

Aus dem Institut für Neurogenetik
der Universität zu Lübeck
Direktorin: Prof. Dr. med. Christine Klein

*Cerebellar Ataxia with Neuropathy and bilateral Vestibular
Areflexia Syndrome (CANVAS): Molekulargenetische
Charakterisierung einer neuartigen Repeat-Erkrankung*

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin –

vorgelegt von
Maria Lueg, geb. Gisatulin
aus Jekaterinburg

Lübeck 2021

1. Berichterstatterin:	Prof. Dr. rer. nat. Katja Lohmann
2. Berichterstatterin:	PD Dr. Ing. Antje Müller
Tag der mündlichen Prüfung:	05.07.2023
Zum Druck genehmigt.	Lübeck, den 05.07.2023
-Promotionskommission der Sektion Medizin-	

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Abbildungsverzeichnis	X
1 Einleitung und Fragestellungen	1
1.1 Klinik und Genetik der Ataxien	1
1.2 <i>Cerebellar Ataxia with Neuropathy and bilateral Vestibular Areflexia</i> <i>Syndrome (CANVAS)</i>	4
1.3 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe	7
1.4 Fragestellungen	8
2 Untersuchte Individuen, Material und Methoden	10
2.1 Untersuchte Individuen	10
2.1.1 Patientinnen und Patienten	11
2.1.2 Kontrollen	14
2.1.3 Individuen aus Familien ohne zerebelläre Ataxien	14
2.2 Material	15
2.2.1 Chemikalien	15
2.2.2 Kits	16
2.2.3 Lösungen	17
2.2.4 Geräte	18
2.2.5 Software und Websites	18
2.3 Methoden	19
2.3.1 Präparation von Nukleinsäuren	19
2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	20
2.3.3 Agarosegelelektrophorese und Gelelution	28
2.3.4 Sanger-Sequenzierung im ABI 3130XL/3500XL-System	29
2.3.5 Fragmentlängenanalyse im ABI 3130XL/3500XL System	31
2.3.6 Mikrosatelliten-Genotypisierung	33

2.3.7 Quantitative Echtzeit-PCR mit SYBR-Green	34
2.3.8 <i>Southern</i> -Blot	36
2.3.9 Statistische Auswertung	41
3 Ergebnisse	42
3.1 Genotypisierung	42
3.1.1 Identifizierung von Individuen mit massiven biallelischen <i>Repeat</i> - Expansionen im <i>RFCI</i> -Gen mittels Duplex-PCR	42
3.1.2 Charakterisierung der <i>Repeat</i> -Sequenz mittels <i>Repeat-Primed</i> PCR und Sanger-Sequenzierung	45
3.1.3 Charakterisierung der <i>Repeat</i> -Länge mittels <i>Southern</i> -Blot-Analyse und Fragmentlängenanalyse	50
3.2 Untersuchung auf das Vorliegen einer <i>Founder</i> -Mutation	55
3.3 Untersuchung der intergenerationalen <i>Repeat</i> -Stabilität.....	57
3.4 Funktionelle Untersuchungen des <i>RFCI</i> -Gens	59
3.4.1 Expressionsanalyse des <i>RFCI</i> - und <i>WDR19</i> -Gens	59
3.4.2 Untersuchungen der <i>RFCI</i> -prä-mRNA-Prozessierung.....	60
4 Diskussion	62
4.1 Genotypisierung des <i>RFCI-Repeats</i> bei Patientinnen und Patienten mit verschiedenen Ataxieformen.....	62
4.2 Hypothesen zur Entstehung der <i>RFCI-Repeat</i> -Expansion	70
4.3 Molekularer Mechanismus der <i>RFCI-Repeat</i> -Expansion.....	72
5 Zusammenfassung.....	74
6 Literaturverzeichnis.....	75
7 Anhang	82
7.1 Votum der Ethikkommission	82
7.2 Klinische Informationen zu den eingeschlossenen CANVAS-Familien	82
7.2.1 Familie LUE_01	83
7.2.2 Familie LUE_02.....	84
7.3 Für die Untersuchung der intergenerationalen <i>RFCI-Repeat</i> -Stabilität eingeschlossene Familien.....	86
7.4 Verwendete <i>Primer</i>	92

