in einem Gel durch eine angelegte Spannung aufgetrennt und durch einen fluoreszierenden Farbstoff im UV-Licht sichtbar gemacht werden. Durch diese Methode wurde zum einen kontrolliert, ob DNA in einer PCR ausreichend und spezifisch amplifiziert werden konnte, und zum anderen, ob der amplifizierte DNA-Abschnitt der erwarteten Länge entsprach. Gearbeitet wurde mit 1,5 %igen Agarose-Gelen, als Puffer wurde 1xTBE verwendet, bei präparativen Gelen zur späteren Sequenzierung wurde 1xTAE verwendet. Dies entsprach bei kleinen Gelen (7x8 cm) 0,75 g Agarose auf 50 ml Puffer und bei großen Gelen (12x14 cm) 1,5 g Agarose auf 100 ml Puffer. Die entsprechende Agarose-Menge wurde mit dem Puffer aufgekocht, bis sich diese vollständig gelöst hatte. Anschließend wurde dem flüssigen Gel der Fluoreszenzfarbstoff GelRed (Biotium, Hayward, CA) in einer Verdünnung von 1:40.000 hinzugefügt. Das Gemisch wurde in eine Form gegossen und ein Kamm für die Geltaschen für die DNA-Proben hinzugefügt. Zum Beschweren der DNA-Proben bzw. zur besseren Sichtbarkeit der Lauffront, wurde zu den Proben das entsprechende Volumen eines 10-fachen Agarose-Ladepuffers hinzugefügt. Das fertige Gel wurde dann in eine mit Puffer gefüllte

Laufkammer gelegt, mit den Proben beladen und bei einer angelegten Spannung von 90 V bzw. 120 V für ca. 30 min laufen gelassen, bis die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte. Um die Länge der DNA-Fragmente in den Banden abschätzen zu können, wurde in die erste Geltasche 500 ng des DNA-Markers pUC 19 DNA/MSPI (Thermo Fisher Scientific, Dreieich) pipettiert. Nach der Laufzeit wurde das Gel auf dem UV-Licht-Transilluminator (Biostep, Burkhardtsdorf) abfotografiert, die Bilddatei wurde mit der Software Argus X1 (Biostep, Burkhardtsdorf) bearbeitet.

2.2.4 Genotypisierung durch High Resolution Melting (HRM)

Das High Resolution Melting stellte eine effiziente Methode dar, um eine große Anzahl von DNA-Proben gleichzeitig für die SNPs zu typisieren. Zunächst wurde eine Touchdown-PCR durchgeführt, das High Resolution Melting erfolgte direkt im Anschluss, für beides wurde der LightCycler von Roche verwendet. Für die initiale Touchdown-PCR im LightCycler wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zunächst ein Master Mix ohne DNA hergestellt. Alle Substanzen und Reaktionsgefäße wurden dabei auf Eis gelagert. Es wurde das LightCycler480 High Resolution Melting Master-Kit (Roche, Mannheim) verwendet, in diesem waren 25 mM MgCl₂, H₂O, sowie ein Melting Master Mix mit dNTPs, Puffer und dem fluoreszierenden Farbstoff ResoLight enthalten. Die optimale MgCl₂-Konzentration pro Reaktionsgemisch lag je nach Primerpaar zwischen 2,0 und 3,5 µM und wurde durch MgCl₂-Reihen ermittelt. Der Master Mix wurde in einer 384-Well-Platte verteilt und die DNA anschließend hinzugefügt (Tab. 5). Für den Fall, dass eine Oligonukleotidsonde vorlag, wurde diese ebenfalls dem Mastermix hinzugefügt. Die Konzentration des Primers, der zur Sonde komplementär war, wurde in dem Fall auf 1/10 oder 1/5 verdünnt (Tab. 6), um in einer asymmetrischen PCR die Bildung des zur Sonde komplementären Stranges zu begünstigen. Die Endkonzentrationen des verdünnten Primers im Reaktionsgemisch, sowie die der Sonde betragen entsprechend 0,2 µM (bei 1/5-Verdünnung) bzw. 0,1 µM (bei 1/10-Verdünnung). Nach dem Verschließen der Platte mit Versiegelungsfolie wurde diese für zwei Minuten bei 1.500 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die Platte im LightCycler platziert, wo das Protokoll für eine Touchdown-PCR mit anschließendem HRM durchlaufen wurde (Tab. 7).

Tab. 5: verwendete Chemikalien und zugehörige Volumina für eine symmetrische LightCycler-PCR

Chemikalie	Volumen
25 mM MgCl ₂ (Roche, Mannheim)	1,0-1,4 µl
Roche HRM Master (Roche, Mannheim)	5,0 µl
4 µM Forward Primer (Metabion, Steinkirchen)	0,5 µl
4 µM Reverse Primer (Metabion, Steinkirchen)	0,5 µl
2,5-15 ng DNA	0,5 µl
H ₂ O (Roche, Mannheim)	ad 10,0 µl

Tab. 6: verwendete Chemikalien und zugehörige Volumina für eine asymmetrische LightCycler-PCR mit Oligonukleotidsonde. In diesem Beispiel ist der Reverse-Primer komplementär zur Oligonukleotidsonde.

Chemikalie	Volumen
25 mM MgCl ₂ (Roche, Mannheim)	1,0-1,4 µl
Roche HRM Master (Roche, Mannheim)	5,0 µl
0,4 µM Forward Primer (Metabion, Steinkirchen)	0,5 µl
4 µM Reverse Primer (Metabion, Steinkirchen)	0,5 µl
10 µM Oligonukleotidsonde (Metabion, Steinkirchen)	0,5 µl
2,5-15 ng DNA	0,5 µl
H ₂ O (Roche, Mannheim)	ad 10,0 µl

Tab. 7: LightCycler-Protokoll für eine PCR mit anschließendem High Resolution Melting

Reaktionsschritt	Wiederholungen	Zeit	Endtemperatur
Initiale Denaturierung	1	10:00 min	95 °C
Denaturierung	} 45	0:10 min	95 °C
Annealing der Primer		0:15 min	65 °C (-0,5 °C/Zyklus auf 50 °C)
Elongation		0:20 min	72 °C
Denaturierung	1	1:00 min	95 °C
Annealing	1	1:00 min	40 °C
HRM	1	37:30 min	50 °C (+0,02 °C/s auf 95 °C)
Cooling	1	0:30 min	40 °C

Für das High Resolution Melting wurden die Proben auf 95 °C erhitzt, mit dem Ziel, die DNA-Doppelstränge voneinander zu trennen, damit sich diese beim anschließenden Kühlen auf 40 °C wieder zusammenlagern- und dabei die Homo- oder Heteroduplizes bilden können. Am Schluss wurden die Wells kontinuierlich von 40 °C auf 95 °C erhitzt, wobei sich die DNA-Doppelstränge langsam voneinander trennten. In dem Reaktionsgemisch befand sich unter anderem der fluoreszierende Farbstoff Reso-Light, welcher mit doppelsträngiger DNA interkaliert und nach deren Denaturierung schwächer fluoresziert. Das Fluoreszenz-Signal wurde nach jedem durchlaufenen Zyklus der PCR, sowie kontinuierlich während dem High Resolution Melting, unter Verwendung des SYBR-Green-Filters, aufgezeichnet (Abb. 4). Zur Auswertung der Messdaten wurde die LightCycler480-Software 1.5.0 verwendet. Für die Versuche mit asymmetrischer PCR und Oligonukleotidsonde wurde bei der Auswertung die Option „Melt-Curve-Genotyping“ ausgewählt, für die Amplicon Melting-Versuche die Option „Gene-Scanning“.

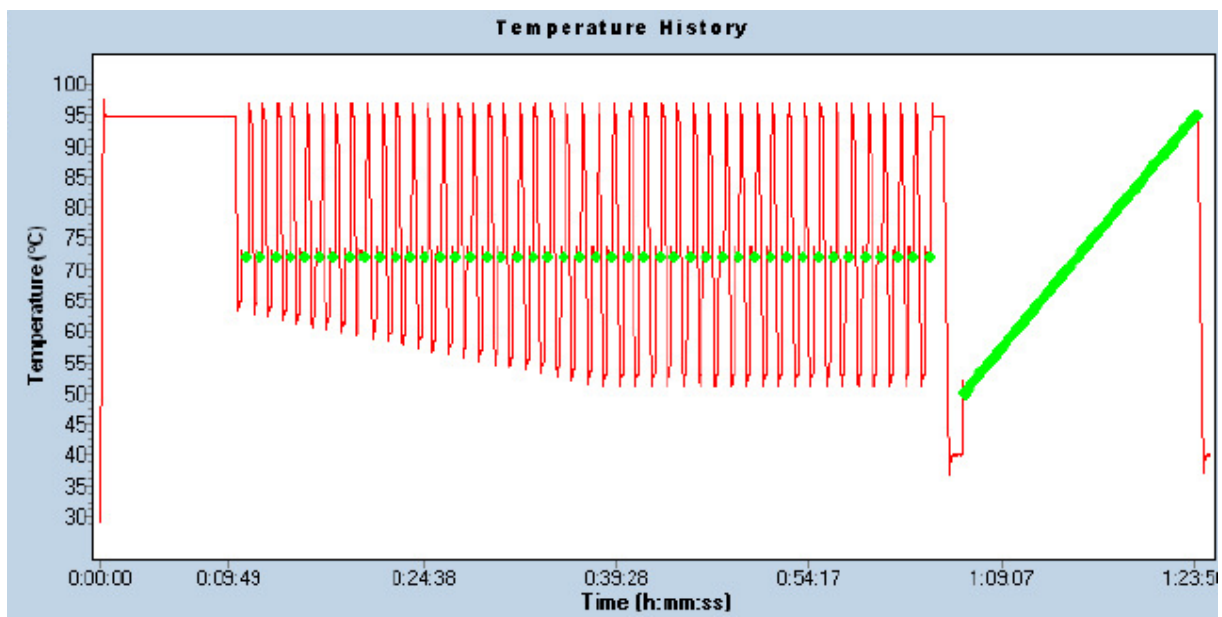


Abb. 4: Schematisch dargestellter Temperaturverlauf im LightCycler. Zunächst wurde eine normale PCR durchgeführt, anschließend folgt das High Resolution Melting (HRM). Nach jedem PCR-Zyklus und während des gesamten HRM werden die Fluoreszenz-Signale aufgezeichnet, die Messpunkte sind grün markiert.

2.2.5 DNA-Aufreinigung mit AgencourtAMPure

Um amplifizierte DNA nach einer PCR für eine Sequenzier-Reaktion verwenden zu können musste diese zunächst aus dem Reaktionsgemisch isoliert werden, insbe-

sondere sollten Primer und Nukleotide aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden. Hierfür wurde das AgencourtAMPure-Kit verwendet. In jede Probe wurde das 1,8-fache Volumen von dem AMPure-Reagenz gegeben und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. In diesem Reagenz befanden sich magnetische Beads, welche in einer Inkubationszeit von fünf Minuten die DNA-Fragmente banden. Die Platte wurde auf der SPRI-Magnetplatte von Agencourt für weitere zehn Minuten inkubiert. Nachdem sich die magnetischen Beads zusammen mit den DNA-Fragmenten vollständig an den Rand der Wells abgesetzt hatten und die restliche Lösung klar blieb, wurde der Überstand abpipettiert und verworfen, ohne dabei die ringförmigen Ablagerungen zu berühren. Es folgten zwei Waschschriffe, in denen je 200 µl 70%iger Ethanol in die Wells gegeben und nach mindestens dreißig Sekunden abpipettiert und verworfen wurde. Nachdem das gesamte Ethanol aus den Wells entfernt war, wurde die Platte für zwanzig Minuten offen auf der Magnetplatte luftgetrocknet. Um die DNA wieder von den Beads zu lösen, wurde die Platte von der Magnetplatte entfernt und die ringförmigen Ablagerungen mit der gereinigten DNA in 30 µl H₂O durch Auf- und Abpipettieren gelöst. Die Beads, welche sich nach wie vor in den Wells befanden, beeinflussten die weiteren Arbeitsschritte nicht.

2.2.6 DNA-Aufreinigung aus dem Agarosegel mit dem QIAquick Gel-Extraction Kit

Wenn in einer AGE neben der Bande mit dem erwarteten DNA-Fragment noch weitere unerwünschte Nebenbanden auftraten, gab es die Möglichkeit, mithilfe des QIAquick Gel-Extraction Kit (Qiagen, Hilden), ausschließlich die DNA aus der relevanten Hauptbande für eine Sequenzier-Reaktion zu isolieren. Für die AGE wurde ein TAE-Gel statt des üblicheren TBE-Gels verwendet. Zunächst wurde die entsprechende Hauptbande auf dem UV-Transilluminator (peqlab, Erlangen) mit einem Skalpell herausgetrennt, anschließend wurde die Extrahierung der DNA aus dem Gel nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.7 DNA-Quantifizierung mittels AGE

Für eine Sequenzier-Reaktion nach Sanger wurden pro Reaktion 50-100 fmol DNA benötigt. Das entspricht bei dsDNA-Abschnitten mit 0,2 kbp: 6,5-13 ng. Um die DNA-Konzentration im aufgereinigten PCR-Produkt grob abzuschätzen wurde daher eine

Quantifizierung mittels AGE durchgeführt. Nach der Aufreinigung des PCR-Produktes mit dem Agencourt AMPure-Kit wurden 4 µl (10 %) abpipettiert und mit 6 µl H₂O und 1 µl 10xAgarose-Ladepuffer gemischt. Nach der Aufreinigung mit dem QIAquick Gel-Extraction-Kit wurden 10 µl der aufgereinigten DNA mit 2 µl der im Kit enthaltenen Loading Dye gemischt (jeweils nach Angaben des Herstellers). Die DNA wurde anschließend mittels AGE als Bande dargestellt. Auf dem Bild wurde die Intensität der DNA-Bande mit der des DNA-Markers pUC19 DNA/MSPI verglichen und ins Verhältnis gesetzt (Abb. 5). Die DNA-Konzentration in den Banden des DNA-Markers waren vom Hersteller angegeben, die DNA-Konzentration in dem aufgereinigten PCR-Produkt wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Konzentration DNA} \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right) = \text{geschätztes Verhältnis} \times \text{Konzentration pUC} \left(\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right)$$

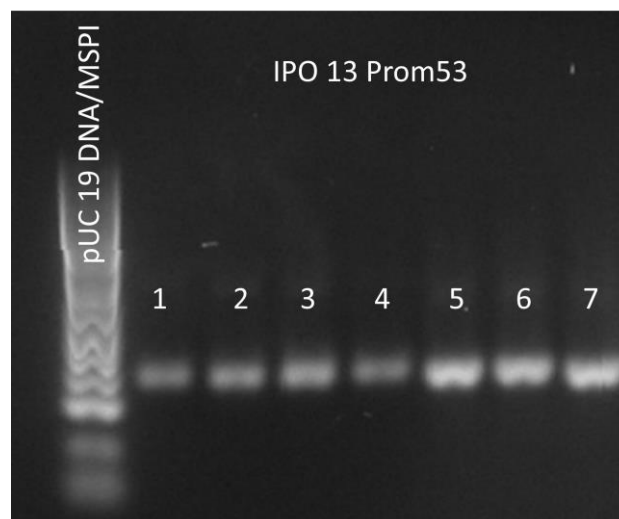


Abb. 5: Beispiel einer AGE zur Ermittlung der DNA-Konzentration nach einer Aufreinigung. Es handelte sich um eine PCR für den Polymorphismus *IPO13*, die Proben 1-7 sind verschiedene Patienten-DNA-Proben. Die Verhältnisse wurden in diesem Fall geschätzt auf 2/3xpUC (1-4) bzw. 1xpUC (5-7). Die DNA-Konzentration des Markers pUC wurde vom Hersteller angegeben, somit konnte die DNA-Konzentration der aufgereinigten Patientenproben mittels Verhältnisgleichung bestimmt werden.

2.2.8 Sequenzier-Reaktion nach Sanger

Die Sequenzier-Reaktion mittels Kettenabbruch-Methode wurde 1977 von Sanger *et al.* beschrieben (Sanger *et al.*, 1977). Sie ähnelte einer PCR, mit den Unterschieden, dass nur ein Primer (Forward oder Reverse) eingesetzt wurde und dass in dem Reaktionsansatz sowohl dNTPs also auch fluoreszenzmarkierte ddNTPs enthalten waren. Diese führten nach ihrem Einbau in die DNA durch die Polymerase zu einem

Kettenabbruch. Es wurde der Primer mit dem jeweils größeren Abstand zum Polymorphismus ausgewählt. Für die Sequenzier-Reaktion wurde das GenomeLab DTCS-Quick Start Kit (Beckman Coulter, Krefeld) verwendet. In dem darin enthaltenen DTCS Master Mix befanden sich alle weiteren benötigten Substanzen wie Puffer, DNA-Polymerase, dNTPs, fluoreszenzmarkierte ddNTPs und MgCl₂. Die Reagenzien wurden während der Pipettierschritte auf Eis gelagert. Es wurde zunächst ein Master Mix aus DTCS und Primern hergestellt und in die Wells einer 96-Well-Platte verteilt. Die benötigte DNA-Menge sowie die entsprechende Wassermenge wurden am Schluss hinzugegeben (Tab. 8). Anschließend durchliefen die Proben das Cyclex-Protokoll für eine Sequenzier-Reaktion (Tab. 9), die Proben wurden danach bei 4 °C lichtgeschützt aufbewahrt.

Tab. 8: benötigte Chemikalien und Volumina pro Ansatz für eine Sequenzier-Reaktion

Chemikalie	Volumen
50-100 fmol aufgereinigte DNA	0-5,5 µl
10 µM Primer (Metabion, Steinkirchen)	0,5 µl
DTCS Quick Start Master Mix (Beckman Coulter, Krefeld)	4 µl
H ₂ O Ampuwa (Fresenius Kabi, Bad Homburg)	ad 10 µl

Tab. 9: Cyclex-Protokoll für eine Sequenzier-Reaktion

Reaktionsschritt	Wiederholungen	Zeit	Endtemperatur
Denaturierung	} 30	0:20 min	96 °C
Annealing der Primer		0:20 min	50 °C
Elongation		4:00 min	60 °C
Aufbewahrung	1	∞	4 °C

2.2.9 Ethanol-Fällung

Die Ethanol-Fällung diente der Aufreinigung der DNA aus der Sequenzier-Reaktion für die Fragmentanalyse. In sämtlichen Arbeitsschritten wurden die Reaktionsgefäße auf Eis gelagert. Es wurden zunächst 5 µl Stop-Solution pro Ansatz hergestellt, diese bestand aus 2 µl 3 M Na-Acetat, 2 µl 0,1 M Na₂EDTA und 1 µl 20 mg/ml Glycogen (im GenomeLab DTCS-Quick Start Kit enthalten). Jeweils 5 µl Stop-Solution wurden in ein 1,5 ml lichtundurchlässiges Reaktionstube gegeben, dann wurden die 10 µl DNA aus der Sequenzier-Reaktion hinzugefügt. Es folgten drei Zentrifugationsschrit-

te in der Thermo-Zentrifuge bei 4 °C und 13.400 rpm, jeweils nach Zugabe einer bestimmten Menge eisgekühlten Ethanol (-20 °C). Bei Schritt 1 handelte es sich um die Ethanol-Fällung, bei den Schritten 2 und 3 um Waschschriffe (Tab. 10). Die Zugabe des Ethanol erfolgte jeweils unmittelbar vor der Zentrifugation. Nach jedem Schritt wurde der Überstand vorsichtig abgegossen und nach dem letzten Schritt vollständig abpipettiert, ohne das Pellet, welches durch die Zentrifugation am Boden des Reaktionsgefäßes entstanden war, zu beschädigen. Das Pellet wurde anschließend für zehn Minuten bei 30 °C getrocknet und in 40 µl Sample Loading Solution (im GenomeLab DTCS-Quick Start Kit enthalten) resuspendiert. Es folgte eine Inkubationszeit von mind. einer Stunde bei 4 °C, bis das gesamte Pellet in Lösung gegangen war.

Tab. 10: Die für eine Ethanol-Fällung erforderlichen Volumina und Konzentrationen von eisgekühltem Ethanol (-20 °C) mit anschließender Zentrifugationszeit bei 4 °C und 13.400 rpm

Schritt	Zugabe von	Zentrifugationszeit
1 – Ethanol-Fällung	60 µl 95 % Ethanol	30 min
2 - Waschschriff	200 µl 70 % Ethanol	15 min
3 - Waschschriff	200 µl 70 % Ethanol	15 min

2.2.10 Fragmentanalyse

Sanger *et al.* beschrieben 1978 die Methode der Auftrennung der DNA-Fragmente aus der Kettenabbruch-Methode mittels Acrylamid-Gelelektrophorese (Sanger and Coulson, 1978). Die hier durchgeführte Fragmentanalyse beruhte auf diesem Grundprinzip, es wurde der Sequencer CEQ 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, Krefeld) verwendet. Die vollständig gelösten Proben aus der Ethanol-Fällung wurden in eine Probenplatte pipettiert und mit je einem Tropfen Mineralöl (im GenomeLab DTCS-Quick Start Kit enthalten) überschichtet. Die entsprechenden Wells der zugehörige Pufferplatte wurden bis ca. 1 mm unterhalb des Randes mit Running Buffer (im GenomeLab DTCS-Quick Start Kit enthalten) gefüllt. Die beiden beladenen Platten wurden in den Sequencer gestellt, in welchem sie das Sequenzierprogramm durchliefen. Dabei wurden die aufbereiteten Proben durch Kapillargelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Die unterschiedlich langen DNA-Fragmente waren durch die zuvor beschriebene Sequenzier-Reaktion nach Sanger entstanden. Durch den zufälligen Einbau der floureszenzmarkierten ddNTPs wurde an den neu syntheti-

sierten DNA-Strängen an unterschiedlichen Stellen ein Kettenabbruch herbeigeführt. Jede der vier Basen war mit einem Fluoreszenzsignal unterschiedlicher Wellenlänge markiert. Es lagen in den aufbereiteten Proben somit DNA-Fragmente von 1 bp bis zur gesamten Länge des DNA-Fragments vor, mit jeweils einem fluoreszenzmarkiertem ddNTP am Ende. Im Sequencer wurden nach der Auftrennung der Fragmente die Fluoreszenzsignale der markierten ddNTPs detektiert und aufgezeichnet. Die Reihenfolge der Signale entsprach demnach der Basenabfolge der aufbereiteten DNA-Einzelstränge. Die Rohdaten wurden mithilfe der Software Genome Lab GeXP Genetic Analysis System Version 10.2, sowie Chromas LITE Version 2.01, ausgewertet. Die Programme berechneten für jedes Signal einen Peak und zeichneten diese hintereinander auf (Abb. 6).