8 Danksagung.....	94
--------------------------	-----------

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ADCY6	<i>Adenylyl Cyclase Type 6</i>
ASR	Achillessehnenreflex
bp	Basenpaar
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
C	Cytosin
CANVAS	<i>Cerebellar Ataxia with Neuropathy and bilateral Vestibular Areflexia Syndrome</i> (dt.: Zerebelläre Ataxie-Neuropathie-bilaterale vestibuläre Areflexie-Syndrom)
cDNA	<i>complementary DNA</i> (dt.: komplementäre DNA)
CDP	Disodium 2-chloro-5-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5-chloro)tricyclo [3.3.1.1 ^{3,7}]decan}-4-yl)-1-phenyl phosphate
CEPH	<i>Centre d'Étude du Polymorphisme Humain</i>
Chr.	Chromosom
C _T	<i>Threshold Cycle</i> (dt.: Schwellenwertzyklus)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> (dt.: Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EA	Episodische Ataxie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELF2	<i>E74-like factor 2</i>
exp.	expandiert
FAM	6-Carboxyfluorescein
FXN	Frataxin
G	Guanin
GOF	<i>Gain of function</i> (dt.: Funktionsgewinn)
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (dt.: Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
ILOCA/	<i>Idiopathic Late Onset Cerebellar Ataxia</i>
IDCA	(dt.: Idiopathische spät beginnende zerebelläre Ataxie)

Abkürzungsverzeichnis

kb	Kilobasenpaar
LOF	<i>Loss of function</i> (dt.: Funktionsverlust)
Mb	Megabasenpaare
mRNA	<i>messenger RNA</i> (dt.: Boten-RNA)
MRT	Magnetresonanztomographie
n.a.	<i>not available</i> (Daten nicht verfügbar)
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i> (dt.: Sequenzierung der nächsten Generation)
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (dt.: Polymerase-Kettenreaktion)
PRKN	Parkin
Ref.	<i>RFC1</i> -Referenzallel
RFC1	<i>Replication Factor C Subunit 1</i> (dt.: Replikationsfaktor C Untereinheit 1)
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (dt.: Ribonukleinsäure)
rpm	<i>rotation per minute</i> (dt.: Rotation pro Minute)
RP-Primer	<i>Repeat-Primer</i>
RT-qPCR	Reverse Transkriptase quantitative Echtzeit-PCR
SAOA	<i>Sporadic Adult Onset Ataxia</i> (dt.: Sporadische Ataxie des Erwachsenenalters)
SCA	<i>Spinocerebellar Ataxia</i> (dt.: Spinozerebelläre Ataxie)
SD	<i>standard deviation</i> (dt.: Standardabweichung)
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (dt.: Natrium Dodecylsulfat)
SFB	Sonderforschungsbereich
SNAP	Sensibles Nervenaktionspotential
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (dt.: Einzelnukleotid-Polymorphismus)
SSC	<i>Standard Sodium Citrate</i> (dt.: Standard Natrium Ziträt)
STR	<i>short tandem repeat</i> (dt. Synonym: Mikrosatelliten)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TRIS	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	<i>Units</i>
vKIT	Video-Kopfimpulstest
VOR	Vestibulookulärer Reflex
(v/v)	<i>volume per volume</i> (dt.: Volumenprozent)
WDR19	<i>WD Repeat-containing Protein 19</i>
WT	Wildtyp
(w/v)	<i>weight per volume</i> (dt.: Gewichtsprozent)
YWHAZ	14-3-3 Protein zeta/delta

Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Diagnosekriterien für ein vollständiges CANVAS	11
Tab. 2 Klinische Beschreibung der Patientinnen und Patienten mit einem vollständigen CANVAS	12
Tab. 3 Klinische Beschreibung der Patientinnen und Patienten mit einem unvollständigen CANVAS	13
Tab. 4 Übersicht über die verwendeten Chemikalien	15
Tab. 5 Übersicht über die eingesetzten Kits	16
Tab. 6 Übersicht über die für DNA-Analysen verwendeten Lösungen	17
Tab. 7 Übersicht über die für den <i>Southern</i> -Blot verwendeten Lösungen	17
Tab. 8 Übersicht über die eingesetzten Geräte	18
Tab. 9 Übersicht über die verwendete Software und Websites	18
Tab. 10 Reaktionsansatz für die Standard-PCR	23
Tab. 11 Thermocycler-Programm für die Standard-PCR	23
Tab. 12 Reaktionsansatz für die Duplex-PCR	24
Tab. 13 Thermocycler-Programm für die Duplex-PCR	24
Tab. 14 Reaktionsansatz für die <i>Repeat-Primed</i> -PCR (RP-PCR)	26
Tab. 15 Thermocycler-Programm für die <i>Repeat-Primed</i> -PCR (RP-PCR)	27
Tab. 16 Reaktionsansatz für die <i>Long-Range</i> -PCR	27
Tab. 17 Thermocycler-Programm für die <i>Long-Range</i> -PCR	28
Tab. 18 Thermocycler-Programm für den ExoFast-Verdau	30
Tab. 19 Reaktionsansatz für die Sequenzier-PCR	30
Tab. 20 Thermocycler-Programm für die Sequenzier-PCR	30
Tab. 21 Reaktionsansatz für die Fragmentlängenanalyse	32
Tab. 22 Thermocycler-Programm für die Fragmentlängenanalyse	32
Tab. 23 Verwendete Mikrosatelliten-Marker	33

Tab. 24 Reaktionsansatz für die quantitative Echtzeit-PCR.....	35
Tab. 25 LightCycler-Programm für die quantitative Echtzeit-PCR.....	35
Tab. 26 Zusammenfassung der Duplex-PCR-Ergebnisse aller getesteten Individuen.....	44
Tab. 27 Ergebnisse der <i>Repeat-Primed</i> -PCR bei Patientinnen und Patienten mit massiven biallelischen <i>Repeat</i> -Expansionen im <i>RFC1</i> -Gen	47
Tab. 28 Ergebnisse der <i>Repeat-Primed</i> -PCR bei Individuen ohne massive biallelische <i>Repeat</i> -Expansionen im <i>RFC1</i> -Gen	47
Tab. 29 Sanger-Sequenzierungsergebnisse von allen eingeschlossenen Patientengruppen	50
Tab. 30 Ergebnisse der Genotypisierung mittels Fragmentlängenanalyse.....	55
Tab. 31 Ergebnisse der Mikrosatelliten-Genotypisierung bei den untersuchten Patientinnen und Patienten sowie Kontrollen	57
Tab. 32 Zusammenfassung der berichteten Häufigkeiten massiver biallelischer <i>Repeat</i> -Expansionen im <i>RFC1</i> -Gen bei Patientinnen und Patienten mit spät beginnenden zerebellären Ataxien.....	63
Tab. 33 Verwendete genomische DNA- <i>Primer</i>	92
Tab. 34 Verwendete cDNA- <i>Primer</i>	93