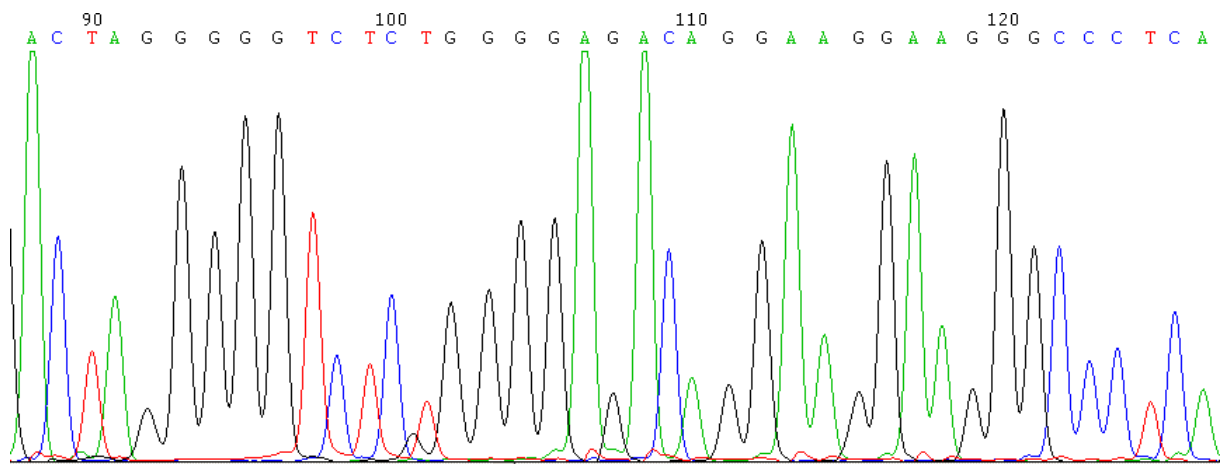


Abb. 6: Beispiel einer durch Sanger Sequenzierung ermittelten Basenabfolge um den Polymorphismus *KPNA3 Prom43*.

2.2.11 Testen der Typisierungsergebnisse auf Vereinbarkeit mit dem Hardy Weinberg-Gesetz (HWE)

Als Kontrolle für die Plausibilität der Genotypisierung durch HRM wurden die Ergebnisse auf Vereinbarkeit mit dem HWE überprüft. Das HWE beschreibt mathematisch die Verteilung von Homozygoten und Heterozygoten in der Gesamtheit eines Genpools, für den Fall, dass zwei Allele existieren. Die Hardy-Weinberg-Formel lautet $1=p^2+2pq+q^2$, p und q bezeichnen die Allelfrequenzen. p^2 entspricht demnach der Frequenz der Homozygoten für das Allel p, $2pq$ der Frequenz der Heterozygoten und q^2 der Frequenz der Homozygoten für das Allel q. In einer zufälligen Stichprobe sollte diese Verteilung ebenso zutreffen wie in der Grundgesamtheit. Es wurde das online

frei verfügbare Programm „HWE-calculator program“, abgerufen von der Website der Tufts University, verwendet (<http://www.tufts.edu/~mcourt01/Documents/Court%20lab%20%20HW%20calculator.xls>), welches nach Eingabe der beobachteten Verteilung von Homozygoten und Heterozygoten mittels Chi-Quadrat-Test bestimmte, ob die Allelfrequenzen mit dem HWE vereinbar waren (Abb. 7). War der berechnete P-Wert geringer als 0,05, so waren die ermittelten Häufigkeiten nicht mit dem HWE vereinbar.

A simple calculator to determine whether observed genotype frequencies are consistent with Hardy-Weinberg equilibrium

Genotypes	Observed #	Expected #
Homozygote reference:	216	212,8
Heterozygote:	142	148,3
Homozygote variant:	29	25,8
	^Put your values here^	
Var allele freq:	0,26	

$X^2 = 0,702748756$
 X^2 test P value = **0,401862** with 1 degree of freedom.

1. If $P < 0.05$ - not consistent with HWE.
2. Not accurate if <5 individuals in any genotype group.

Michael H.
Court
(2005-2008)

Abb. 7: Online frei verfügbares Programm „HWE-calculator program“, welches in diesem Fall von der Internetseite der Tufts University bereitgestellt wurde. Bei Eingabe der beobachteten Genotypen wurde mittels Chi-Quadrat-Test geprüft, ob diese mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz vereinbar sind.

2.2.12 Statistische Auswertung

Die deskriptive Statistik, sowie die Kovarianzanalyse wurden mit der Software SAS JMP Version 11.1.1 durchgeführt. Bei der Kovarianzanalyse ging die Anzahl der CAG-Wiederholungen im langen *ATXN3*-Allel als kontinuierlicher Einflussfaktor und die Gruppenzuordnung der Polymorphismen als nominaler Einflussfaktor auf das Erkrankungsalter ein. Sämtliche Datensätze, die leere Felder enthielten, wurden gelöscht. Für die Kovarianzanalyse wurden alle Patienten, die Mitglieder derselben Familie waren, als ein Individuum zusammengefasst, indem der Kehrwert der Mit-

gliederzahl einer Familie für jedes Individuum als Gewichtungsfaktor „frequency“ mit einbezogen wurde. Auf diese Weise sollten Beeinflussungen der Ergebnisse durch Familienzusammengehörigkeit ausgeschlossen, aber dennoch alle ermittelten Genotypen in der Auswertung berücksichtigt werden. Es wurde für jeden Polymorphismus ein lineares Regressionsdiagramm berechnet, in welchem für jede der drei möglichen Genotypen das Erkrankungsalter über die Anzahl der CAG-Wiederholungen dargestellt wurde. Die Regressionsgeraden konnten sich nur in ihrem Schnittpunkt mit der y-Achse, nicht in ihrem Anstieg unterscheiden. Ein unterschiedlicher Kurvenanstieg würde sonst zu einer biologisch nicht erklärbaren Kreuzung der drei Geraden führen. Zur Prüfung der Einflüsse der Polymorphismenvarianten auf das Erkrankungsalter wurde in dem Unterpunkt „Effekttest“ ein p-Wert berechnet, welcher die Wahrscheinlichkeit anzeigte, dass die Nullhypothese zutrifft, also die Variablen keinen Einfluss auf das Erkrankungsalter haben. Das Signifikanzniveau wurde auf 5 % festgelegt. Es wurde zudem für jedes Modell der Wert R^2 berechnet, welcher den Anteil der Variabilität des Erkrankungsalters anzeigt, der durch das angewendete Modell erklärt werden kann.

3 Ergebnisse

In der Pathogenese der SCA3 spielt die intrazelluläre Lokalisation des mutierten Ataxin-3 eine wichtige Rolle. Bichelmeier *et al.* bewiesen, dass die Lokalisation von Ataxin-3 im Zellkern obligat für die Ausbildung der typischen Krankheitssymptome bei SCA3-Mäusen ist (Bichelmeier *et al.*, 2007). Das Karyopherin KPNA3 ist am nukleozytoplasmatischen Transport von Ataxin-3 entscheidend beteiligt. Eine Modulation der Expression von *KPNA3*, sowie der Transportproteine *IPO13* und *CRM1* zeigte einen deutlichen Einfluss auf den Krankheitsverlauf im SCA3-Drosophila- und Mausmodell (Sowa *et al.*, 2018). Daraus folgend ergab sich die Frage für diese Arbeit: wird der Krankheitsverlauf von SCA3 auch beim Menschen durch eine veränderte Expression nukleozytoplasmatischer Transportproteine wie *KPNA3*, *IPO13* und *CRM1* beeinflusst? Eine veränderte Expression der Transportproteine könnte z.B. durch Polymorphismen im Promotorbereich der entsprechenden Gene verursacht werden, der Region eines Gens an der Transkriptionsfaktoren binden. Es wurden somit Polymorphismen aus den Promotorregionen hinsichtlich ihres Einflusses auf das Erkrankungsalter von SCA3 beim Menschen untersucht. In die Fragestellung wurden zunächst auch Polymorphismen eingeschlossen, die einen Aminosäureaustausch im Protein bewirken oder in Studien eine Assoziation zu neurologischen Erkrankungen gezeigt haben.

3.1 Fünfzehn Polymorphismen wurden für die weitere Analyse ausgewählt

Um Polymorphismen zu identifizieren, die für die weitere Analyse geeignet waren, wurde zunächst eine Recherche mithilfe der Websites Diseaseome (Wysocki and Ritter, 2011), UCSC genome browser (Kent *et al.*, 2002) und NCBI SNP-database (Sherry *et al.*, 2001) durchgeführt. Die Promotor-Polymorphismen sollten sich dabei im Bereich vom Beginn der 5' untranslatierten Region (5' UTR) bis max. 3000 bp vom 5'-Ende des entsprechenden Gens entfernt befinden, sofern dort nicht bereits das nächste Gen begonnen hat. Standen mehrere geeignete Polymorphismen für ein Gen zur Auswahl, wurden Polymorphismen bevorzugt, die sich näher am Transkriptionsstart des Gens befanden. Es wurde dann überprüft, ob die Allelfrequenz des seltener vorkommenden Allels in europäischen Populationen über 10 % lag und ob diese durch größere Sequenzier-Projekte wie 1000 genomes (Genomes Project *et al.*, 2010) oder HapMap (International HapMap, 2003) bestätigt worden waren. Somit

sollte gewährleistet werden, dass die Polymorphismen in der vorhandenen Gruppengröße auffindbar waren und dass es sich um einen bestätigten Polymorphismus handelte. Durch dieses Auswahlverfahren wurden fünfzehn geeignete SNPs identifiziert (Tab. 11), davon befanden sich zwölf im Promotorbereich bzw. im 5'-untranslatierten Bereich (5' UTR), zwei in einem Exon im kodierenden Bereich mit der Folge eines Aminosäureaustausches und einer in einem Intron. Der Polymorphismus rs2273816 in Intron 9 von *KPNA3* zeigte in einer Studie von Morris *et al.* eine Assoziation zur Schizophrenie und wurde daher eingeschlossen (Morris *et al.*, 2012).

Tab. 11: Gene und zugehörige Polymorphismen, die nach den beschriebenen Kriterien für die weitere Analyse ausgewählt wurden. Bei den SNP-Bezeichnungen handelt es sich um die verwendeten Arbeitsnamen, die offiziellen Codes sind im Material- und Methodenteil (Tab. 2) angegeben. Die unterschiedlichen Angaben für den Lagebezug zum Gen beziehen sich auf die verschiedenen bekannten Isoformen.

Gen	Lage im Genom	SNP	Lagebezug des SNP zum Gen
<i>CRM1</i>	Chr 2 p15	Prom308	3,0 kbp- / 3,1 kbp- / 4,2 kbp 5' von Exon 1
<i>IPO4</i>	Chr 14 q12	mis310	Exon 16 (Missense, A→V)/ 3' UTR
		mis52	Exon 17 (Missense, P→A/ P→S)/ 3' UTR
<i>IPO8</i>	Chr 12 p11	UTR35	5' UTR/ 18,6 kbp 5' von Exon 1
<i>KPNA2</i>	Chr 17 q24	5UTR83	5' UTR/ 350 bp 5' von Exon 1
<i>KPNA3</i>	Chr 13 q14	Prom43	2947 bp 5' von Exon 1
		Prom35	2693 bp 5' von Exon 1
		Prom21	1094 bp 5' von Exon 1
		In5	Intron 9
<i>RANBP1</i>	Chr 22 q11	Pro82	130bp- / 250 bp 5' von Exon 1/ Intron 1
<i>TNPO1</i>	Chr 5 q13	Ex1UTR	5'UTR/ >30 kbp 5' von Exon 1
		Prom40	1650 bp- / >30 kbp 5' von Exon 1
<i>CSE1L</i>	Chr 20 q13	Prom09	156 bp- / 222 bp 5' von Exon 1
<i>KPNB1</i>	Chr 17 q21	Prom16	940 bp 5' von Exon 1
<i>IPO13</i>	Chr 1 p34	Prom53	890 bp 5' von Exon 1

3.2 Primer-Design für das Etablierungsverfahren

Nach der Bestimmung der geeigneten Polymorphismen wurden im nächsten Schritt Reaktionsbedingungen für eine LightCycler PCR ermittelt, um eine Genotypisierung mittels HRM durchführen zu können. Zunächst wurden daher für jeden SNP nach Empfehlung des Herstellers je ein bis zwei Primer-Sets entworfen. Zum Primer-Design wurden die Programme Primer3web version 4.0.0 (Untergasser *et al.*, 2012)

und Primer-BLAST (Ye et al., 2012) unter Angabe der Standardparameter (Länge: 20 Nukleotide, Anlagerungstemperatur: 60 °C, GC-Gehalt: 50 %) verwendet. Wenn möglich sollte kein Primer in einer repetitiven Sequenz liegen und die letzte Base war idealerweise ein einzelnes C oder G. Forward- und Reverse-Primer sollten in diesen Punkten ähnliche Eigenschaften besitzen. Die Sequenzen der entsprechenden Abschnitte wurden von der Datenbank dbSNP des NCBI (Sherry et al., 2001) bezogen. Damit die Polymorphismen möglichst mittig im späteren PCR-Produkt liegen, wurde zwischen Primer und Polymorphismus jeweils ein Mindestabstand von 50 bp belassen. Nach Empfehlung des Herstellers des verwendeten LightCycler-Systems (Roche, Mannheim), wurde die maximale Fragmentlänge des PCR-Produktes auf 400 bp festgelegt, idealerweise betrug diese jedoch weniger als 250 bp. Die von Primer3 und PrimerBLAST vorgeschlagenen Primer wurden mithilfe des OligoAnalyzer Tools von IDT (<https://eu.idtdna.com>) *in silico* hinsichtlich ihrer Neigung, Dimere oder Haarnadelstrukturen zu bilden, überprüft und aussortiert. Die zu erwartenden PCR-Produkte der Primerpaare wurden dann mithilfe der Software uMelt (Dwight et al., 2011) auf ihr voraussichtliches Schmelzverhalten bei der HRM-Analyse im LightCycler480 (Roche, Mannheim) getestet. Die Primerpaare, deren PCR-Produkte in der HRM-Analyse eine eingipflige Schmelzkurve aufwiesen, und demnach keine inhomogenen Schmelzdomänen mit abschnittsweise hohem TA- bzw. GC-Gehalt besaßen, wurden bevorzugt (Abb. 8).

Neben der Genotypisierung mittels normaler HRM-Analyse wurden auch Versuche einer Genotypisierung mithilfe von Oligonukleotidsonden durchgeführt. Dafür wurden Oligonukleotide einer Länge von 20-35 Basen entworfen in deren Mitte sich der Polymorphismus befand. Damit diese die PCR nicht behindern, wurden sie entsprechend designt, dass die Anlagerungstemperatur etwa 5 °C oberhalb der der Primer lag. Das 3' Ende wurde durch Phosphat geblockt, um eine Elongation durch die DNA-Polymerase zu verhindern. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion bezogen. Somit standen für jeden Polymorphismus mindestens ein Primerpaar zur weiteren Etablierung zur Verfügung (Tab. 2).

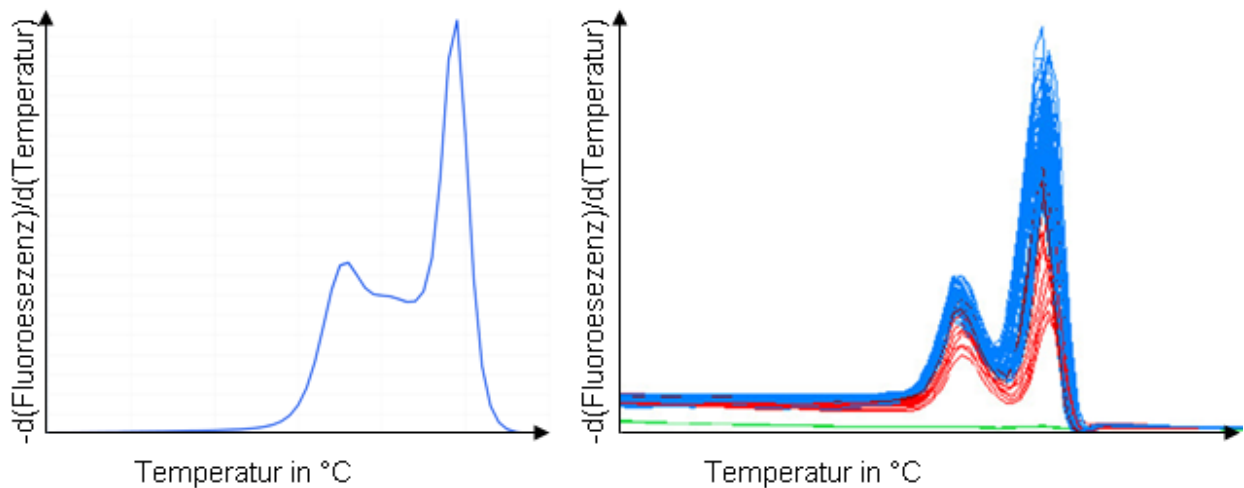


Abb. 8: Vergleich der Schmelzkurven der Melt Curve Genotyping-Analyse im LightCycler *in silico* (links) mit der tatsächlichen Kurve (rechts). Verwendet wurden die Primer *KPNA3* Prom43 R163 und R165. Die *in silico*-Analyse wurde mithilfe der Software uMelt durchgeführt. Sie diente zur Auswahl der Primer beim Primer-Design, es wurden Schmelzkurven mit möglichst wenigen Gipfeln bevorzugt.

3.3 Fünf Polymorphismen wurden erfolgreich für die LightCycler-PCR etabliert

Um eine Genotypisierung mittels High Resolution Melting durchführen zu können, mussten zunächst stabile PCR-Bedingungen hergestellt werden. Die Primer wurden daher auf Funktionalität und Spezifität getestet. Die Versuche zur Primer-Auswahl wurden im Cycler von Alpha Metrix Biotech durchgeführt, mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese (AGE). Auf dem Agarosegel sollte pro Primerpaar eine einzelne spezifische Bande zu sehen sein, die der erwarteten Größe des PCR-Produktes entsprach. Die Größe des PCR-Produktes wurde anhand des DNA-Markers pUC19 DNA/MspI (Thermo Fisher Scientific, Dreieich) bestimmt (Abb. 9). Die Reaktionsansätze wurden zunächst nach dem Standardprotokoll hergestellt, das im Methodenteil beschrieben ist (Tab. 3, Tab. 4). Wenn keine Amplifikation im Cycler erreicht werden konnte, wurden Optimierungsversuche mittels Zugabe von DMSO oder durch Konzentrationserhöhungen von Primern oder DNA durchgeführt. Dieses Vorgehen wurde ebenfalls für die Etablierungsversuche asymmetrischer PCRs für die Versuche der Genotypisierung mittels Oligonukleotidsonde verwendet. Im nächsten Schritt wurde mit den geeigneten Primern eine LightCycler-PCR mit anschließender HRM-Analyse und AGE durchgeführt. Zunächst wurde wieder ein Standardprotokoll verwendet (Tab. 5, Tab. 7). Zur weiteren Optimierung wurden MgCl₂-Testreihen mit aufsteigenden MgCl₂-Konzentrationen (1,0 - 3,5 mM) in den Reaktionsansätzen durchgeführt.

Durch das beschriebene Vorgehen gelang es bei fünf Polymorphismen, Bedingungen für eine LightCycler PCR zu etablieren (Tab. 12). Insgesamt zeigte sich, dass in PCRs mit asymmetrischen Primer-Verhältnissen weniger PCR-Produkt entstand als in symmetrischen PCRs. Die Primer, die in den folgenden Schritten nicht verwendet wurden, führten in den Etablierungsversuchen entweder zu keiner- oder einer unspezifischen Amplifikation, oder sie ergaben in der HRM-Analyse eine zur Genotypisierung ungeeignete Schmelzkurve. Mit den ermittelten optimalen Reaktionsbedingungen wurde im nächsten Schritt die Genotypisierung der gesamten Patienten-DNA-Proben durchgeführt.

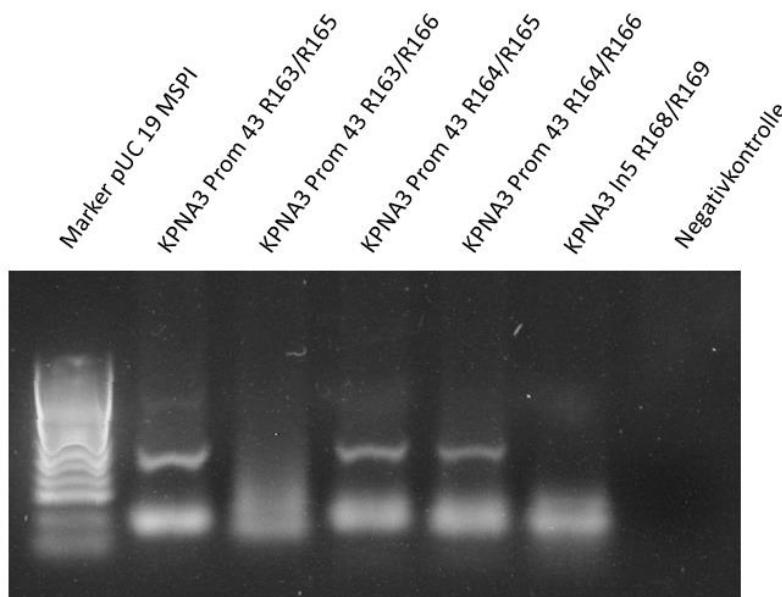


Abb. 9: Agarose-Gelelektrophorese einer PCR nach dem Standardprotokoll. Es wurde die Spezifität der Primer R163+R166 und R168+R169 für die Polymorphismen *KPNA3 Prom43* und *KPNA3 In5* getestet. Die Primerpaare, bei denen eine einzelne Bande klar erkennbar war, wurden für die weiteren Etablierungsschritte verwendet. Der DNA-Marker pUC diente zur Größenbestimmung des DNA-Fragments.

Tab. 12: SNPs, für die erfolgreich Bedingungen für eine LightCycler PCR hergestellt werden konnten mit den verwendeten Primerpaaren und $MgCl_2$ -Konzentrationen. Die optimalen $MgCl_2$ -Endkonzentration im Reaktionsansatz wurde durch Testreihen ermittelt.

Polymorphismus	Primerpaar	$MgCl_2$-Endkonzentration
<i>IPO13</i> Prom53	R197/R198	2,5 mM
<i>KPNA3</i> Prom43	R163/R165	2,5 mM (Ausnahme: 3,5 mM bei Probenplatte „TUE I“)
<i>KPNA3</i> Prom35	R220/R221	2,5 mM
<i>KPNA3</i> In5	R168/R169	3,0 mM
<i>CRM1</i> Prom308	R292/R295	2,5 mM

3.4 Das Amplicon Melting eignete sich am besten zur Genotypisierung

Mit den ermittelten Reaktionsbedingungen wurden im weiteren Verlauf die Schmelzkurvenanalysen im LightCycler zur Genotypisierung der Patienten-DNA-Proben durchgeführt. Das Signal für die Schmelzkurven entstand durch den Fluoreszenzfarbstoff Resolight, welcher sich im Master Mix für die LightCycler PCR befand. Dieser fluoresziert, solange doppelsträngige DNA vorhanden ist, da er mit dieser interkaliert. Beim Aufschmelzen der DNA-Stränge während der Temperaturerhöhung wurde demnach das Signal schwächer. Während der HRM-Analyse wurde das Signal des Farbstoffes kontinuierlich aufgezeichnet, mithilfe der LightCycler480-Software 1.5.0 wurden aus den Werten des Fluoreszenzsignals und der Temperatur entsprechende Schmelzkurven berechnet. Es standen zwei Analysen zur Verfügung - die Melt Curve Genotyping-Analyse zur Genotypisierung mittels Oligonukleotidsonde und die Gene Scanning-Analyse zur Genotypisierung mittels Amplicon Melting.

Bei der Melt Curve Genotyping-Analyse wurde von der LightCycler-Software der Quotient aus der negativen ersten Ableitung des Fluoreszenzsignals und der ersten Ableitung der Temperatur gebildet und gegen die Temperatur aufgetragen. Es entstanden charakteristische Melting Peaks, die den zuvor mit uMelt berechneten entsprachen (Abb. 8). Die Genotypisierung von SNPs wird bei dieser Methode mithilfe einer asymmetrischen PCR und der Zugabe einer Oligonukleotidsonde vorgenommen. Anhand der charakteristischen Schmelzkurven, die durch das Abschmelzen der Oligonukleotidsonde vom überexprimierten DNA-Strang (Excess Strand) entstehen, ist eine Genotypisierung von SNPs möglich (Zhou et al., 2004).

Bei der Gene Scanning-Analyse wurde das relative Fluoreszenzsignal gegen die Zeit aufgetragen und die Ausgangs- und Endwerte sämtlicher Proben auf 100 % bzw. 0 % normalisiert. Es entstanden jeweils drei charakteristische Kurvenscharen pro SNP, wodurch auf eine Zusammengehörigkeit im Genotyp geschlossen werden konnte. (Abb. 12). Um den Kurvenscharen ihren entsprechenden Genotyp zuzuordnen zu können, wurden aus jeder Schar einzelne Proben ausgewählt und für den entsprechenden Abschnitt sequenziert (Abb. 12). Für die Gene Scanning-Analyse waren keine Oligonukleotidsonden und keine asymmetrische PCR notwendig.

In den durchgeführten Versuchen zur Genotypisierung mittels Oligonukleotidsonde war es nur möglich, Schmelzkurven erzeugen, die durch das Abschmelzen der PCR-

Produkte voneinander entstanden (Abb. 10). Zur Genotypisierung waren jedoch Kurven notwendig, die durch das Abschmelzen der Oligonukleotidsonde vom Excess Strand entstehen. Aus diesem Grund waren die Versuche in dieser Arbeit nicht für eine Typisierung der Patienten DNAs geeignet.

Bei den Amplicon Melting-Versuchen zeigten sich hingegen klar unterscheidbare Kurvenscharen, die in den überwiegenden Fällen eine eindeutige Zuordnung eines Patienten zu einem Genotyp ermöglichte (Abb. 11). Aufgrund dessen wurde im weiteren Verlauf auf die Versuche einer Genotypisierung mittels Oligonukleotidsonde verzichtet und die Typisierung der Patienten-DNA-Proben ausschließlich mit der Amplicon Melting-Methode durchgeführt.

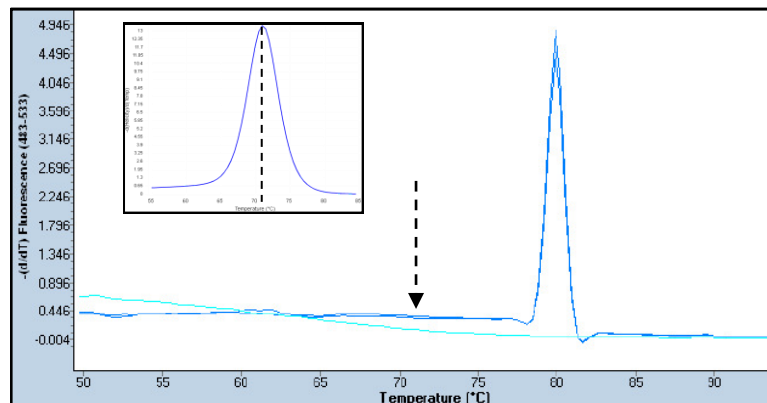


Abb. 10: Melt Curve Genotyping-Analyse für den Polymorphismus *CRM1* Prom308 mit asymmetrischer PCR und Oligonukleotidsonde. Im kleinen Bild ist die von uMelt berechnete Schmelzkurve für die Oligonukleotidsonde R296 abgebildet. Es wäre ein Peak bei 71 °C zu erwarten. In der tatsächlichen LightCycler Analyse (großes Bild) ist bei 71 °C jedoch kein Peak zu erkennen (Pfeil). Der große Peak bei 80 °C entstand durch das Abschmelzen der Duplizes voneinander und ist nicht geeignet zur Genotypisierung.

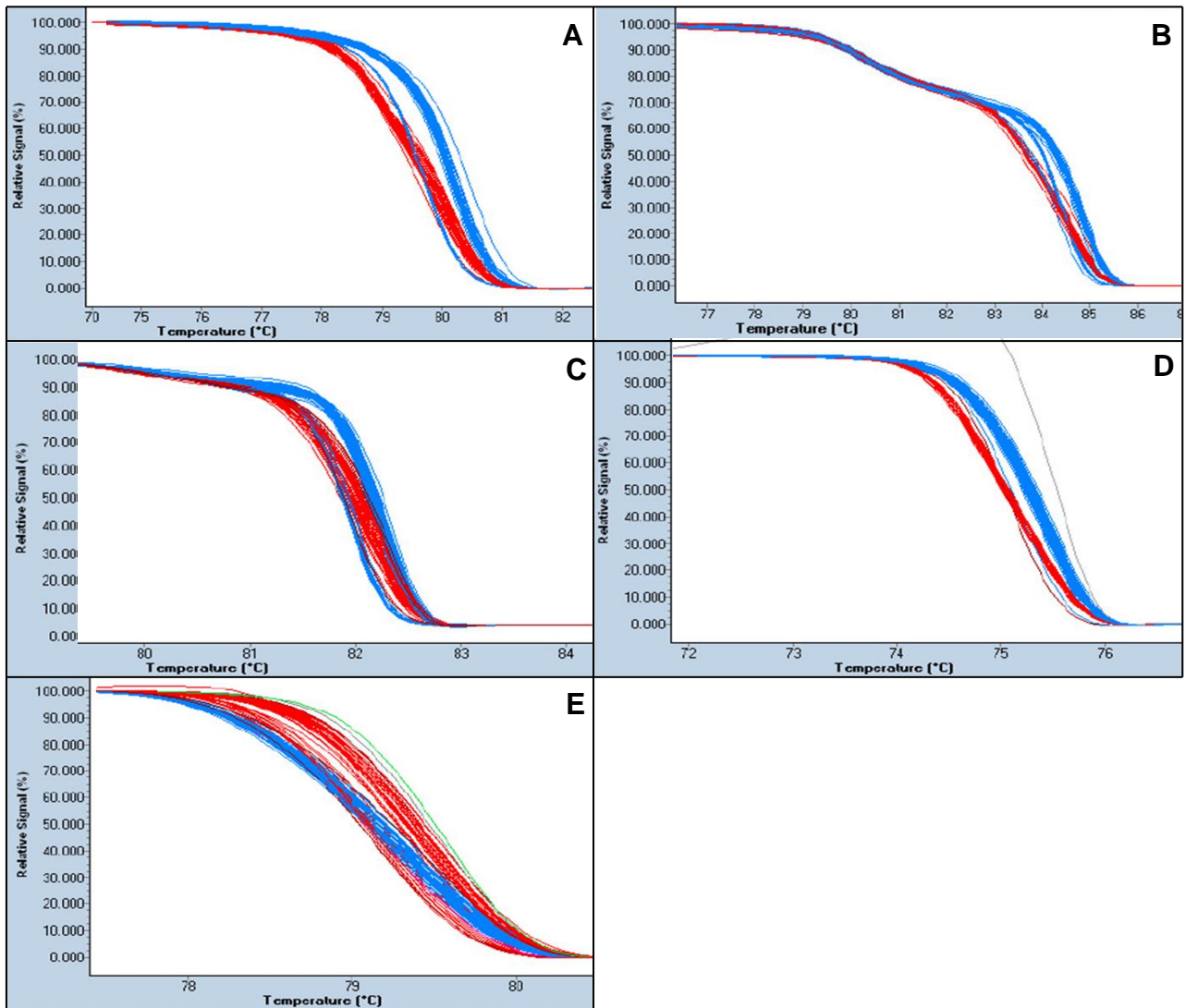


Abb. 11: Kurvenscharen der Gene-Scanning-Analysen im LightCycler. Abgebildet sind die Bilder der Gene-Scanning-Analysen einer Patienten-Probenplatte für die untersuchten Polymorphismen *IPO13* Prom53 (A), *KPNA3* Prom43 (B), *KPNA3* Prom35 (C), *KPNA3* In5 (D) und *CRM1* Prom308 (E). Für die Analyse wurde der LightCycler von Roche verwendet. Es wurde zunächst eine PCR durchgeführt, anschließend folgte das High Resolution Melting und die Auswertung der Daten mittels Gene-Scanning-Analyse der LightCycler Software. Jede einzelne Kurve stellt einen Patienten dar, die Zugehörigkeit einer Kurve zu einer der drei Kurvenscharen ermöglicht die Zuordnung zu einem Genotyp. Die Kurvenschar, die die heterozygoten DNAs zusammenfasst, wurde von der LightCycler Software jeweils in einer anderen Farbe hervorgehoben, somit ist eine eindeutige Zuordnung der überwiegenden Probenanzahl möglich.

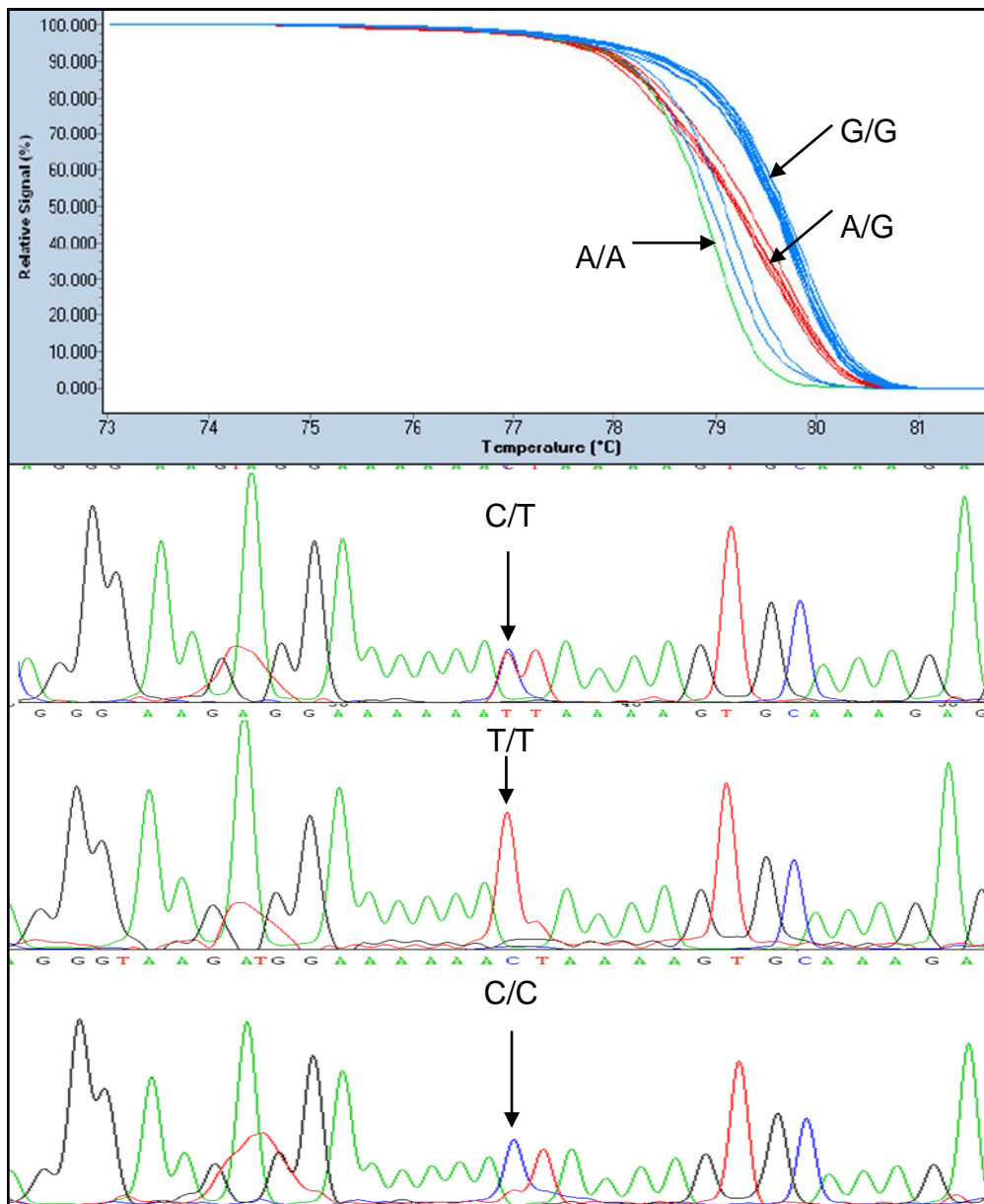


Abb. 12: Genotypisierung mittels Gene-Scanning-Analyse und zugehörige Sequenzierungsergebnisse für den Polymorphismus *IPO13* Prom53. Im oberen Bild ist das Ergebnis einer Genotypisierung mittels Gene-Scanning-Analyse für den Polymorphismus *IPO13* Prom53 abgebildet, die Kurvenscharen wurden mit dem zugehörigen Genotyp beschriftet. Um den Kurvenscharen der Gene-Scanning-Analyse sicher den richtigen Genotyp zuordnen zu können, wurden einzelne DNA-Proben stichprobenartig sequenziert. Im unteren Bild ist das Ergebnis der Sequenzierung von drei unterschiedlichen Patienten-DNAs abgebildet. Für die Kettenabbruchreaktion wurde der Gegenstrang genutzt, daher sind die Basen komplementär zu den im oberen Bild angegebenen (C/C entspricht G/G, T/T entspricht A/A, C/T entspricht A/G).

3.5 Das durchschnittliche Erkrankungsalter der untersuchten Patienten betrug 40 Jahre, die Daten zeigten eine Normalverteilung

Da sich das Amlicon Melting als die bestgeeignete Genotypisierungsmethode herausstellte, wurden die Patienten-DNA-Proben im LightCycler mit dieser Methode genotypisiert. Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob ein Einfluss der Polymorphismen auf das Erkrankungsalter der Patienten erkennbar war. Dafür wurde zunächst der Gesamtdatensatz mithilfe der Software JMP beschrieben, die benötigten Informationen (Erkrankungsalter der Patienten, Anzahl der CAG-Wiederholungen im langen *ATXN3*-Allel) wurden dem SCA3-Gesamtdatensatz aus dem EuroSCA-Projekt entnommen. Unvollständige Patientendatensätze wurden gelöscht, somit standen 434 Patienten für die weitere Analyse zur Verfügung. Zudem wurde für alle folgenden Analysen eine Familienkorrektur durchgeführt, da häufig mehrere Mitglieder einer Familie im Datensatz aufgeführt waren. Alle Patienten, die derselben Familie angehörten, wurden mathematisch zu einem Patienten zusammengefasst, um verwandtschaftsbedingte Einflüsse auszuschließen. Dies wurde erreicht, indem ein Familienfaktor für jeden Patienten berechnet wurde, der sich aus dem Kehrwert der Anzahl der aufgelisteten Familienmitglieder im Datensatz ergab. Der Familienfaktor wurde in allen folgenden Analysen im Feld „Häufigkeit“ angegeben. Die Daten der zusammengefassten Personen wurden somit zu gleichen Teilen berücksichtigt. Die Patientenzahl in der Auswertung wurde durch die Familienkorrektur mathematisch von 434 auf 273 verringert.

Das Erkrankungsalter der Patienten zeigte eine Normalverteilung (Abb. 13) und betrug im Durchschnitt 40 Jahre mit einer Standardabweichung von 12,4 Jahren. Die Spannweite reichte von 10 - 78 Jahren (Tab. 13). Die Verteilung der CAG-Wiederholungen im längeren *ATXN3*-Allel zeigte im Datensatz eine rechtsverscho-bene Normalverteilung (Abb. 14). Der Median der CAG-Wiederholungen der gesamten DNA-Proben lag bei 72 Wiederholungen mit einer Spannweite von 50 bis 82 Wiederholungen. Die durchschnittliche CAG-Anzahl betrug 71,1 mit einer Standardabweichung von 4,6. Zur Beschreibung der Verteilung der CAG-Wiederholungen bei den Polymorphismenvarianten wurde im Folgenden immer der Median angegeben, da die Daten bei den geringeren Patientenzahlen in den einzelnen Varianten

nicht in jedem Fall normalverteilt waren. Die gleiche Art der Datenbeschreibung wurde im Anschluss für jede Polymorphismenvariante durchgeführt.

Tab. 13: Beschreibung des Gesamtdatensatzes.

	Erkrankungsalter in Jahren	Anzahl der CAG-Wiederholungen im langen ATXN3-Allel
Mittelwert	40,0	71,1
Standardabweichung	12,4	4,6
Minimaler Wert	10	50
Maximaler Wert	78	82
Median	40	72

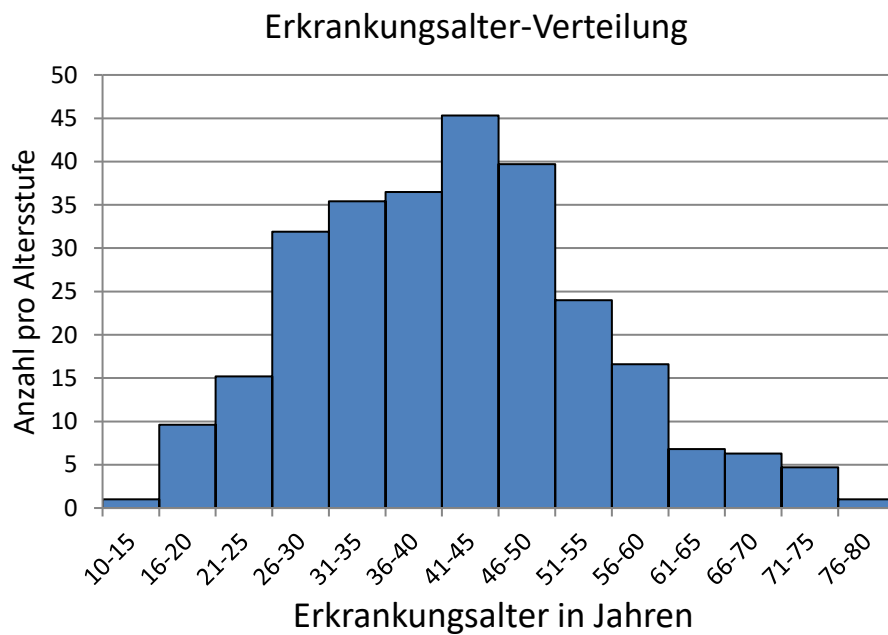


Abb. 13: Verteilung der Erkrankungsalter im untersuchten Patientenkollektiv als Histogramm dargestellt. Die Verteilung des Erkrankungsalters zeigte eine Normalverteilung. Der Mittelwert betrug 40,0 Jahre bei einer Standardabweichung von 12,4 Jahren.