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Schematische Darstellung der <i>Repeat</i> -Expansion im zweiten Intron des <i>RFC1</i> -Gens.	7
Abb. 2 Übersicht zum Studiendesign.	10
Abb. 3 Schematische Darstellung des Prinzips einer <i>Repeat-Primed</i> -PCR (RP-PCR).	25
Abb. 4 Schnittstellen der Restriktionsenzyme und resultierende Fragmente.	37
Abb. 5 Schematische Darstellung des verwendeten Aufbaus für den <i>Southern</i> -Blot.	39
Abb. 6 Repräsentative Bilder der Agarosegelelektrophorese von Duplex-PCR-Produkten.	43
Abb. 7 Repräsentative Elektropherogramme kapillarelektrophoretisch aufgetrennter <i>Repeat-Primed</i> (RP)-PCR-Produkte.	46
Abb. 8 Repräsentative Elektropherogramme von Sanger-sequenzierten <i>Long-Range</i> -PCR-Produkten.	49
Abb. 9 Repräsentative <i>Southern</i> -Blots.	51
Abb. 10 Exemplarische Elektropherogramme der Fragmentlängenanalyse.	52
Abb. 11 Histogramm der mittels Fragmentlängenanalyse beobachteten <i>Repeat</i> -Längen bei Patientinnen und Patienten ohne massive biallelische <i>RFC1</i> - <i>Repeat</i> -Expansionen sowie bei Kontrollen.	53
Abb. 12 Schematische Darstellung des Chromosoms 4 mit eingezeichneten Positionen der untersuchten Mikrosatelliten-Marker sowie des <i>RFC1</i> - <i>Repeats</i>	56
Abb. 13 Repräsentative Elektropherogramme der Mikrosatelliten-Genotypisierung von Individuen mit einem vollständigen CANVAS und Kontrollen am Beispiel des D4S1581-Mikrosatelliten-Markers.	56
Abb. 14 Übersichtsabbildung der ausgewerteten intergenerationalen <i>Repeat</i> -Transmissionen.	58

Abb. 15 Ergebnisse der Expressionsanalyse des <i>RFC1</i> - und <i>WDR19</i> -Gens in peripher-venösem Blut bei Individuen mit einem vollständigen CANVAS und Kontrollen.	60
Abb. 16 Ergebnisse der Untersuchungen auf Prozessierungsalterationen der <i>RFC1</i> - prä-mRNA bei Individuen mit einem vollständigen CANVAS und Kontrollen.	61
Abb. 17 Stammbaum der Familie LUE_01.	83
Abb. 18 Stammbaum der Familie LUE_02.	85
Abb. 19 Stammbäume der zur Analyse der <i>RFC1</i> -Repeat-Transmission eingeschlossenen Familien.	86

1 Einleitung und Fragestellungen

Das in dieser Promotionsarbeit untersuchte *Cerebellar Ataxia with Neuropathy and bilateral vestibular Areflexia Syndrome* (CANVAS) stellt eine neurodegenerative Erkrankung dar, welche klinisch durch eine zerebelläre Dysfunktion, sensible Neuropathie und bilaterale Vestibulopathie gekennzeichnet ist (Szmulewicz *et al.*, 2011c). Seit der Erstbeschreibung des Syndroms im Jahr 2011 gewann die Erkrankung in den letzten Jahren an klinischer Relevanz, da sie als häufige Ursache bisher idiopathischer zerebellärer Ataxien im Erwachsenenalter identifiziert wurde (Szmulewicz *et al.*, 2011c; Cortese *et al.*, 2019; Dominik *et al.*, 2021). Die Arbeitsgruppe um Andrea Cortese konnte im Jahr 2019 bei Individuen mit einem CANVAS erstmals eine biallelische *Repeat*-Expansion im *Replication Factor C Subunit 1 (RFC1)*-Gen nachweisen (Cortese *et al.*, 2019). Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese *Repeat*-Expansion in verschiedenen Stichproben von Patientinnen und Patienten mit Ataxien sowie Kontrollen validiert und molekulargenetisch charakterisiert. Die folgenden Abschnitte geben einen Überblick über die nach aktuellem Stand der Forschung bekannten klinischen und genetischen Gegebenheiten zu Ataxien im Allgemeinen sowie CANVAS im Speziellen. Abschließend erfolgt eine Darstellung der Vorarbeiten der Arbeitsgruppe und der spezifischen Fragestellungen dieser Arbeit.