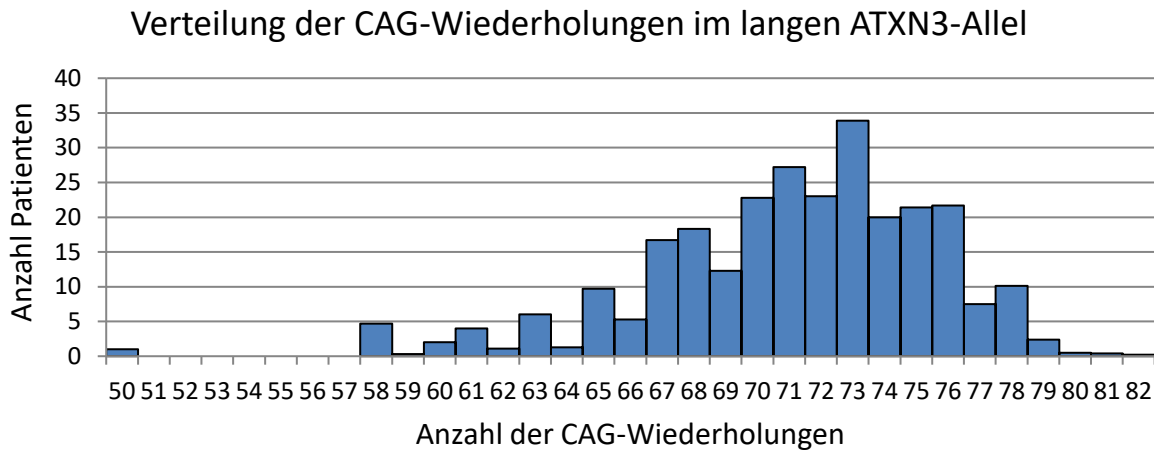


Abb. 14: Verteilung der Anzahl der CAG-Wiederholungen im langen *ATXN-3*-Allel im untersuchten Patientenkollektiv als Histogramm dargestellt. Die Daten zeigten im Gesamtdatensatz eine rechtsverschobene Normalverteilung bei einem Mittelwert von 71,1, einer Standardabweichung von 4,6 und einem Median von 72.

3.6 Deutliche Unterschiede beim Erkrankungsalter bei den Polymorphismen *IPO13* Prom53, *KPNA3* Prom35 und -Prom43

Nach jeweiliger Optimierung des Reaktionsansatzes gelang es zwischen 94 und 97 Prozent der Patienten-DNA-Proben für einen Polymorphismus zu typisieren (Tab. 14). Zur ungefähren Beurteilung der Plausibilität wurden die Ergebnisse mit der Verteilung der Polymorphismenvarianten in der europäischen Bevölkerung verglichen, die Daten wurden von der NCBI-Polymorphismen-Datenbank bezogen (Sherry et al., 2001). Die Ergebnisse wurden zudem auf Vereinbarkeit mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz (HWE) mittels Chi-Quadrat-Test geprüft, dafür wurde ein Online-Tool genutzt, das von der Tufts-University bereitgestellt wurde

(<http://www.tufts.edu/~mcourt01/Documents/Court%20lab%20%20HW%20calculator.xls>). Die Typisierungsergebnisse für den Polymorphismus *KPNA3* Prom35 wichen von der Verteilung in der europäischen Bevölkerung ab und waren nicht mit dem HWE vereinbar, die übrigen Typisierungsergebnisse waren vereinbar mit dem HWE (Tab. 16).

Mithilfe der Statistik-Software JMP wurde das durchschnittliche Erkrankungsalter und der Median der CAG-Wiederholungen pro Polymorphismenvariante berechnet (Abb. 15). Es wurde somit erkennbar, welche Varianten mit einem früheren durchschnittlichen Erkrankungsalter im Patientenkollektiv einhergingen. Am auffälligsten waren die Unterschiede bei den Polymorphismen *IPO13* Prom53, *KPNA3* Prom35 und *KPNA3*

Prom43. Bei dem Polymorphismus *IPO13* Prom53 lag das durchschnittliche Erkrankungsalter der Patienten mit der Variante A/A 3,9 Jahre oberhalb des durchschnittlichen Alters der Variante G/G. Bei dem Polymorphismus *KPNA3* Prom35 betrug die Altersdifferenz zwischen den Varianten G/G und A/A 4,5 Jahre. Bei der Variante T/T des Polymorphismus *KPNA3* Prom43 betrug die Differenz zur Variante G/T 3,5 Jahre (Abb. 15).

Da die Polymorphismen *KPNA3* Prom35 und Prom43 nur 254 bp voneinander entfernt liegen, wurden zusätzlich deren Haplotypen betrachtet. Da diese in der ursprünglichen Genotypisierung nicht bestimmt wurden, wurde retrospektiv eine manuelle Zuordnung anhand der Genotypen der einzelnen Polymorphismen durchgeführt. Bei Vorliegen der Genotypen A/A (Prom35) und G/G (Prom43) ergab sich beispielsweise der Haplotyp AG/AG. Ein Teil der Proben konnte auf diese Weise jedoch nicht eindeutig zugeordnet werden, nämlich bei Vorliegen der Kombination der Genotypen A/G (Prom35) und G/T (Prom43). Diese Proben konnten daher in der Analyse der Haplotypen nicht berücksichtigt werden. Es zeigte sich eine Differenz des durchschnittlichen Erkrankungsalters von 7,5 Jahren zwischen den Haplotypen GG/GT und AG/AG (Tab. 15) (Abb. 15).

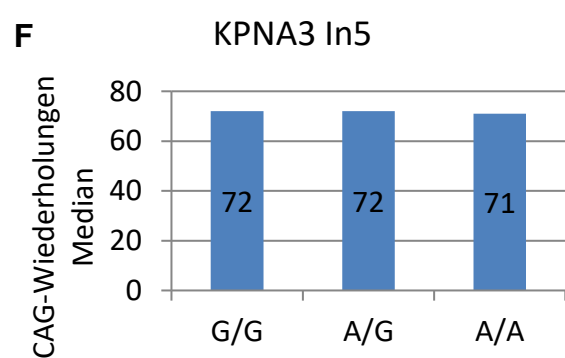
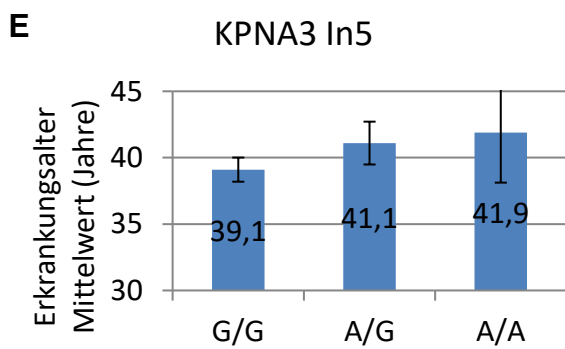
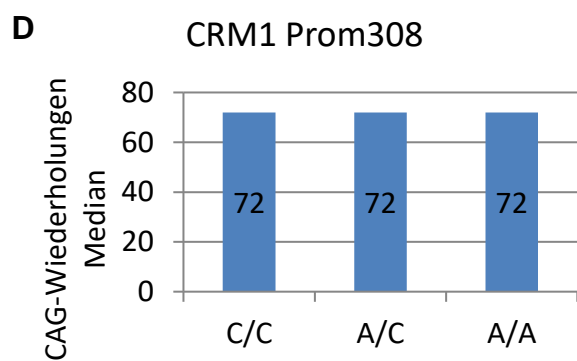
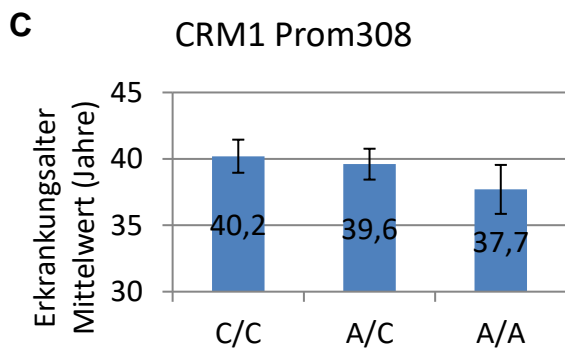
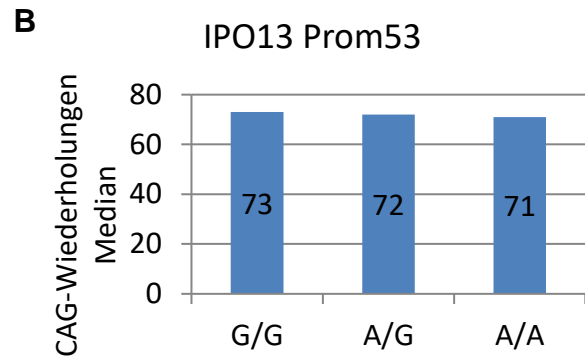
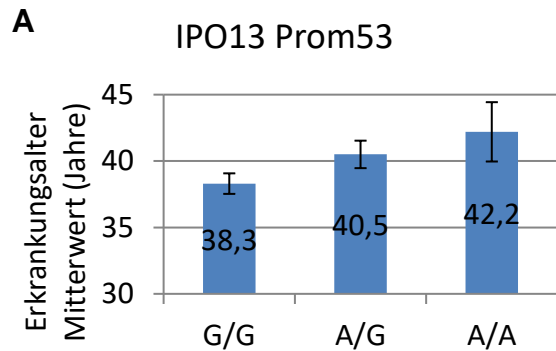
Die Mediane der CAG-Wiederholungen verhielten sich größtenteils entgegengesetzt zum Erkrankungsalter, ein niedrigeres durchschnittliches Erkrankungsalter ging erwartungsgemäß mit einem höheren Median der CAG-Wiederholungen einher, teils blieben die Werte unverändert (Abb. 15).

Tab. 14: Anzahl der typisierten Proben von der gesamten Probenmenge und Verteilung der Proben auf die Polymorphismenvarianten. 1: häufige homozygote Variante, 2: heterozygote Variante, 3: seltene heterozygote Variante.

Gen	Polymorphismus	Probenzahl	Genotyp-Varianten	Genotyp-Verteilung		
				1	2	3
<i>IPO13</i>	<i>rs4448553</i> (Prom53)	(n=265)	(G>A)	0,57	0,36	0,08
<i>CRM1</i>	<i>rs1562308</i> (Prom308)	(n=257)	(C>A)	0,39	0,47	0,14
	<i>rs2273816</i> (In5)	(n=257)	(G>A)	0,72	0,23	0,04
<i>KPNA3</i>	<i>rs12868235</i> (Prom 35)	(n=265)	(G>A)	0,50	0,36	0,14
	<i>rs9535343</i> (Prom43)	(n=262)	(G>T)	0,40	0,44	0,16

Tab. 15: beobachtete Häufigkeit der Haplotypen von KPNA3 *rs12868235* (*Prom35*) und *rs9535343* (*Prom43*) im Datensatz (n=213,1). Die Polymorphismen liegen 254 bp voneinander entfernt.

Haplotyp	AG/AG	AG/AT	AG/GG	AT/GT	GG/GG	GG/GT	GT/GT
rel. Häufigkeit	0,17	0,00	0,18	0,00	0,16	0,26	0,21



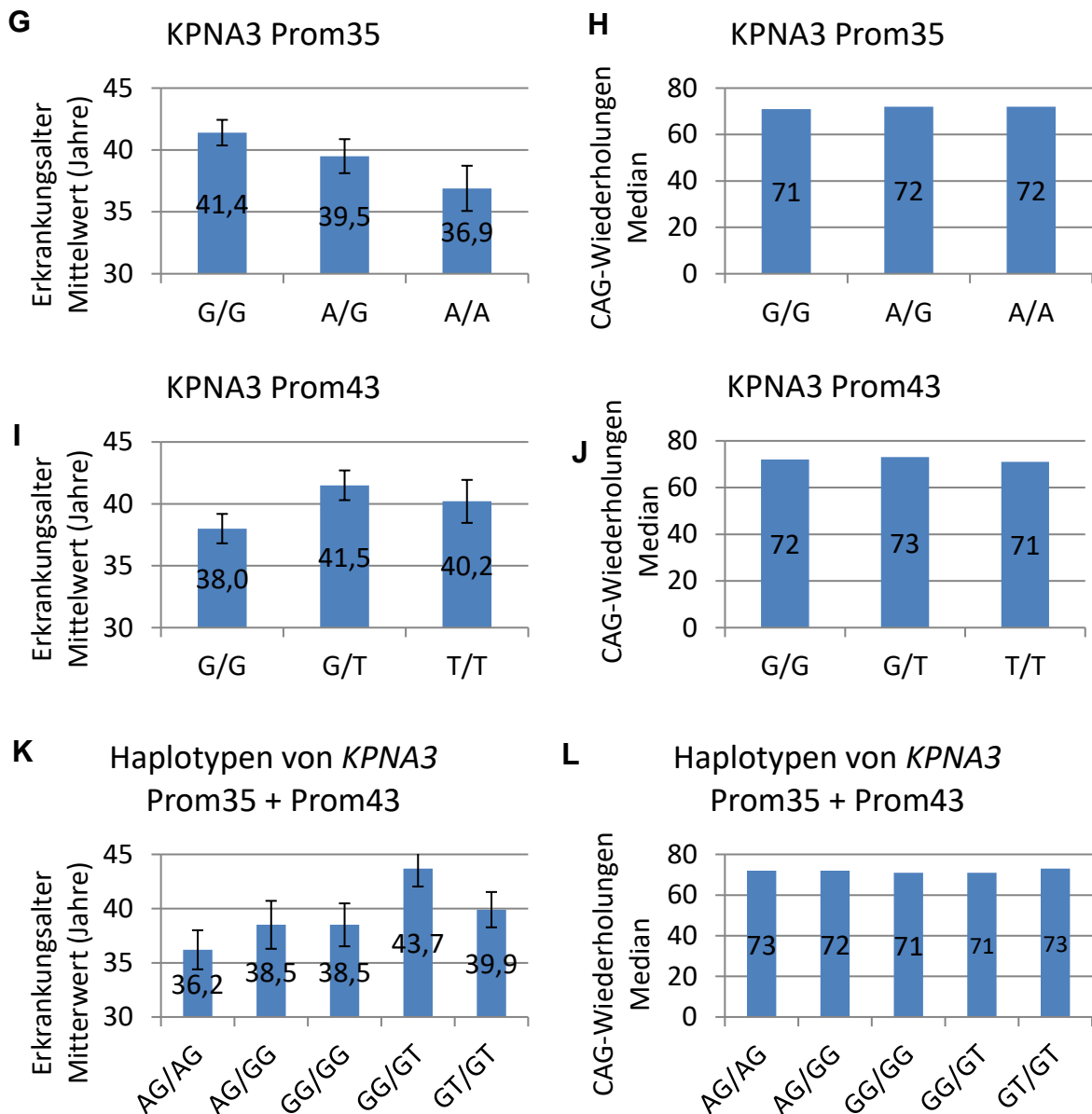


Abb. 15: Erkrankungsalter (Mittelwert mit Standardfehler) und Anzahl der CAG-Wiederholungen (Median) im langen *ATXN-3*-Allel pro Polymorphismenvariante. Bei dem Polymorphismus *IPO13* Prom53 zeigte sich ein durchschnittlich 3,9 Jahre höheres Erkrankungsalter bei den Patienten mit dem selteneren Genotyp A/A im Vergleich zum häufigsten Genotyp G/G (A). Bei dem *KPNA3*-Polymorphismus Prom35 hatten die Patienten mit der selteneren Variante A/A ein durchschnittlich 4,5 Jahre niedrigeres Erkrankungsalter als Patienten mit der Variante G/G (G). Bei dem *KPNA3*-Polymorphismus Prom43 wiesen die heterozygoten Patienten ein durchschnittlich 3,5 Jahre höheres Erkrankungsalter auf als die Patienten mit der häufigeren homozygoten Variante G/G (I). Zwischen den *KPNA3*-Haplotypen GG/GT und AG/AG betrug die Differenz der Erkrankungsalter-Durchschnittswerte 7,5 Jahre. Die Haplotypen AG/AT und AG/GT wurden nicht dargestellt aufgrund einer Gruppengröße von 1 und 0,25 nach Familienkorrektur (K), die Polymorphismen Prom35 und Prom43 liegen 254 bp voneinander entfernt. Bei den Polymorphismen *KPNA3* In5 und *CRM1* Prom308 waren die Unterschiede im Erkrankungsalter weniger ausgeprägt (C, E). Die Mediane der CAG-Wiederholungen im langen *ATXN3*-Allel zeigten keine ausgeprägten Veränderungen und befanden sich stets zwischen 71 und 73 (B, D, F, H, J).

Tab. 16: Ergebnisse der Genotypisierung der Patienten-DNA-Proben prozentual im Vergleich zur Verteilung in der europäischen Bevölkerung. 1: häufige homozygote Variante, 2: heterozygote Variante, 3: seltene heterozygote Variante. Ergebnisse der Prüfung auf Vereinbarkeit mit dem HWE; die Prüfung wurde mittels Chi-Quadrat-Test mithilfe des HWE-Calculators durchgeführt (<http://www.tufts.edu/~mcourt01/Documents/Court%20lab%20%20HW%20calculator.xls>). Ist der p-Wert >0,05, so ist die Verteilung mit dem HWE vereinbar. Die Typisierungsergebnisse des Polymorphismus *KPNA3* Prom35 waren nicht mit dem HWE vereinbar, da mehr Patienten der häufigeren Homozygotenvariante G/G zugeordnet wurden als erwartet. Die Angaben für die Variantenverteilung in Europa wurde von der NCBI SBP database (Sherry et al., 2001) bezogen.

Gen	Polymorphismus	Vergleich Variantenverteilung Patienten und europäische Bevölkerung			HWE - Vereinbarkeit	
			1	2		3
<i>IPO13</i>	Prom53	(Patienten)	0,57	0,36	0,08	Ja (p=0,40)
		(Europa)	0,61	0,34	0,05	
<i>CRM1</i>	Prom308	(Patienten)	0,39	0,47	0,14	Ja (p=0,80)
		(Europa)	0,40	0,47	0,14	
<i>KPNA3</i>	In5	(Patienten)	0,72	0,23	0,04	Ja (p=0,23)
		(Europa)	0,64	0,32	0,04	
	Prom35	(Patienten)	0,50	0,36	0,14	Nein (p=0,01)
		(Europa)	0,45	0,45	0,11	
	Prom43	(Patienten)	0,40	0,44	0,16	Ja (p=0,21)
		(Europa)	0,34	0,49	0,18	

3.7 Der *KPNA3*-Polymorphismus Prom43 beeinflusste signifikant das Erkrankungsalter der *SCA3*-Patienten

In der deskriptiven Statistik unterschied sich das durchschnittliche Erkrankungsalter am stärksten bei den Genotypen der Polymorphismen *IPO13* Prom53, *KPNA3* Prom35 und -Prom43. Durch eine lineare Kovarianzanalyse mit der Software JMP wurde im Folgenden untersucht, ob die Beobachtungen statistisch signifikant waren. Zunächst wurde der ausschließliche Einfluss der CAG-Wiederholungen im langen *ATXN3*-Allel auf das Erkrankungsalter im gesamten Datensatz dargestellt. Das Erkrankungsalter wurde dabei als stetige, abhängige Variable, die CAG-Anzahl als stetige, unabhängige Variable angegeben. Der Familienfaktor wurde in dem Feld „Häufigkeit“ eingefügt. Wie erwartet zeigte sich ein negativer linearer Zusammenhang zwischen den beiden Parametern im Regressionsdiagramm (Abb. 16), die CAG-Anzahl zeigte einen starken Einfluss auf das Erkrankungsalter ($p < 0,001$). Aus der

Geradengleichung der Regressionsgeraden ergab sich die Vorhersageformel für das Erkrankungsalter für den Gesamtdatensatz:

$$[\text{Erkrankungsalter}] = 170,24 + (-1,83 \times [\text{Anzahl CAG-Wiederholungen}]).$$

Mit diesem Rechenmodell konnten 46 % der Streuung des Erkrankungsalters im Gesamtdatensatz erklärt werden ($R^2=0,46$).

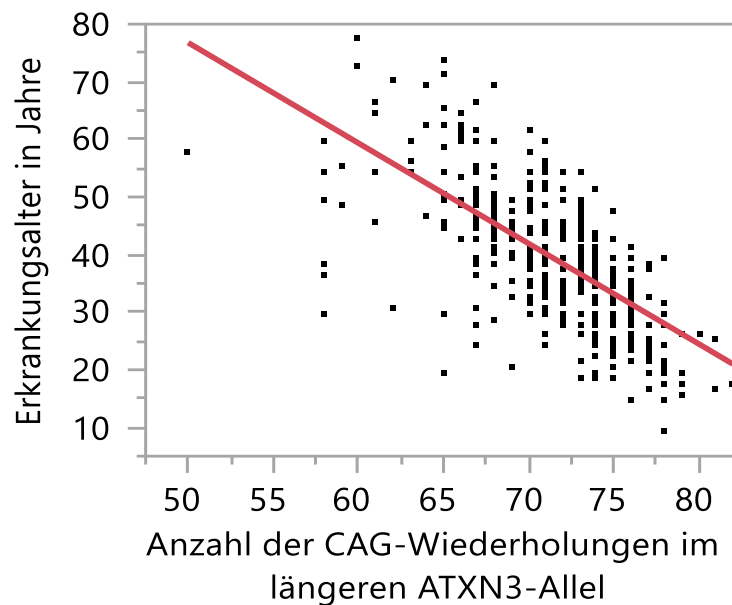


Abb. 16: Erkrankungsalter-Verteilung über der Anzahl der CAG-Wiederholungen im langen *ATXN3*-Allel vom gesamten Patientenkollektiv mit Regressionsgeraden. Der lineare Zusammenhang war statistisch signifikant ($p < 0,001$), die Geradengleichung der Regressionsgeraden konnte in diesem Modell 46 % der Variabilität des Erkrankungsalters erklären.

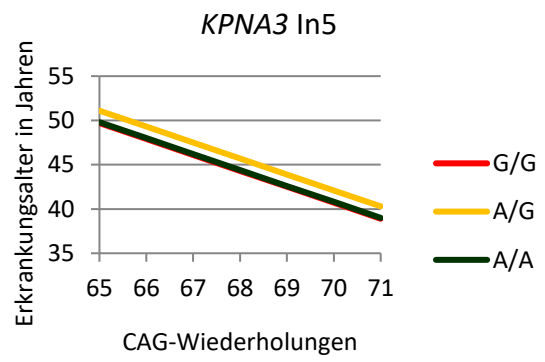
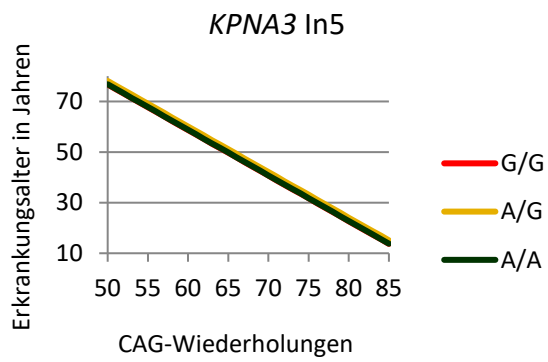
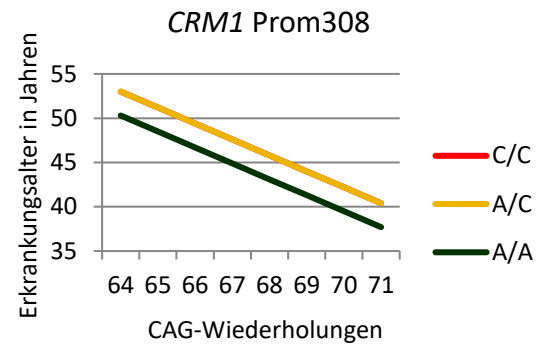
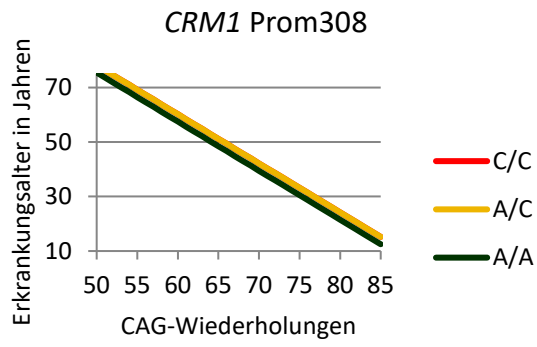
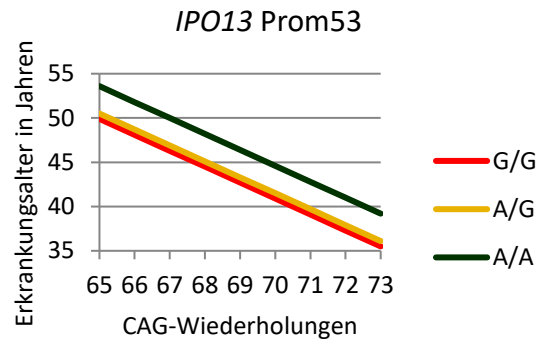
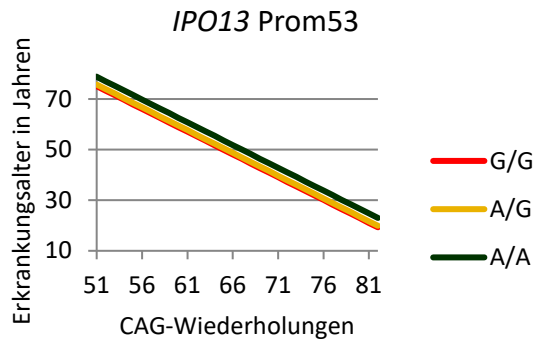
Daraufhin wurden die Genotypen der Polymorphismen als zusätzliche Einflussfaktoren (unabhängige, nominale Variable) in das Modell der linearen Kovarianzanalyse einbezogen. Es wurden nur die Patienten berücksichtigt, die eindeutig einer Polymorphismenvariante zugeordnet werden konnten. Für jede Variante wurde eine Regressionsgerade berechnet (Abb. 17).

Unter dem Abschnitt „Effekttests“ wurde ein p-Wert berechnet, der die Wahrscheinlichkeit anzeigt, dass die Nullhypothese zutrifft und die getesteten Parameter somit keinen Einfluss auf das Modell haben. Werte $< 0,05$ wurden als signifikant betrachtet. Unter dem Abschnitt „Übersicht der Anpassung“ wurde für jedes Modell der Wert R^2 berechnet. Dieser zeigt an, wie viel Prozent der Variabilität des Erkrankungsalters mithilfe des Modells erklärt wird (Tab. 17).

In den Regressionsdiagrammen zeigten sich die deutlichsten Abweichungen der Kurven zueinander bei den Polymorphismen *IPO13* Prom53, *KPNA3* Prom35 und -

Prom43 (Abb. 17). Die Polymorphismen *IPO13* Prom53, *CRM1* Prom308 und *KPNA3* In5 zeigten keinen signifikanten Einfluss auf das Gesamtmodell oder die Variabilität des Erkrankungsalters. Der stärkste Einfluss auf das Erkrankungsalter wurde bei dem Modell beobachtet, welches den SNP *KPNA3* Prom43 einbezieht. Der Einfluss auf die Variabilität des Erkrankungsalters konnte um ein Prozent erhöht werden ($\Delta R^2=0,01$). Der Einfluss des Polymorphismus auf das Erkrankungsalter war statistisch signifikant ($p=0,034$) (Tab. 17). Der Polymorphismus *KPNA3* Prom35 konnte den Einfluss des Modells auf das Erkrankungsalter nicht erhöhen ($\Delta R^2=0,00$), der Einfluss des SNP erreichte keine statistische Signifikanz (Tab. 17).

Bei Betrachtung des Einflusses der Haplotypen von *KPNA3* Prom35 und Prom43 konnten zusätzliche fünf Prozent der Variabilität des Erkrankungsalters erklärt werden ($\Delta R^2=0,05$), der Einfluss des Modells erreichte ebenfalls das Signifikanzniveau ($p=0,048$).



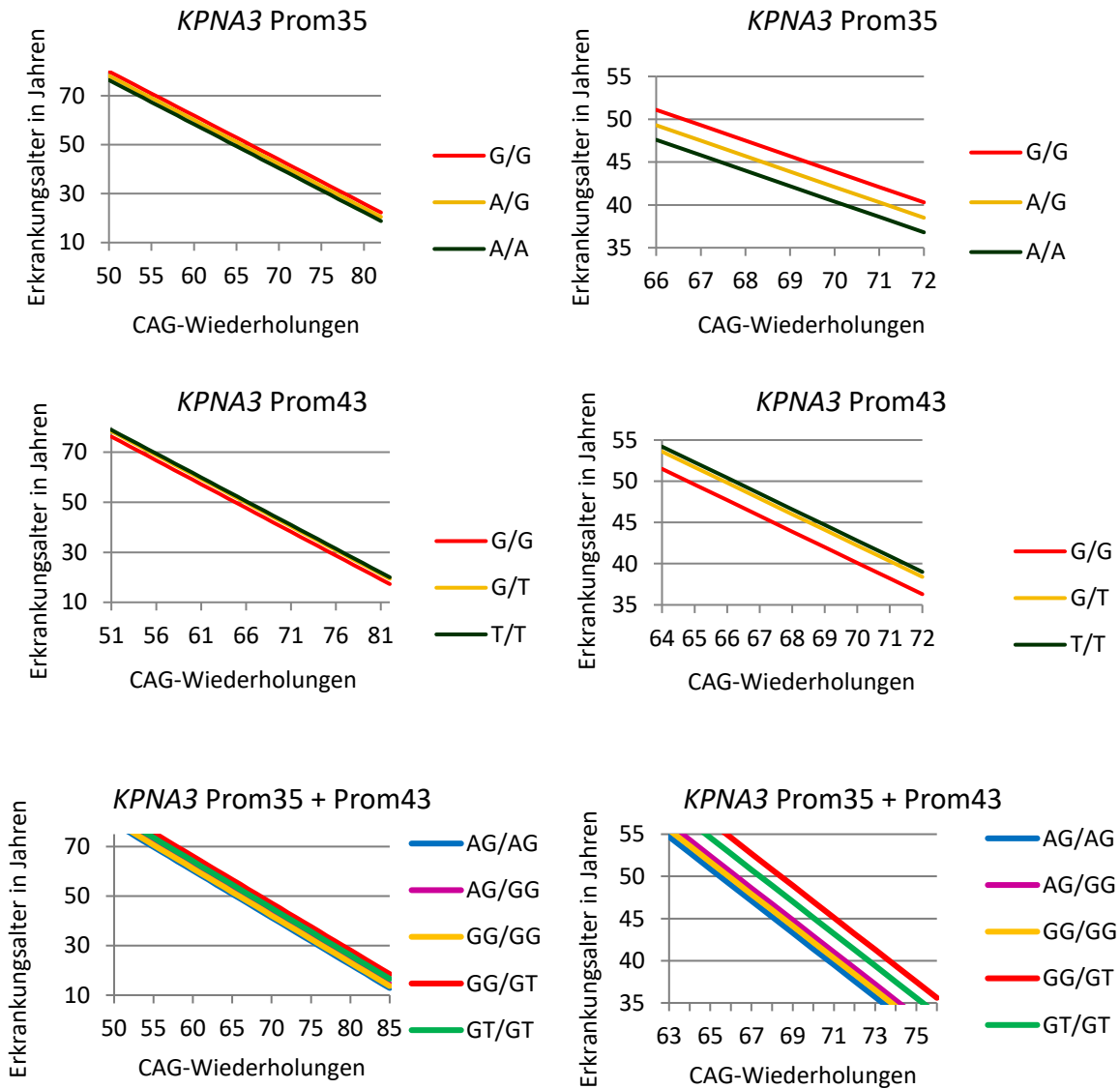


Abb. 17: Regressionsgeraden aus der Kovarianzanalyse, die den Einfluss der einzelnen Polymorphismenvarianten, zusätzlich zu dem Einfluss der CAG-Wiederholungen, auf das Erkrankungsalter der Patienten darstellen. Links wurden die vollständigen Geraden abgebildet, rechts jeweils ein Ausschnitt. Es zeigte sich eine deutliche Verschiebung der einzelnen Geraden zueinander bei den Polymorphismen *IPO13 Prom53*, *KPNA3 Prom35* und *KPNA3 Prom43*. In den letzten beiden Diagrammen wurden die Haplotypen von *KPNA3 Prom35+Prom43* abgebildet. Es wurden nur die fünf Haplotypen abgebildet, denen mehr als ein Patient zugeordnet werden konnte.

Tab. 17: Regressionsgeradengleichungen als Berechnungsformeln für das Erkrankungsalter. [EA]=Erkrankungsalter, [CAG]=Anzahl der CAG-Wiederholungen im langen ATXN3-Allel. Mithilfe der Software JMP wurde eine lineare Kovarianzanalyse durchgeführt. Die unabhängigen Variablen waren die CAG-Anzahl und die SNP-Genotypen, die abhängige Variable war das Erkrankungsalter. Die p-Werte stammen aus der Rubrik „Effekttests“, das Signifikanzniveau wurde auf 0,05 festgelegt. Die Werte für R² stammen aus der Rubrik „Übersicht der Anpassung“. Sie zeigen an, wie viel Prozent der Variabilität des Erkrankungsalters mit dem Modell erklärt werden kann. ΔR² zeigt an, wie viel Prozent auf den Polymorphismus zurückzuführen sind. Eine signifikante Abweichung der Regressionsgeraden zur Gesamtgeraden zeigte sich bei dem KPNA3-Polymorphismus Prom43. Betrachtet man die Haplotypen von KPNA3 Prom35 und Prom43 als Einflussfaktor, zeigte sich das insgesamt höchste ΔR² mit 0,05.

Modell	Berechnungsformel des Erkrankungsalters	p	R ²	ΔR ²
[CAG]	[EA] = 170,2 + (-1,8 x [CAG])	<0,001	0,46	-
[CAG] + <i>IPO13</i> Prom53	[EA] = 168,3 + (-1,8 x [CAG])	0,241	0,45	-0,01
	G/G: -1,4 A/G: -0,9 A/A: +2,3			
[CAG] + <i>CRM1</i> Prom308	[EA] = 167,3 + (-1,8 x [CAG])	0,286	0,45	-0,01
	C/C: +0,9 A/C: +0,9 A/A: -1,8			
[CAG] + <i>KPNA3</i> In5	[EA] = 167,2 + (-1,8 x [CAG])	0,607	0,45	-0,01
	G/G: -0,5 A/G: +0,9 A/A: -0,4			
[CAG] + <i>KPNA3</i> Prom35	[EA] = 168,1 + (-1,8 x [CAG])	0,088	0,46	0,00
	G/G: +1,8 A/G: -0,0 A/A: -1,7			
[CAG] + <i>KPNA3</i> Prom43	[EA] = 175,0 + (-1,9 x [CAG])	0,034	0,47	0,01
	G/G: -1,9 T/G: +0,2 T/T: +0,8			
[CAG] + <i>KPNA3</i> Prom35 + Prom43	[EA] = 178,4 + (-1,9 x [CAG])	0,048	0,51	0,05
	AG/AG: -4,0 AG/AT: +2,6 AG/GG: -2,5 AT/GT: +5,8 GG/GG: -3,2 GG/GT: +1,6 GT/GT: -0,3			

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Es wurden anfangs fünfzehn Polymorphismen in insgesamt zehn Genen nukleozytoplasmatischer Transportproteine ausgewählt, um sie hinsichtlich ihres Einflusses auf das Erkrankungsalter, zusätzlich zu dem Einfluss der CAG-Wiederholungen, zu untersuchen. Bei fünf Polymorphismen gelang die Etablierung zur Genotypisierung der Patienten-DNA-Proben: *IPO13* Prom53, *CRM1* Prom308, *KPNA3* In5, -Prom35 und -Prom43. Die Ergebnisse der Typisierung waren bei allen Polymorphismen mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz vereinbar, mit Ausnahme des SNP *KPNA3* Prom35. Im untersuchten Datensatz, bestehend aus 434 DNA-Proben von SCA3-Patienten, zeigte sich ein starker linearer Zusammenhang zwischen der Anzahl der CAG-Wiederholungen im langen *ATXN3*-Allel und dem Erkrankungsalter ($p < 0,001$). Die CAG-Anzahl konnte 46 % der Variabilität des Erkrankungsalters erklären ($R^2 = 0,46$). Die Polymorphismen *IPO13* Prom53, *KPNA3* In5 und *CRM1* P308 zeigten in einer Kovarianzanalyse keinen signifikanten Einfluss auf das Erkrankungsalter. Patienten mit der Variante G/G des SNP *KPNA3* Prom43 hatten ein durchschnittlich 2,2 Jahre niedrigeres Erkrankungsalter als Patienten mit der Variante T/T. In der Kovarianzanalyse zeigte sich ein statistisch signifikanter Einfluss des Polymorphismus auf das Erkrankungsalter ($p = 0,034$), zudem konnte ein Prozent der Streuung des Erkrankungsalters im untersuchten Datensatz auf den Polymorphismus zurückgeführt werden ($\Delta R^2 = 0,01$). Patienten mit der Variante G/G des SNP *KPNA3* Prom35 hatten hingegen ein durchschnittlich 5,5 Jahre höheres Erkrankungsalter als Patienten mit der Variante A/A. Der Einfluss des Modells erreichte keine statistische Signifikanz. Aufgrund der räumlichen Nähe von *KPNA3* Prom43 und Prom35 zueinander wurden zusätzlich die Haplotypen der beiden Polymorphismen betrachtet, diese wurden retrospektiv mithilfe der vorliegenden Daten zugeordnet. Zwischen den Haplotypen AG/AG und GG/GT lag eine Differenz des durchschnittlichen Erkrankungsalters von 7,5 Jahren. Der Einfluss des Modells auf die Variabilität des Erkrankungsalters betrug fünf Prozent ($\Delta R^2 = 0,05$), der Einfluss des Modells erreichte ebenfalls statistische Signifikanz ($p = 0,048$).

4.2 Grundlagen der Polymorphismen-Recherche

Die Anzahl der CAG-Wiederholungen im langen *ATXN3*-Allel stellt den größten Einflussfaktor auf das Erkrankungsalter von SCA3-Patienten dar (Kawaguchi et al., 1994, Maciel et al., 1995). Dennoch können mit diesem Modell nur etwa 50-80 % der Variabilität des Erkrankungsalters erklärt werden (van de Warrenburg et al., 2002). Es wird demnach angenommen, dass es weitere genetische Einflussfaktoren auf das Erkrankungsalter geben muss. Basierend auf pathophysiologischen Überlegungen wurden bislang verschiedene Assoziationsstudien zu genetischen Einflussfaktoren durchgeführt. Beispielsweise ist ein Mechanismus in der Pathophysiologie von SCA3 die mitochondriale Dysfunktion (Yu et al., 2009). Im Bezug darauf beobachteten Chen *et al.* ein drei Jahre früheres Erkrankungsalter bei männlichen chinesischen SCA3-Patienten mit dem 10398A-Polymorphismus im *MT-ND3*-Gen (mitochondriale NADH-Dehydrogenase) (Chen et al., 2016). Ramos *et al.* fanden heraus, dass die Haplogruppe JT der mitochondrialen DNA bei Portugiesischen SCA3-Patienten mit einem früheren Erkrankungsalter assoziiert ist, während die Haplogruppen W und X einen protektiven Effekt zu haben schienen. Zudem beobachteten sie ein unterschiedliches durchschnittliches Erkrankungsalter in verschiedenen ethnischen Gruppen (Ramos et al., 2019). In Bezug auf das Schlüsselprotein in der Pathogenese von SCA3, Ataxin-3, zeigten Long *et al.*, dass ein A-Allel im SNP rs709930 in der 3' UTR von *ATXN3* mit einem früheren Erkrankungsalter assoziiert ist (Long et al., 2015). Im Hinblick auf den nukleozytoplasmatischen Transport von Ataxin-3 gab es bisher keine Studien, die einen genetischen Einfluss auf das Erkrankungsalter untersuchten. Verschiedene nukleozytoplasmatische Transportproteine wurden von Sowa *et al.* hinsichtlich ihres Einflusses auf die Lokalisation von *ATXN3* in HEK-Zellen, sowie hinsichtlich ihres Einflusses auf den Krankheitsverlauf im SCA3-Drosophila- und Mausmodell untersucht (Sowa et al., 2018). Basierend auf den Erkenntnissen dieser Arbeit wurden die Gene nukleozytoplasmatischer Transportproteine nach Einzelnukleotidpolymorphismen durchsucht, um deren genetischen Einfluss auf das Erkrankungsalter zu untersuchen. Bei der Polymorphismen-Recherche mittels NCBI SNP-Database (Sherry et al., 2001) wurden ausschließlich SNPs ausgewählt, deren Existenz bereits durch größeren Studien belegt war. Zudem wurden SNPs ausgeschlossen, deren selteneres Allel eine Frequenz unter zehn Prozent in Europa aufwies. Bei

Tsai *et al.* zeigten sich in einer Studie zu SNPs im Kalirin-Gen in Bezug auf HD zehn der untersuchten Polymorphismen als monomorph (Tsai *et al.*, 2012). Um die Studienzeit und Ressourcen effizient zu nutzen, wurde daher die Vorauswahl durchgeführt. Es ist andererseits nicht auszuschließen, dass somit funktionell wichtige Polymorphismen nicht untersucht wurden. Die Recherche nach SNPs, die sich für eine Analyse eigneten, ergab eine Anzahl von fünfzehn Polymorphismen, keiner davon wurde bisher im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen beschrieben. Der Ansatz, die Rolle nukleozytoplasmatischer Transportproteine bei der SCA3 zu untersuchen, erscheint zusätzlich interessant, da der Transportmechanismus von Ataxin-3 einen Ansatz bei der Pharmakotherapie von SCA3 darstellen könnte. Eine Inhibition eines nukleären Transportproteins ist pharmakologisch prinzipiell möglich, beispielsweise wird in verschiedenen Krebstherapien der Inhibitor Leptomycin B für das Protein Exportin 1, dem Genprodukt von *CRM1*, eingesetzt (Ishizawa *et al.*, 2015).

4.3 Rückschlüsse aus dem Etablierungsverfahren

Beim Primer-Design und der Etablierung der PCR-Bedingungen wurde nach den Empfehlungen des Herstellers des verwendeten LightCycler-Systems (Roche, Mannheim) gehandelt (Roche-Diagnostics, 2008), es wurden fünf Polymorphismen für die Genotypisierung etabliert. Dennoch gab es Primerpaare, die auch durch eine Optimierung des PCR-Ansatzes mittels Anfertigung von $MgCl_2$ -Reihen keine Amplifizierung im LightCycler herbeiführten. Ein Grund dafür könnte die Tatsache sein, dass sich viele der Polymorphismen in Promotoreregionen befanden, welche häufig aus repetitiven Sequenzen aus T und A-Abfolgen bestehen und ein Primer-Design somit erschweren. Bei anderen gelang zwar eine Amplifizierung, jedoch keine Auswertung, entweder aufgrund einer zu geringen Menge entstandenen PCR-Produktes, oder aufgrund unregelmäßiger Schmelzkurven. Habbal *et al.* haben 2008 eine Studie über LightCycler PCR-Optimierung für CMV-Virus-DNA veröffentlicht, in der sie für 17 Primer-Sets systematisch die optimalen Werte für die $MgCl_2$ -Konzentration, die Primer-Konzentrationen, sowie die Anlagerungstemperatur für die Primer bestimmt haben (Habbal *et al.*, 2008). Für jeden Parameter wurde in einem Diagramm für jeden Wert die maximale Fluoreszenz, sowie der Wert des Kreuzungspunktes (C_p -value) als Parameter für die DNA-Menge aufgetragen und jeweils der Wert bestimmt, bei

welchem der Kreuzungspunkt am niedrigsten, sowie die Fluoreszenz-Intensität am höchsten war. Es ist möglicherweise ein Ansatz, dies ebenfalls für die Primer-Konzentrationen zu probieren und zudem die optimale Anlagerungstemperatur der Primer zu ermitteln statt der verwendeten Touchdown-PCR. Die Autoren räumten jedoch ein, dass der Prozess der PCR-Optimierung sowohl zeit- als auch kostenaufwändig ist. Weitere Hinweise des Herstellers waren zum einen die Verwendung von durch HPLC (high performance liquid chromatography) aufgereinigte Primer (Roche-Diagnostics, 2008) – dies wäre ebenfalls ein Ansatz bei weiteren Experimenten.

4.4 alternative Genotypisierungsverfahren im Vergleich

Die für die Studie verwendeten DNA-Proben stammten aus dem EuroSCA-Consortium, einem europaweiten Projekt verschiedener Zentren zur Erforschung Spinozerebellärer Ataxien. Es stand daher eine hohe Fallzahl von 434 Proben zur Verfügung. Es blieben bei jedem Polymorphismus ein Anteil von ca. 5 % der DNA-Proben, die mit der LighCycler-Analyse nicht typisiert werden konnten. Dabei hat möglicherweise auch die Lagerungszeit der Proben eine Rolle gespielt (Probengewinnung zwischen 2004 und 2008). Insgesamt stellte die Genotypisierung im LightCycler jedoch eine sehr effektive Methode dar, in der eine hohe Probenzahl simultan analysiert werden konnte während nur wenige Nanogramm genomischer DNA nötig waren. Pro Patienten musste für die gesamte Analyse inklusive PCR und HRM nur ein einzelner Reaktionsansatz hergestellt werden, nach erfolgreicher Etablierung war die Analyse daher schnell durchführbar. Chen *et al.* nutzten für die Genotypisierung eines Teils ihrer SCA3-DNA-Proben (151 Proben) für den Einzelnukleotidpolymorphismus rs2853826 auf dem Gen MT-ND3 ausschließlich die Sanger Sequenzierung und für weitere Proben das Genotypisierungsverfahren SNaPhot Multiplex-System (Chen et al., 2016). In diesen Verfahren folgen nach durchgeführter PCR eine Aufreinigung der Produkte, sowie eine Sequenzier-Reaktion mit forward- oder reverse-Primern und fluoreszenzmarkierten ddNTPs. Nach einer erneuten Aufreinigung folgen jeweils eine Kapillarelektrophorese (Pati et al., 2004). Andere Studien, die nach genetischen Einflussfaktoren in Form von SNPs in SCA3 gesucht haben, verwendeten das Verfahren PCR-RFLP (PCR-Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus) (Zhou et al., 2012, Metzger et al., 2006, Tsai et al., 2012). Bei diesem Verfahren wird dem PCR-Produkt ein Restriktionsenzym zuge-

fügt, welches die amplifizierten DNA-Abschnitte an einer bestimmten Stelle schneidet. Die Schnittstelle wird über den Polymorphismus platziert, sodass nur die Proben mit einer bestimmten Polymorphismenvarianten geschnitten werden. Durch eine Gelelektrophorese werden die Fragmente aufgetrennt und mithilfe der Banden genotypisiert (Deng, 1988). Die beschriebenen Verfahren erfordern deutlich mehr Arbeitsschritte als das in dieser Studie verwendete HRM und sind daher zeitaufwändiger und anfälliger für Verunreinigungen. Beim HRM finden sämtliche Analyseschritte in einem verschlossenen Well statt, es sind keine Aufreinigungen zwischen den Arbeitsschritten nötig. Die Auswertung der Gene Scanning-Analyse musste teils manuell erfolgen, da die Software-Zuordnung bei einzelnen Kurven fehlerhaft war, hierdurch ergab sich wiederum eine gewisse Anfälligkeit für Zuordnungsfehler. Für die Polymorphismen, für die bisher keine PCR-Bedingungen etabliert werden konnten, wäre in zukünftigen Versuchen am ehesten ein erneutes Primer-Design, sowie eine weitere Optimierung der PCR-Protokolle nötig. Eine bessere DNA-Probenqualität ließe sich durch Gewinnung neuer Patienten-DNAs erreichen, dies wäre jedoch aufgrund der geringen Prävalenz von SCA3 mit niedrigeren Fallzahlen oder einer sehr langen Studiendauer verbunden. Möglich wäre auch eine Nutzung der beschriebenen anderen Genotypisierungsverfahren. Diese sind zwar zeitaufwändiger als das HRM, wurden aber in den vorher genannten Studien als Routineverfahren beschrieben und stellen bei nicht funktionierender HRM trotz gründlicher Optimierungsversuche eine denkbare Alternative dar. Für die Genotypisierung im LightCycler standen zwei Methoden zur Verfügung – das Amplicon Melting und die Genotypisierung mittels Oligonukleotidsonde. Letzteres Verfahren konnte trotz Optimierungsversuche nicht etabliert werden, während mittels Amplicon Melting gute Daten erzeugt wurden. Beide Verfahren wurden als zuverlässige Methoden beschrieben und schienen zur Genotypisierung von SNPs gleich gut geeignet zu sein (Zhou et al., 2004, Liew et al., 2004, Liew et al., 2007).

4.5 unterschiedliche statistische Herangehensweisen

Es wurde mithilfe der Statistiksoftware JMP eine ANCOVA durchgeführt, dabei war die unabhängige Variable die Anzahl der CAG-Wiederholungen im langen *ATXN3*-Allel und die abhängige Variable das Erkrankungsalter. Es wurde eine lineare Regression zwischen beiden Variablen hergestellt unter Berücksichtigung des zusätzli-

chen Einflusses durch die Polymorphismen. Zudem wurde das durchschnittliche Erkrankungsalter und die mediane Anzahl der CAG-Wiederholungen pro Polymorphismenvariante bestimmt. Bei jeder Analyse wurde der Familienfaktor einbezogen, somit sank die rechnerische Probenanzahl von 434 auf 273.

Long *et al.* rekrutierten neben den SCA3-Probanden auch eine Kontrollgruppe aus gesunden Probanden und verglichen die Allelfrequenzen der untersuchten Polymorphismen mit denen der SCA3-Patienten. Die Fragestellung bezog sich dabei jedoch nicht nur auf den Einfluss der Polymorphismen auf das Erkrankungsalter, sondern auch auf deren Rolle als Risikofaktor für SCA3 (Long *et al.*, 2015). In dieser vorliegenden Studie wurden keine Kontrollprobanden typisiert, da die Polymorphismen nicht als verursachende Faktoren, sondern als lediglich modifizierende Faktoren der SCA3 untersucht werden sollten.

Chen *et al.* nutzten in ihrer Studie zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen *MT-ND3*-Polymorphismen und SCA3 eine stufenweise multiple lineare Regressionsanalyse mit Einbeziehung des Patientengeschlechts, der CAG-Wiederholungszahl in beiden *ATXN3*-Allelen, sowie deren Interaktion als Einfluss auf das Erkrankungsalter. Anschließend verwendetet sie die Bonferroni-Korrektur bei multiplen Testen (Chen *et al.*, 2016). Die vorliegende Studie hat sich dagegen auf den Zusammenhang zwischen dem längeren *ATXN3*-Allel zusammen mit der Polymorphismenvariante auf das Erkrankungsalter beschränkt, es wurde daher keine Korrektur auf Mehrfachtestung durchgeführt.

Tezenas du Montcel *et al.* haben zur Vorhersage des Erkrankungsalters ein Berechnungsmodell veröffentlicht, welches das aktuelle Alter von bislang asymptomatischen SCA3-Patienten einbezieht. Statt einer linearen Regression wurde eine logarithmische verwendet (Tezenas du Montcel *et al.*, 2014b). Dieses Modell kann das voraussichtliche Erkrankungsalter bei einer hohen CAG-Wiederholungszahl bisher am genauesten eingrenzen, jedoch bringt es bei geringer CAG-Wiederholungszahl kaum einen Vorteil gegenüber einer linearen Regression.

4.6 Der scheinbare Einfluss des SNP *IPO13* Prom53 auf das Erkrankungsalter konnte nicht bewiesen werden

Bei dem Polymorphismus *IPO13* Prom53 wiesen die untersuchten SCA3-Patienten mit der häufigeren homozygoten Variante ein um durchschnittlich 3,9 Jahre niedrige-

res Erkrankungsalter auf als Patienten mit der selteneren homozygoten Variante. Entsprechend war der Median der CAG-Wiederholungen im langen *ATXN3*-Allel beim häufigeren Genotyp G/G um zwei höher als beim selteneren Genotyp A/A. In der Kovarianzanalyse zeigte sich jedoch kein signifikanter Einfluss des Genotyps auf das Erkrankungsalter. Möglicherweise ist ein Grund dafür die geringe Anzahl der Patienten mit dem selteneren Genotyp A/A (31 von 421 bzw. 20,4 von 265 nach Familienkorrektur), denn die deutliche Differenz im durchschnittlichen Erkrankungsalter suggeriert scheinbar einen Zusammenhang. Eine Untersuchung in einer größeren Kohorte wäre nötig, um die Frage abschließend zu klären. Der Promotor-Polymorphismus *IPO13* Prom53 wurde von Haas *et al.* im Zusammenhang mit Bronchopulmonaler Dysplasie bei Frühgeborenen untersucht, der Genotyp des SNP zeigte dabei einen signifikanten Einfluss auf das Auftreten der Erkrankung (Haas *et al.*, 2013). Dies könnte darauf hindeuten, dass der Polymorphismus die Expression vom Importin 13 beeinflusst und somit auch in anderen Organsystemen eine Rolle spielen könnte. Importin 13 wird im menschlichen Körper in verschiedenen Organsystemen exprimiert, u.a. im Gehirn, bronchialem Epithel, Skelett- und Herzmuskulatur, Leukozyten und Hoden (Wu *et al.*, 2016, Su *et al.*, 2002). Das Protein Importin 13 gehört zu der Gruppe der β -Karyopherine. Diese erkennen ihre Ladung anhand bestimmter nukleärer Import- oder Exportsignale und können diese über den Nuclear Pore Complex (NPC) in den Zellkern oder aus diesem heraus transportieren (Pemberton and Paschal, 2005). Importin13 wurde sowohl als nukleäres Importprotein, als auch als Exportprotein identifiziert. Es ist am aktiven Transport von u.a. Myopodin (Liang *et al.*, 2008), Glukokortikoidrezeptoren (Tao *et al.*, 2006) und eIF1A (eukaryotic translokation initiation factor 1A) (Grünwald *et al.*, 2013) beteiligt. Ataxin-3 wurde bisher nicht als Transportladung von Importin 13 beschrieben.

Sowa *et al.* beobachteten in Ataxin-3-produzierenden HEK-Zellen eine verminderte Menge nukleärer Aggregate bei einer Überexpression von *IPO13*, jedoch keine Veränderung der allgemeinen intrazellulären Lokalisation von Ataxin-3. Eine Über- oder Unterexpression von *IPO13* im SCA3-Drosophila-Modell zeigte keinen Einfluss auf die Überlebensdauer oder die Augenmorphologie als Indikator für die Neurodegeneration, senkte jedoch die Zahl der Nachkommen erheblich (Sowa *et al.*, 2018). You *et al.* berichteten, dass Importin 13 während der embryonalen Entwicklung von Mäusen

in neuronalen Zellen zunächst intrazellulär lokalisiert ist, in späteren Stadien jedoch hauptsächlich extrazellulär (You et al., 2013). Sowa *et al.* schlossen daraus, dass ein Importin 13-abhängiger Transport von Ataxin-3 möglicherweise nur in spezifischen Phasen der Hirnentwicklung stattfindet. Bevor Importin 13 jedoch überhaupt als therapeutisches Target in Frage kommt, sollte geklärt werden, wodurch die verminderte Nachkommenzahl im SCA3-Drosophila-Modell verursacht wird und ob in anderen Spezies ähnliche Phänomene beobachtet werden (Sowa et al., 2018).

4.7 Der SNP *CRM1* Prom308 scheint keine Rolle bei der SCA3 zu spielen

Bei dem Polymorphismus *CRM1* Prom308 wiesen die Patienten mit der häufigeren homozygoten Variante ein um durchschnittlich 2,5 Jahre höheres Erkrankungsalter auf als die Patienten mit der selteneren homozygoten Variante. In der Kovarianzanalyse zeigte sich kein signifikanter Einfluss des SNP auf das Erkrankungsalter. Der Polymorphismus *CRM1* Prom308 wurde von Liu *et al.* im Zusammenhang mit Autismus-Spektrum-Störungen untersucht, es wurde jedoch keine Korrelation festgestellt. Ein anderer SNP in *CRM1* (rs6735330) zeigte einen Zusammenhang zwischen dem häufigeren G-Allel und schwereren Defiziten in der sozialen Interaktion sowie der verbalen Kommunikation bei Autismus-Spektrum-Störungen (Liu et al., 2011). Es wurden bisher keine Polymorphismen von *CRM1* im Zusammenhang mit dem Erkrankungsalter von SCA3 beschrieben.

CRM1 kodiert für das Protein Exportin 1, dieses gehört wie Importin 13 zu der Karyopherin- β -Proteinfamilie und transportiert nach aktuellem Stand 259 verschiedene Proteine und RNAs vom Zellkern ins Zytoplasma eukaryotischer Zellen (21.03.2019) (Xu et al., 2012). Auch in den Proteinen Huntingtin und Ataxin 7, welche eine Schlüsselrolle bei den neurodegenerativen Erkrankungen HD und SCA7 spielen, wurde ein hochkonserviertes *CRM1*-abhängiges NES gefunden (Taylor et al., 2006, Maiuri et al., 2013). Macedo-Ribeiro *et al.* wiesen nach, dass Exportin 1 mit der nukleären Exportsequenz von Ataxin-3 interagiert, es jedoch auch einen Exportin 1-unabhängigen Transport gibt. In Zellkultur wurde durch eine Inhibition von *CRM1* mittels Leptomycin B die Akkumulation von Ataxin-3 im Zellkern verstärkt (Macedo-Ribeiro et al., 2009). Chan *et al.* zeigten in einer Drosophila Studie, dass das Protein EGFP (enhanced green fluorescent protein) mittels Knockout von *CRM1* vermehrt im Zellkern akkumulierte wenn es einen verlängerten Polyglutaminstrang (75xQ) enthielt, dieser Effekt

jedoch nicht auftrat, wenn der Polyglutaminstrang die normale Länge (27xQ) aufwies. Die Exportaktivität von Exportin 1 schien also spezifisch für den Polyglutaminstrang zu sein (Chan et al., 2011). Sowa *et al.* beobachteten im SCA3-Drosophila-Modell bei einer Überexpression oder einem Knockout von *CRM1* keinen Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation von Ataxin-3. Ein Knockout hatte jedoch verheerende Einflüsse auf die Augenmorphologie und das Überleben, während eine Überexpression das Überleben deutlich verbesserte (Sowa et al., 2018). Es wäre daher denkbar, dass Promotor-Polymorphismen, welche zu einer verminderten Expression von Exportin 1 führen, die Krankheitssymptome von SCA3-Patienten verschlimmern. Eine Untersuchung weiterer Promotor-Polymorphismen wäre daher interessant, auch im Hinblick auf die Vorhersage des Erkrankungsalters. Exportin 1 gilt jedoch als onkogen und antiapoptotisch. Eine abnorm hohe Expression von Exportin 1 ist in verschiedenen malignen Erkrankungen mit einer schlechten Prognose assoziiert, es werden sogar Inhibitoren von Exportin 1 in Krebstherapien eingesetzt (Ishizawa et al., 2015). Die Rolle von Exportin 1 als therapeutisches Target bei SCA3 ist somit fragwürdig, da den bisherigen Erkenntnissen zufolge zur Symptombesserung eher eine Agonisierung von Exportin 1 nötig wäre, was wiederum die Gefahr von malignen Erkrankungen begünstigen könnte.

4.8 Der SNP *KPNA3* Prom43 modifiziert das Erkrankungsalter von SCA3 Patienten

KPNA3 kodiert für das Protein Karyopherin alpha 3, dieses ist am aktiven Proteintransport vom Zytoplasma in den Zellkern beteiligt. Es erkennt und bindet seine Ladungen durch deren NLS, bindet anschließend an Nucleoporin und wird mittels Translokation zusammen mit seiner Ladung in den Zellkern transportiert (Nachury et al., 1998). Als Kofaktor dient u.a. das Protein Karyopherin Subunit beta 1, dessen Gen *KPNB1* in dieser Studie ebenfalls untersucht wurde, jedoch nicht etabliert werden konnte. Karyopherin alpha 3 transportiert u.a. MeCP2 (Methyl-CpG binding protein 2), ein nukleäres Protein, welches im Zellkern mit Chromatin interagiert und beim Rett-Syndrom, einer Erkrankung aus dem Bereich der Autismus-Spektrumsstörungen, mutiert ist (Baker et al., 2015). Versuche in Zellkultur zeigten bei einer Überexpression von *KPNA3* eine gesteigerte nukleäre Lokalisation von Ataxin-3, eine vermehrte Aggregatbildung, sowie eine sinkende Viabilität der Zellen. Mittels

Knockout von *KPNA3* konnte Ataxin-3 wiederum im Zytoplasma gehalten werden. In Versuchen mit einem SCA3-Drosophila-Modell führte ein Knockout von *KPNA3* zu einer verminderten Neurodegeneration und einer mildereren Symptomatik. Im Mausmodell mit SCA3/*KPNA3*-Knockout Mäusen zeigte sich ebenfalls eine Besserung verschiedener SCA3-Symptome wie das Gangbild und die Hyperaktivität, zudem wurden weniger Aggregationen im Zellkern sichtbar (Sowa et al., 2018).

In dieser Studie wurden drei Einzelnukleotidpolymorphismen von *KPNA3* untersucht: *KPNA3* Prom43, *KPNA3* Prom35 und *KPNA3* In5. Letzterer befindet sich auf einem Intron und wurde bereits als modifizierender Faktor bei Schizophrenie, Opiatabhängigkeit, Alkoholabhängigkeit und Depression beschrieben (Morris et al., 2012, Wei and Hemmings, 2005). Es zeigte sich jedoch kein Zusammenhang zwischen diesem Polymorphismus und dem Erkrankungsalter der untersuchten SCA3-Patienten.

Bei einem der beiden Promotor-Polymorphismen zeigte sich ein statistisch signifikanter Einfluss, bei dem anderen nicht. Der Einfluss der Haplotypen von Prom35 und Prom43 war ebenfalls statistisch signifikant, jedoch konnte ein Teil der Patienten keinem der Haplotypen zugeordnet werden und wurde daher ausgeschlossen.

Bei der Kontrolle der Typisierungsergebnisse auf Vereinbarkeit mit dem HWE mittels Chi Quadrat Test zeigte sich bei dem Polymorphismus *KPNA3* Prom35 keine Vereinbarkeit, da mehr Patienten der häufigeren homozygoten Variante zugeordnet wurden als laut HWE zu erwarten wäre. Zum einen kann ein Fehler in der Typisierung nicht ausgeschlossen werden, zum anderen könnte dies auf einen Selektionsvorteil durch die häufigere homozygote Variante bei SCA3 Patienten hindeuten. Diese ging in der Auswertung mit einem höheren durchschnittlichen Erkrankungsalter einher. Chen et al. zeigten, dass in Genotypisierungsstudien eine fehlende HWE-Vereinbarkeit durch eine zu geringe Heterozygoten-Frequenz seltener mit einem Typisierungsfehler einhergeht als bei einer zu hohen Heterozygoten-Frequenz (Chen et al., 2017). Da es sich in der untersuchten Population zudem um Patienten einer speziellen, seltenen Krankheitsentität und nicht um eine zufällige Auswahl handelte, wurden die Typisierungsergebnisse des SNP *KPNA3* Prom35 zunächst weiter in der Auswertung berücksichtigt. Darüber hinaus wurde kürzlich ein weiterer Promotor-SNP, rs11618521/ *KPNA3* Prom21, typisiert, dabei zeigte sich ebenfalls ein signifi-

kanter Einfluss auf das Erkrankungsalter von SCA3-Patienten (unveröffentlicht von Dieterle *et al.*).

Durch die Arbeit von Sowa *et al.* kann vermutet werden, dass eine verminderte Expression von *KPNA3* sich positiv auf SCA3-Patienten auswirken müsste (Sowa *et al.*, 2018). Durch die Typisierungsergebnisse in dieser Arbeit erscheint es, als ob *KPNA3* weniger exprimiert wird, wenn ein T-Allel des SNP Prom43 vorliegt, da Patienten mit einem T/T-Genotyp im Durchschnitt 2,2 Jahre später erkrankten als Patienten mit einem G/G-Genotyp. Ein *in silico*-Screening nach Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren in der Region über dem SNP Prom43 mithilfe des TFBIND-Programm zeigte jedoch, dass unabhängig davon, ob ein G-Allel oder ein T-Allel vorliegt, die gleiche Anzahl TFBS (Transcription Factor Binding Sites) vorhanden ist (Tsunoda and Takagi, 1999).

Der nächste Schritt zur Beantwortung der Frage, ob die Polymorphismen die Expression von *KPNA3* beeinflussen, so wie es die Ergebnisse suggerieren, wären funktionelle Analysen in Zellkultur. Da allein zwei Prozent der Streuung des Erkrankungsalters durch den Polymorphismus Prom43 erklärt werden können, erscheint es auch denkbar, diesen und weitere Polymorphismen in ein Rechenmodell zur Eingrenzung des Erkrankungsalters bei asymptomatischen Mutationsträgern einzubeziehen. Der Einfluss durch den SNP Prom35, sowie durch die Haplotypen von Prom43 und Prom35 sollte jedoch zunächst bei anderen Patienten bestätigt werden, da letztendlich nicht sicher bestimmt werden kann, wodurch die Abweichung vom HWE beim SNP Prom35 verursacht wurde.

4.9 Schlussfolgerung

Für den Polymorphismus *IPO13* Prom53 des Transportproteins Importin 13 konnte kein statistisch signifikanter Einfluss auf das Erkrankungsalter der SCA3-Patienten gezeigt werden. Es zeigte sich jedoch eine Differenz des durchschnittlichen Erkrankungsalters von 3,9 Jahren zwischen der häufigen und selteneren homozygoten Variante, sodass das nicht erreichte Signifikanzniveau wohlmöglich an der zu kleinen Fallzahl lag. Eine Wiederholung in größerer Fallzahl könnte die Frage abschließend klären. Eine Veränderung der Expression von Importin 13 im SCA3-Dosophila-Modell führte jedoch zu einer stark verminderten Zahl von Nachkommen, sodass Importin 13 als therapeutisches Target fragwürdig erscheint.

Der Polymorphismus *CRM1* Prom308 zeigte keinen Einfluss auf das Erkrankungsalter der SCA3-Patienten. Da jedoch *in vivo* Versuche gezeigt haben, dass Exportin-1 mit Ataxin-3 interagiert, liegt die Vermutung nahe, dass eine veränderte Expression von *CRM1* einen Einfluss auf die Symptomatik von SCA3-Patienten haben könnte. Zur weiteren Beleuchtung der Fragestellung könnten weitere Promotor-Polymorphismen von *CRM1* untersucht werden.

Der Promotor-Polymorphismus *KPNA3* Prom43 zeigte einen signifikanten Einfluss auf das Erkrankungsalter der SCA3-Patienten. Bei Betrachtung der Haplotypen von Prom35 und Prom43 zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Einfluss. Die Typisierungsergebnisse von *KPNA3* Prom35 waren nicht mit dem HWE vereinbar, eine Wiederholung der Analyse für Prom35 zur Bestätigung der Beobachtungen erscheint daher sinnvoll. Der Polymorphismus Prom43 konnte allein betrachtet ein Prozent der Variabilität des Erkrankungsalters erklären. Insgesamt erscheint es möglich, dass die Polymorphismen die Expression von *KPNA3* beeinflussen, daher wäre der nächste Schritt eine funktionelle Analyse in Zellkultur zur Bestätigung der Vermutung. Für die Berechnung des Erkrankungsalters könnte ein Modell in Betracht gezogen werden, welches alle bisher identifizierten modifizierenden Faktoren einbezieht, da die meisten Faktoren allein betrachtet nur einen niedrigen Einfluss im einstelligen Prozentbereich zeigen. Möglicherweise kann aber deren Zusammenspiel eine praxisrelevante Berechnung des Erkrankungsalters ermöglichen.

5 Zusammenfassung

Die Spinozerebelläre Ataxie Typ 3 ist eine autosomal dominant vererbte, neurodegenerative Erkrankung, deren Ursache eine verlängerte CAG-Wiederholungssequenz im *ATXN3*-Gen ist. Das Erkrankungsalter variiert sehr stark und korreliert linear negativ mit der Anzahl der CAG-Wiederholungen im langen *ATXN3*-Allel. Die CAG-Anzahl verursacht 50-80 % der Variabilität des Erkrankungsalters, für den übrigen Anteil sind demnach unbekannte genetische- oder Umweltfaktoren verantwortlich. Ataxin-3 wird in Neuronen exprimiert, es ist hauptsächlich zytoplasmatisch lokalisiert. Wie bei anderen Polyglutaminerkrankungen, zu denen die SCA3 gehört, finden sich in manchen Hirnregionen von Patienten unlösliche nukleäre Inklusionen, welche u.a. aus fehlgefaltetem, verlängertem Ataxin-3 bestehen und am Untergang der Nervenzellen beteiligt zu sein scheinen. Der nukleozytoplasmatische Transport großer Proteine erfolgt über Karyopherine. Im SCA3-Mausmodell zeigte sich bei einem Knockout des Karyopherins alpha 3 (*KPNA3*) eine mildere Symptomatik und weniger Inklusionen. Die Expression von Genen kann durch Polymorphismen in Promotorregionen moduliert werden, etwa durch Sequenzunterschiede innerhalb von Bindestellen für Transkriptionsfaktoren. Zur Identifikation genetischer Einflussfaktoren für das Erkrankungsalter wurden daher Promotor-SNPs verschiedener Transportproteine hinsichtlich ihres Einflusses auf das Erkrankungsalter von SCA3-Patienten untersucht. Es wurden 434 DNA-Proben von SCA3-Patienten mittels High Resolution Melting für fünf SNPs genotypisiert und deren Einfluss auf das Erkrankungsalter mittels Kovarianzanalyse ermittelt. Der *KPNA3*-SNP rs9535343 zeigte einen signifikanten Einfluss auf das Erkrankungsalter der SCA3-Patienten, 1 % der Variabilität des Erkrankungsalters konnte auf diesen zurückgeführt werden. Der *KPNA3*-SNP rs12868235 liegt nur 254 bp von letzterem entfernt, die beiden SNPs werden somit wahrscheinlich gekoppelt vererbt. rs12868235 zeigte zwar keinen signifikanten Einfluss auf das Erkrankungsalter, jedoch die Haplotypen der beiden SNPs. Der nächste Schritt wäre eine funktionelle Analyse zur Bestätigung der veränderten Expression durch die Polymorphismen. Zudem könnte der Einfluss von rs9535343 zusammen mit anderen identifizierten SNPs genutzt werden, um das voraussichtliche Erkrankungsalter präsymptomatischer Mutationsträger zu berechnen.

6 Literaturverzeichnis

- ANTONY, P. M., MANTELE, 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, 280-92.
- BAKER, S. A., LOMBARDI, L. M. & ZOGHBI, H. Y. 2015. Karyopherin alpha 3 and karyopherin alpha 4 proteins mediate the nuclear import of methyl-CpG binding protein 2. *J Biol Chem*, 290, 22485-93.
- BETTENCOURT, C. & LIMA, M. 2011. Machado-Joseph Disease: from first descriptions to new perspectives. *Orphanet J Rare Dis*, 6, 35.
- BETTENCOURT, C., RAPOSO, M., KAZACHKOVA, N., CYMBRON, T., SANTOS, C., KAY, T., VASCONCELOS, J., MACIEL, P., DONIS, K. C., SARAIVA-PEREIRA, M. L., JARDIM, L. B., SEQUEIROS, J. & LIMA, M. 2011. The APOE epsilon2 allele increases the risk of earlier age at onset in Machado-Joseph disease. *Arch Neurol*, 68, 1580-3.
- BICHELMEIER, U., SCHMIDT, T., HUBENER, J., BOY, J., RUTTIGER, L., HABIG, K., POTHS, S., BONIN, M., KNIPPER, M., SCHMIDT, W. J., 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, 7418-28.
- BOTEZ, M. I., BOTEZ-MARQUARD, T., ELIE, R., PEDRAZA, O. L., GOYETTE, K. & LALONDE, R. 1996. Amantadine hydrochloride treatment in hereditary degenerative ataxias: a double blind study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 61, 259-64.
- BOTEZ, M. I., YOUNG, S. N., BOTEZ, T. & PEDRAZA, O. L. 1991. Treatment of hereditary degenerative ataxias with amantadine hydrochloride. *Can J Neurol Sci*, 18, 307-11.
- CHAN, W. M., TSOI, H., WU, C. C., WONG, C. H., CHENG, T. C., LI, H. Y., LAU, K. F., SHAW, P. C., PERRIMON, N. & CHAN, H. Y. 2011. Expanded polyglutamine domain possesses nuclear export activity which modulates subcellular localization and toxicity of polyQ disease protein via exportin-1. *Hum Mol Genet*, 20, 1738-50.
- CHEN, B., COLE, J. W. & GROND-GINSBACH, C. 2017. Departure from Hardy Weinberg Equilibrium and Genotyping Error. *Front Genet*, 8, 167.
- CHEN, S., GAN, S. R., CAI, P. P., NI, W., ZHOU, Q., DONG, Y., WANG, N. & WU, Z. Y. 2016. Mitochondrial NADH Dehydrogenase Subunit 3 Polymorphism Associated with an Earlier Age at Onset in Male Machado-Joseph disease Patients. *CNS Neurosci Ther*, 22, 38-42.
- COARELLI, G., BRICE, A. & DURR, A. 2018. Recent advances in understanding dominant spinocerebellar ataxias from clinical and genetic points of view. *F1000Res*, 7.
- COOK, A., BONO, F., JINEK, M. & CONTI, E. 2007. Structural biology of nucleocytoplasmic transport. *Annu Rev Biochem*, 76, 647-71.
- COPPEDE, F., MIGHELI, F., CERAVOLO, R., BREGANT, E., ROCCHI, A., PETROZZI, L., UNTI, E., LONIGRO, R., SICILIANO, G. & MIGLIORE, L. 2010. The hOGG1 Ser326Cys polymorphism and Huntington's disease. *Toxicology*, 278, 199-203.

- D'ABREU, A., FRANCA, M., JR., CONZ, L., FRIEDMAN, J. H., NUCCI, A. M., CENDES, F. & LOPES-CENDES, I. 2009. Sleep symptoms and their clinical correlates in Machado-Joseph disease. *Acta Neurol Scand*, 119, 277-80.
- DENG, G. R. 1988. A sensitive non-radioactive PCR-RFLP analysis for detecting point mutations at 12th codon of oncogene c-Ha-ras in DNAs of gastric cancer. *Nucleic Acids Res*, 16, 6231.
- DWIGHT, Z., PALAIS, R. & WITTEWER, C. T. 2011. uMELT: prediction of high-resolution melting curves and dynamic melting profiles of PCR products in a rich web application. *Bioinformatics*, 27, 1019-20.
- ELLISDON, A. M., THOMAS, B. & BOTTOMLEY, S. P. 2006. The two-stage pathway of ataxin-3 fibrillogenesis involves a polyglutamine-independent step. *J Biol Chem*, 281, 16888-96.
- ERALI, M., VOELKERDING, K. V. & WITTEWER, C. T. 2008. High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. *Exp Mol Pathol*, 85, 50-8.
- ERICHSEN, A. K., KOHT, J., STRAY-PEDERSEN, A., ABDELNOOR, M. & TALLAKSEN, C. M. 2009. Prevalence of hereditary ataxia and spastic paraplegia in southeast Norway: a population-based study. *Brain*, 132, 1577-88.
- FENG, L., CHEN, D. B., HOU, L., HUANG, L. H., LU, S. Y., LIANG, X. L. & LI, X. H. 2014. Cognitive impairment in native Chinese with spinocerebellar ataxia type 3. *Eur Neurol*, 71, 262-70.
- FORTEYN, E. M., SCHMITZ-HUBSCH, T., VERSTAPPEN, C. C., BALIKO, L., BLOEM, B. R., BOESCH, S., BUNN, L., CHARLES, P., DURR, A., FILLA, A., GIUNTI, P., GLOBAS, C., KLOCKGETHER, T., MELEGH, B., PANDOLFO, M., DE ROSA, A., SCHOLS, L., TIMMANN, D., MUNNEKE, M., KREMER, B. P. & VAN DE WARRENBURG, B. P. 2010. Falls in spinocerebellar ataxias: Results of the EuroSCA Fall Study. *Cerebellum*, 9, 232-9.
- FRANCA, M. C., JR., D'ABREU, A., NUCCI, A. & LOPES-CENDES, I. 2008. Muscle excitability abnormalities in Machado-Joseph disease. *Arch Neurol*, 65, 525-9.
- GASPAR, C., LOPES-CENDES, I., HAYES, S., GOTO, J., ARVIDSSON, K., DIAS, A., SILVEIRA, I., MACIEL, P., COUTINHO, P., LIMA, M., ZHOU, Y. X., SOONG, B. W., WATANABE, M., GIUNTI, P., STEVANIN, G., RIESS, O., SASAKI, H., HSIEH, M., NICHOLSON, G. A., BRUNT, E., HIGGINS, J. J., LAURITZEN, M., TRANEBJAERG, L., VOLPINI, V., WOOD, N., RANUM, L., TSUJI, S., BRICE, A., SEQUEIROS, J. & ROULEAU, G. A. 2001. Ancestral origins of the Machado-Joseph disease mutation: a worldwide haplotype study. *Am J Hum Genet*, 68, 523-8.
- GATCHEL, J. R. & ZOGHBI, H. Y. 2005. Diseases of unstable repeat expansion: mechanisms and common principles. *Nat Rev Genet*, 6, 743-55.
- GENOMES PROJECT, C., ABECASIS, G. R., ALTSHULER, D., AUTON, A., BROOKS, L. D., DURBIN, R. M., GIBBS, R. A., HURLES, M. E. & MCVEAN, G. A. 2010. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*, 467, 1061-73.
- GLOBAS, C., DU MONTCEL, S. T., BALIKO, L., BOESCH, S., DEPOND, C., DIDONATO, S., DURR, A., FILLA, A., KLOCKGETHER, T., MARIOTTI, C., MELEGH, B., RAKOWICZ, M., RIBAI, P., ROLA, R., SCHMITZ-HUBSCH, T., SZYMANSKI, S., TIMMANN, D., VAN DE WARRENBURG, B. P., BAUER, P.

- & SCHOLS, L. 2008. Early symptoms in spinocerebellar ataxia type 1, 2, 3, and 6. *Mov Disord*, 23, 2232-8.
- GRÜNWARD, M., LAZZARETTI, D. & BONO, F. 2013. Structural basis for the nuclear export activity of Importin13. *EMBO J*, 32, 899-913.
- HAAS, D. M., DANTZER, J., LEHMANN, A. S., PHILIPS, S., SKAAR, T. C., MCCORMICK, C. L., HEBBRING, S. J., JUNG, J. & LI, L. 2013. The impact of glucocorticoid polymorphisms on markers of neonatal respiratory disease after antenatal betamethasone administration. *Am J Obstet Gynecol*, 208, 215 e1-6.
- HABBAL, W., MONEM, F. & GARTNER, B. C. 2008. Optimization of human cytomegalovirus LightCycler real-time PCR. *J Infect Dev Ctries*, 2, 406-10.
- 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, 196-202.
- INTERNATIONAL HAPMAP, C. 2003. The International HapMap Project. *Nature*, 426, 789-96.
- ISHIZAWA, J., KOJIMA, K., HAIL, N., JR., TABE, Y. & ANDREEFF, M. 2015. Expression, function, and targeting of the nuclear exporter chromosome region maintenance 1 (CRM1) protein. *Pharmacol Ther*, 153, 25-35.
- JACOBI, H., BAUER, P., GIUNTI, P., LABRUM, R., SWEENEY, M. G., CHARLES, P., DURR, A., MARELLI, C., GLOBAS, C., LINNEMANN, C., SCHOLS, L., RAKOWICZ, M., ROLA, R., ZDZIENICKA, E., SCHMITZ-HUBSCH, T., FANCELLU, R., MARIOTTI, C., TOMASELLO, C., BALIKO, L., MELEGH, B., FILLA, A., RINALDI, C., VAN DE WARRENBURG, B. P., VERSTAPPEN, C. C., SZYMANSKI, S., BERCIANO, J., INFANTE, J., TIMMANN, D., BOESCH, S., HERING, S., DEPONDT, C., PANDOLFO, M., KANG, J. S., RATZKA, S., SCHULZ, J., TEZENAS DU MONTCEL, S. & KLOCKGETHER, T. 2011. The natural history of spinocerebellar ataxia type 1, 2, 3, and 6: a 2-year follow-up study. *Neurology*, 77, 1035-41.
- KAWAGUCHI, Y., OKAMOTO, T., TANIWAKI, M., AIZAWA, M., INOUE, M., KATAYAMA, S., KAWAKAMI, H., NAKAMURA, S., NISHIMURA, M., AKIGUCHI, I. & ET AL. 1994. CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet*, 8, 221-8.
- KAWAI, Y., TAKEDA, A., ABE, Y., WASHIMI, Y., TANAKA, F. & SOBUE, G. 2004. Cognitive impairments in Machado-Joseph disease. *Arch Neurol*, 61, 1757-60.
- 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, 996-1006.
- KLOCKGETHER, T., LUDTKE, R., KRAMER, B., ABELE, M., BURK, K., SCHOLS, L., RIESS, O., LACCONE, F., BOESCH, S., LOPES-CENDES, I., BRICE, A., INZELBERG, R., ZILBER, N. & DICHGANS, J. 1998. The natural history of degenerative ataxia: a retrospective study in 466 patients. *Brain*, 121 (Pt 4), 589-600.
- KUEMMERLE, S., GUTEKUNST, C. A., KLEIN, A. M., LI, X. J., LI, S. H., BEAL, M. F., HERSCH, S. M. & FERRANTE, R. J. 1999. Huntington aggregates may not predict neuronal death in Huntington's disease. *Ann Neurol*, 46, 842-9.
- LEI, L. F., YANG, G. P., WANG, J. L., CHUANG, D. M., SONG, W. H., TANG, B. S. & JIANG, H. 2016. Safety and efficacy of valproic acid treatment in SCA3/MJD patients. *Parkinsonism Relat Disord*, 26, 55-61.

- LERER, I., MERIMS, D., ABELIOVICH, D., ZLOTOGORA, J. & GADOTH, N. 1996. Machado-Joseph disease: correlation between the clinical features, the CAG repeat length and homozygosity for the mutation. *Eur J Hum Genet*, 4, 3-7.
- 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.
- LIANG, J., KE, G., YOU, W., PENG, Z., LAN, J., KALESSE, M., TARTAKOFF, A. M., KAPLAN, F. & TAO, T. 2008. Interaction between importin 13 and myopodin suggests a nuclear import pathway for myopodin. *Mol Cell Biochem*, 307, 93-100.
- LIEW, M., PRYOR, R., PALAIS, R., MEADOWS, C., ERALI, M., LYON, E. & WITTEWER, C. 2004. Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. *Clin Chem*, 50, 1156-64.
- LIEW, M., SEIPP, M., DURTSCHI, J., MARGRAF, R. L., DAMES, S., ERALI, M., VOELKERDING, K. & WITTEWER, C. 2007. Closed-tube SNP genotyping without labeled probes/a comparison between unlabeled probe and amplicon melting. *Am J Clin Pathol*, 127, 341-8.
- LIU, X., MALENFANT, P., REESOR, C., LEE, A., HUDSON, M. L., HARVARD, C., QIAO, Y., PERSICO, A. M., COHEN, I. L., CHUDLEY, A. E., FORSTER-GIBSON, C., RAJCAN-SEPAROVIC, E., LEWIS, M. E. & HOLDEN, J. J. 2011. 2p15-p16.1 microdeletion syndrome: molecular characterization and association of the OTX1 and XPO1 genes with autism spectrum disorders. *Eur J Hum Genet*, 19, 1264-70.
- LONG, Z., CHEN, Z., WANG, C., HUANG, F., PENG, H., HOU, X., DING, D., YE, W., WANG, J., PAN, Q., LI, J., XIA, K., TANG, B., ASHIZAWA, T. & JIANG, H. 2015. Two novel SNPs in ATXN3 3' UTR may decrease age at onset of SCA3/MJD in Chinese patients. *PLoS One*, 10, e0117488.
- MACEDO-RIBEIRO, S., CORTES, L., MACIEL, P. & CARVALHO, A. L. 2009. Nucleocytoplasmic shuttling activity of ataxin-3. *PLoS One*, 4, e5834.
- MACIEL, P., GASPAS, C., DESTEFANO, A. L., SILVEIRA, I., COUTINHO, P., RADVANY, J., DAWSON, D. M., SUDARSKY, L., GUIMARAES, J., LOUREIRO, J. E. & ET AL. 1995. Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease. *Am J Hum Genet*, 57, 54-61.
- MAIURI, T., WOLOSHANSKY, T., XIA, J. & TRUANT, R. 2013. The huntingtin N17 domain is a multifunctional CRM1 and Ran-dependent nuclear and ciliary export signal. *Hum Mol Genet*, 22, 1383-94.
- MARTINEZ, A. R., NUNES, M. B., FABER, I., D'ABREU, A., LOPES-CENDES, I. & FRANCA, M. C., JR. 2017. Fatigue and Its Associated Factors in Spinocerebellar Ataxia Type 3/Machado-Joseph Disease. *Cerebellum*, 16, 118-121.
- MATOS, C. A., DE MACEDO-RIBEIRO, S. & CARVALHO, A. L. 2011. Polyglutamine diseases: the special case of ataxin-3 and Machado-Joseph disease. *Prog Neurobiol*, 95, 26-48.
- METZGER, S., BAUER, P., TOMIUK, J., LACCONE, F., DIDONATO, S., GELLERA, C., SOLIVERI, P., LANGE, H. W., WEIRICH-SCHWAIGER, H., WENNING, G. K., MELEGH, B., HAVASI, V., BALIKO, L., WIECZOREK, S., ARNING, L., ZAREMBA, J., SULEK, A., HOFFMAN-ZACHARSKA, D., BASAK, A. N., ERSOY, N., ZIDOVSKA, J., KEBRDLOVA, V., PANDOLFO, M., RIBAI, P.,

- KADASI, L., KVASNICOVA, M., WEBER, B. H., KREUZ, F., DOSE, M., STUHRMANN, M. & RIESS, O. 2006. The S18Y polymorphism in the UCHL1 gene is a genetic modifier in Huntington's disease. *Neurogenetics*, 7, 27-30.
- MORO, A., MUNHOZ, R. P., ARRUDA, W. O., RASKIN, S., MOSCOVICH, M. & TEIVE, H. A. 2014. Spinocerebellar ataxia type 3: subphenotypes in a cohort of Brazilian patients. *Arq Neuropsiquiatr*, 72, 659-62.
- MORRIS, C. P., BAUNE, B. T., DOMSCHKE, K., AROLT, V., SWAGELL, C. D., HUGHES, I. P., LAWFORDE, B. R., MC, D. Y. R. & VOISEY, J. 2012. KPNA3 variation is associated with schizophrenia, major depression, opiate dependence and alcohol dependence. *Dis Markers*, 33, 163-70.
- MUELLER, T., BREUER, P., SCHMITT, I., WALTER, J., EVERT, B. O. & WULLNER, U. 2009. CK2-dependent phosphorylation determines cellular localization and stability of ataxin-3. *Hum Mol Genet*, 18, 3334-43.
- NACHURY, M. V., RYDER, U. W., LAMOND, A. I. & WEIS, K. 1998. Cloning and characterization of hSRP1 gamma, a tissue-specific nuclear transport factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 582-7.
- NAKANO, K. K., DAWSON, D. M. & SPENCE, A. 1972. Machado disease. A hereditary ataxia in Portuguese emigrants to Massachusetts. *Neurology*, 22, 49-55.
- OPAL, P. & ZOGHBI, H. Y. *The spinocerebellar ataxias* [Online]. UpToDate, Post TW (Ed), UpToDate, Waltham, MA.: UpToDate. [Accessed Jan 06 2017].
- PATI, N., SCHOWINSKY, V., KOKANOVIC, O., MAGNUSON, V. & GHOSH, S. 2004. A comparison between SNaPshot, pyrosequencing, and biplex invader SNP genotyping methods: accuracy, cost, and throughput. *J Biochem Biophys Methods*, 60, 1-12.
- PAULSON, H. L., DAS, S. S., CRINO, P. B., PEREZ, M. K., PATEL, S. C., GOTSDINER, D., FISCHBECK, K. H. & PITTMAN, R. N. 1997. Machado-Joseph disease gene product is a cytoplasmic protein widely expressed in brain. *Ann Neurol*, 41, 453-62.
- PEMBERTON, L. F. & PASCHAL, B. M. 2005. Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic*, 6, 187-98.
- PENG, H., WANG, C., CHEN, Z., SUN, Z., JIAO, B., LI, K., HUANG, F., HOU, X., WANG, J., SHEN, L., XIA, K., TANG, B. & JIANG, H. 2014. APOE epsilon2 allele may decrease the age at onset in patients with spinocerebellar ataxia type 3 or Machado-Joseph disease from the Chinese Han population. *Neurobiol Aging*, 35, 2179 e15-8.
- RAMOS, A., PLANCHAT, M., VIEIRA MELO, A. R., RAPOSO, M., SHAMIM, U., SUROLIYA, V., SRIVASTAVA, A. K., FARUQ, M., MORINO, H., OHSAWA, R., KAWAKAMI, H., BANNACH JARDIM, L., SARAIVA-PEREIRA, M. L., VASCONCELOS, J., SANTOS, C. & LIMA, M. 2019. Mitochondrial DNA haplogroups and age at onset of Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3: a study in patients from multiple populations. *Eur J Neurol*, 26, 506-512.
- REED, G. H. & WITTEWER, C. T. 2004. Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. *Clin Chem*, 50, 1748-54.
- REINA, C. P., ZHONG, X. & PITTMAN, R. N. 2010. Proteotoxic stress increases nuclear localization of ataxin-3. *Hum Mol Genet*, 19, 235-49.

- RISTORI, G., ROMANO, S., VISCONTI, A., CANNONI, S., SPADARO, M., FRONTALI, M., PONTIERI, F. E., VANACORE, N. & SALVETTI, M. 2010. Riluzole in cerebellar ataxia: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot trial. *Neurology*, 74, 839-45.
- ROCHE-DIAGNOSTICS, R. 2008. *Lightcycler480 Real Time PCR System, Mannheim (Germany), Technical note no.1, High Resolution Melting: Optimization Strategies* [Online]. [Internet]. Available: <https://lifescience.roche.com/documents/High-Resolution-Melting-Optimization-Strategies.pdf> [Accessed 2015].
- ROMANO, S., COARELLI, G., MARCOTULLI, C., LEONARDI, L., PICCOLO, F., SPADARO, M., FRONTALI, M., FERRALDESCHI, M., VULPIANI, M. C., PONZELLI, F., SALVETTI, M., ORZI, F., PETRUCCI, A., VANACORE, N., CASALI, C. & RISTORI, G. 2015. Riluzole in patients with hereditary cerebellar ataxia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol*, 14, 985-91.
- ROSENBERG, R. N., NYHAN, W. L., BAY, C. & SHORE, P. 1976. Autosomal dominant striatonigral degeneration. A clinical, pathologic, and biochemical study of a new genetic disorder. *Neurology*, 26, 703-14.
- RUANO, L., MELO, C., SILVA, M. C. & COUTINHO, P. 2014. The global epidemiology of hereditary ataxia and spastic paraplegia: a systematic review of prevalence studies. *Neuroepidemiology*, 42, 174-83.
- SANGER, F. & COULSON, A. R. 1978. The use of thin acrylamide gels for DNA sequencing. *FEBS Lett*, 87, 107-10.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-7.
- SAUTE, J. A., RIEDER, C. R., CASTILHOS, R. M., MONTE, T. L., SCHUMACHER-SCHUH, A. F., DONIS, K. C., D'AVILA, R., SOUZA, G. N., RUSSO, A. D., FURTADO, G. V., GHENO, T. C., SOUZA, D. O., SARAIVA-PEREIRA, M. L., PORTELA, L. V., CAMEY, S., TORMAN, V. B. & JARDIM, L. B. 2015. Planning future clinical trials in Machado Joseph disease: Lessons from a phase 2 trial. *J Neurol Sci*, 358, 72-6.
- SCHMIDT, J., SCHMIDT, T., GOLLA, M., LEHMANN, L., WEBER, J. J., HUBENER-SCHMID, J. & RIESS, O. 2016. In vivo assessment of riluzole as a potential therapeutic drug for spinocerebellar ataxia type 3. *J Neurochem*, 138, 150-62.
- SCHMIDT, T., LANDWEHRMEYER, G. B., SCHMITT, I., TROTTIER, Y., AUBURGER, G., LACCONE, F., KLOCKGETHER, T., VOLPEL, M., EPPLEN, J. T., SCHOLS, 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, 669-79.
- SCHÖLS, L., AMOIRIDIS, G., BUTTNER, T., PRZUNTEK, H., EPPLEN, J. T. & RIESS, O. 1997. Autosomal dominant cerebellar ataxia: phenotypic differences in genetically defined subtypes? *Ann Neurol*, 42, 924-32.
- SCHÖLS, L., AMOIRIDIS, G., LANGKAFEL, M., BUTTNER, T., PRZUNTEK, H., RIESS, O., VIEIRA-SAECKER, A. M. & EPPLEN, J. T. 1995. Machado-Joseph disease mutations as the genetic basis of most spinocerebellar ataxias in Germany. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 59, 449-50.

- 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, 308-11.
- SIMON, D. K., ZHENG, K., VELAZQUEZ, L., SANTOS, N., ALMAGUER, L., FIGUEROA, K. P. & PULST, S. M. 2007. Mitochondrial complex I gene variant associated with early age at onset in spinocerebellar ataxia type 2. *Arch Neurol*, 64, 1042-4.
- 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, E2624-E2633.
- STOREY, E. 2014. Genetic cerebellar ataxias. *Semin Neurol*, 34, 280-92.
- SU, A. I., COOKE, M. P., CHING, K. A., HAKAK, Y., WALKER, J. R., WILTSHIRE, T., ORTH, A. P., VEGA, R. G., SAPINOSO, L. M., MOQRICH, A., PATAPOUTIAN, A., HAMPTON, G. M., SCHULTZ, P. G. & HOGENESCH, J. B. 2002. Large-scale analysis of the human and mouse transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 4465-70.
- TAKIYAMA, Y., IGARASHI, S., ROGAEVA, E. A., ENDO, K., ROGAEV, E. I., TANAKA, H., SHERRINGTON, R., SANPEI, K., LIANG, Y., SAITO, M. & ET AL. 1995. Evidence for inter-generational instability in the CAG repeat in the MJD1 gene and for conserved haplotypes at flanking markers amongst Japanese and Caucasian subjects with Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet*, 4, 1137-46.
- TAKIYAMA, Y., NISHIZAWA, M., TANAKA, H., KAWASHIMA, S., SAKAMOTO, H., KARUBE, Y., SHIMAZAKI, H., SOUTOME, M., ENDO, K., OHTA, S. & ET AL. 1993. The gene for Machado-Joseph disease maps to human chromosome 14q. *Nat Genet*, 4, 300-4.
- TAO, T., LAN, J., LUKACS, G. L., HACHE, R. J. & KAPLAN, F. 2006. Importin 13 regulates nuclear import of the glucocorticoid receptor in airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 35, 668-80.
- TAYLOR, J., GROTE, S. K., XIA, J., VANDELFT, M., GRACZYK, J., ELLERBY, L. M., LA SPADA, A. R. & TRUANT, R. 2006. Ataxin-7 can export from the nucleus via a conserved exportin-dependent signal. *J Biol Chem*, 281, 2730-9.
- 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., (CRC-SCA), C. R. C. F. S. A., NETWORK, T. E., GOTO, J., ASHIZAWA, T., CAZENEUVE, C., TSUJI, S., PULST, S. M., BRUSCO, A., RIESS, O., BRICE, A. & STEVANIN, G. 2014a. Modulation of the age at onset in spinocerebellar ataxia by CAG tracts in various genes. *BRAIN*, 137, 2444–2455.
- TEZENAS DU MONTCEL, S., DURR, A., RAKOWICZ, M., NANETTI, L., CHARLES, P., SULEK, A., MARIOTTI, C., ROLA, R., SCHOLS, L., BAUER, P., DUFAURE-GARE, I., JACOBI, H., FORLANI, S., SCHMITZ-HUBSCH, T., FILLA, A., TIMMANN, D., VAN DE WARRENBURG, B. P., MARELLI, C., KANG, J. S., GIUNTI, P., COOK, A., BALIKO, L., MELEGH, B., BOESCH, S.,

- SZYMANSKI, S., BERCIANO, J., INFANTE, J., BUERK, K., MASCIULLO, M., DI FABIO, R., DEPOND, C., RATKA, S., STEVANIN, G., KLOCKGETHER, T., BRICE, A. & GOLMARD, J. L. 2014b. Prediction of the age at onset in spinocerebellar ataxia type 1, 2, 3 and 6. *J Med Genet*, 51, 479-86.
- TSAI, Y. C., METZGER, S., RIESS, O., SOEHN, A. S. & NGUYEN, H. P. 2012. Genetic analysis of polymorphisms in the kalirin gene for association with age-at-onset in European Huntington disease patients. *BMC Med Genet*, 13, 48.
- TSUNODA, T. & TAKAGI, T. 1999. Estimating transcription factor bindability on DNA. *Bioinformatics*, 15, 622-30.
- 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, e115.
- VAN DE WARRENBURG, B. P., SINKE, R. J., VERSCHUUREN-BEMELMANS, C. C., SCHEFFER, H., BRUNT, E. R., IPPEL, P. F., MAAT-KIEVIT, J. A., DOOIJES, D., NOTERMANS, N. C., LINDHOUT, D., KNOERS, N. V. & KREMER, H. P. 2002. Spinocerebellar ataxias in the Netherlands: prevalence and age at onset variance analysis. *Neurology*, 58, 702-8.
- VAN DE WARRENBURG, B. P., VAN GAALEN, J., BOESCH, S., BURGUNDER, J. M., DURR, A., GIUNTI, P., KLOCKGETHER, T., MARIOTTI, C., PANDOLFO, M. & RIESS, O. 2014. EFNS/ENS Consensus on the diagnosis and management of chronic ataxias in adulthood. *Eur J Neurol*, 21, 552-62.
- VAN DER WALT, J. M., NICODEMUS, K. K., MARTIN, E. R., SCOTT, W. K., NANCE, M. A., WATTS, R. L., HUBBLE, J. P., HAINES, J. L., KOLLER, W. C., LYONS, K., PAHWA, R., STERN, M. B., COLCHER, A., HINER, B. C., JANKOVIC, J., ONDO, W. G., ALLEN, F. H., JR., GOETZ, C. G., SMALL, G. W., MASTAGLIA, F., STAJICH, J. M., MCLAURIN, A. C., MIDDLETON, L. T., SCOTT, B. L., SCHMECHEL, D. E., PERICAK-VANCE, M. A. & VANCE, J. M. 2003. Mitochondrial polymorphisms significantly reduce the risk of Parkinson disease. *Am J Hum Genet*, 72, 804-11.
- VELAZQUEZ-PEREZ, L., SEIFRIED, C., ABELE, M., WIRJATIJASA, F., RODRIGUEZ-LABRADA, R., SANTOS-FALCON, N., SANCHEZ-CRUZ, G., ALMAGUER-MEDEROS, L., TEJEDA, R., CANALES-OCHOA, N., FETTER, M., ZIEMANN, U., KLOCKGETHER, T., MEDRANO-MONTERO, J., RODRIGUEZ-DIAZ, J., LAFFITA-MESA, J. M. & AUBURGER, G. 2009. Saccade velocity is reduced in presymptomatic spinocerebellar ataxia type 2. *Clin Neurophysiol*, 120, 632-5.
- WARRICK, J. M., PAULSON, H. L., GRAY-BOARD, G. L., BUI, Q. T., FISCHBECK, K. H., PITTMAN, R. N. & BONINI, N. M. 1998. Expanded polyglutamine protein forms nuclear inclusions and causes neural degeneration in *Drosophila*. *Cell*, 93, 939-49.
- WEBER, J. J., SOWA, A. S., BINDER, T. & HUBENER, J. 2014. From pathways to targets: understanding the mechanisms behind polyglutamine disease. *Biomed Res Int*, 2014, 701758.
- WEI, J. & HEMMINGS, G. P. 2005. The KPNA3 gene may be a susceptibility candidate for schizophrenia. *Neurosci Res*, 52, 342-6.
- WITTEWER, C. T., REED, G. H., GUNDRY, C. N., VANDERSTEEN, J. G. & PRYOR, R. J. 2003. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin Chem*, 49, 853-60.

- WOLF, A. E., MOURAO, L., JR FRANCA, M. C., MACHADO JUNIOR, A. J. & CRESPO, A. N. 2017. Phonoarticulation in spinocerebellar ataxia type 3. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 274, 1139-1145.
- WU, C., CHEN, D. B., FENG, L., ZHOU, X. X., ZHANG, J. W., YOU, H. J., LIANG, X. L., PEI, Z. & LI, X. H. 2017. Oculomotor deficits in spinocerebellar ataxia type 3: Potential biomarkers of preclinical detection and disease progression. *CNS Neurosci Ther*, 23, 321-328.
- WU, C., JIN, X., TSUENG, G., AFRASIABI, C. & SU, A. I. 2016. BioGPS: building your own mash-up of gene annotations and expression profiles. *Nucleic Acids Res*, 44, D313-6.
- WYSOCKI, K. & RITTER, L. 2011. Diseasesome: an approach to understanding gene-disease interactions. *Annu Rev Nurs Res*, 29, 55-72.
- XU, D., GRISHIN, N. V. & CHOOK, Y. M. 2012. NESdb: a database of NES-containing CRM1 cargoes. *Mol Biol Cell*, 23, 3673-6.
- 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.
- YEH, T. H., LU, C. S., CHOU, Y. H., CHONG, C. C., WU, T., HAN, N. H. & CHEN, R. S. 2005. Autonomic dysfunction in Machado-Joseph disease. *Arch Neurol*, 62, 630-6.
- YOU, P., PENG, Z., WANG, Y. & TAO, T. 2013. Expression and subcellular distribution of imp13 are regulated in brain development. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 49, 346-53.
- YU, Y. C., KUO, C. L., CHENG, W. L., LIU, C. S. & HSIEH, M. 2009. Decreased antioxidant enzyme activity and increased mitochondrial DNA damage in cellular models of Machado-Joseph disease. *J Neurosci Res*, 87, 1884-91.
- ZESIEWICZ, T. A., GREENSTEIN, P. E., SULLIVAN, K. L., WECKER, L., MILLER, A., JAHAN, I., CHEN, R. & PERLMAN, S. L. 2012. A randomized trial of varenicline (Chantix) for the treatment of spinocerebellar ataxia type 3. *Neurology*, 78, 545-50.
- ZHOU, L., MYERS, A. N., VANDERSTEEN, J. G., WANG, L. & WITTEWER, C. T. 2004. Closed-tube genotyping with unlabeled oligonucleotide probes and a saturating DNA dye. *Clin Chem*, 50, 1328-35.
- ZHOU, Q., NI, W., DONG, Y., WANG, N., GAN, S. R. & WU, Z. Y. 2014. The role of apolipoprotein E as a risk factor for an earlier age at onset for Machado-Joseph disease is doubtful. *PLoS One*, 9, e111356.
- ZHOU, Y., LUO, X., LI, F., TIAN, X., ZHU, L., YANG, Y., REN, Y. & PANG, H. 2012. Association of Parkinson's disease with six single nucleotide polymorphisms located in four PARK genes in the northern Han Chinese population. *J Clin Neurosci*, 19, 1011-5.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Ich erkläre hiermit, dass sämtliche Versuche, die im Text beschrieben sind, von mir, Annemarie Köbsch, durchgeführt wurden. Gleiches gilt für die Recherche der Polymorphismen, die Auswertung der Ergebnisse, die Literaturrecherche, sowie das Verfassen dieses Textes. Das Konzept dieser Studie wurde durch meinen Betreuer Dr. Thorsten Schmidt erstellt. Dr. Thorsten Schmidt hat ebenfalls die Betreuung meiner Arbeit im Labor und den Antrag für das Ethikvotum übernommen. Die DNA-Proben der SCA3-Patienten, sowie die zugehörigen Datensätze aus dem EuroSCA-Consortium wurden mir vom Labor des Instituts für Genetik und angewandte Genomik Tübingen zur Verfügung gestellt. Über die Vorgehensweise bei der statistischen Auswertung hat uns Prof. Dr. Martin Eichner von der Biometrie Tübingen beraten.

8 Danksagung

In den Humangenetik-Vorlesungen von Prof. Dr. Olaf Rieß wurde ich zuerst auf das Institut für medizinische Genetik und angewandte Genomik aufmerksam, als Direktor verdanke ich ihm die Aufnahme als medizinische Doktorandin am Institut für Genetik. Dr. Thorsten Schmidt, Arbeitsgruppenleiter der SCA3-Forschungsgruppe, hat die Betreuung meiner gesamten Arbeit übernommen. Das Konzept der Studie geht auf seine Vorarbeiten zurück. Er hat mich in alle praktischen Methoden im Labor eingearbeitet und war mein Ansprechpartner bei Fragen und Ungereimtheiten. Bei der Auswertung und der Verfassung des Textes hat er das Korrekturlesen übernommen und sich Zeit für Feedback Gespräche genommen.

Dr. Martin Eichner vom biometrischen Institut hat uns mit seiner statistischen Beratung bei der Datenauswertung geholfen.

Jonasz Weber, Daniel Weishäupl, Eva Haas, Mathias Golla, Priscila Sena, Ines Martins, Miriam Dieterle, Kathrin Gonsior und viele weitere Personen haben mich während der Arbeit im Labor durch ihr Fachwissen und ihre Hilfsbereitschaft unterstützt, mir viele Fragen beantwortet und bei den Problemen im Laboralltag geholfen.

Ich danke allen genannten Personen von Herzen für ihre Hilfe und Unterstützung!