1.1 Klinik und Genetik der Ataxien

Der Begriff Ataxie (griech.: *ataxia*, Unordnung) bezeichnet das klinisch-neurologische Symptom einer Störung der Bewegungskoordination (Ashizawa und Xia, 2016). Als Ataxien werden jedoch auch eine Gruppe von Bewegungsstörungen zusammengefasst, bei denen eine progressive Koordinationsstörung bzw. Ataxie die klinisch prädominante Manifestation darstellt (Klockgether *et al.*, 2019). Ursächlich für eine Ataxie können sowohl Dysfunktionen des Kleinhirns (zerebelläre Ataxien) als auch Störungen des Rückenmarks, des peripheren sensiblen Nervensystems sowie des Vestibularorgans sein (Mariotti *et al.*, 2005; Chhetri *et al.*, 2014). Da die in dieser Arbeit untersuchten Patientinnen und Patienten Formen von zerebellären Ataxien aufweisen, wird im Folgenden insbesondere auf die Klinik und Genetik dieser Krankheitsgruppe eingegangen.

Bei zerebellären Ataxien können je nach Läsionsort sowohl die Koordination der willkürlichen Zielmotorik als auch der Stütz- und Blickmotorik gestört sein (Marsden, 2018). Die Beeinträchtigung der Stützmotorik äußert sich klinisch in einem breitbasigen, unsicheren Gang und Stand mit Fallneigung, welcher nicht visuell stabilisiert werden kann (negativer Romberg-Versuch) (Diem *et al.*, 2016). Durch eine fehlerhafte zeitliche und räumliche Abstimmung von zielgerichteten Bewegungen sind bei Individuen mit zerebellären Ataxien überschießende oder zu kurz bemessene Zielbewegungen (Dysmetrie) der Extremitäten zu beobachten (Marsden, 2018). Des Weiteren werden zerebelläre Koordinationsstörungen in einem bei zielgerichteter Bewegung zunehmendem Tremor (Ziel- bzw. Intentionstremor) sowie einer erschwerten Ausführung schnell-alternierender Bewegungen der Extremitäten (Dysdiadochokinese) klinisch auffällig (Mariotti *et al.*, 2005). Da auch die Muskulatur der Stimmgebung bei Individuen mit einer zerebellären Koordinationsstörung betroffen sein kann, können diese eine neurogene Sprechstörung (Dysarthrie), oft in Form einer skandierenden oder verwaschenen Sprache aufweisen (Diem *et al.*, 2016). Eine zerebelläre Ataxie der Okulomotorik äußert sich klinisch in einer Dysmetrie schneller zielgerichteter Augenbewegungen (Sakkadendysmetrie), einer nicht-flüssigen (sakkadierten) Blickfolge, einem Nystagmus sowie einer fehlenden Suppression des vestibulookulären-Reflexes (Ashizawa und Xia, 2016; Marsden, 2018).

Zerebelläre Ataxien werden je nach Ätiologie in sporadische und hereditäre Ataxien eingeteilt. Die sporadischen Formen lassen sich weiterhin in erworbene bzw. symptomatische und idiopathische zerebelläre Ataxien unterteilen (Bürk, 2016).

Die Erkrankungsgruppe der erworbenen zerebellären Ataxien weist eine Vielzahl an möglichen Ätiologien auf. Am häufigsten ist hierbei die alkoholinduzierte zerebelläre Degeneration (Wessel und Weiland, 2020b). Des Weiteren können unter anderem Medikamente (z.B. Lithium, Amiodaron), paraneoplastisch gebildete zerebelläre Autoantikörper (z.B. Anti-Yo-Antikörper), entzündliche und/oder raumfordernde Prozesse sowie metabolische Störungen zur Manifestation einer erworbenen zerebellären Ataxie führen (Klockgether, 2010; Bürk, 2016; Wessel und Weiland, 2020b).

Hereditäre zerebelläre Ataxien werden nach ihrem Vererbungsmuster in autosomal-dominante, autosomal-rezessive, x-chromosomale und mitochondriale Formen eingeteilt (Kuo, 2019; Manto *et al.*, 2020). Unter dem Begriff der autosomal-dominanten zerebellären

Ataxien sind die spinocerebellären Ataxien (*Spinocerebellar Ataxia*, SCA) sowie die episodischen Ataxien (EA) zusammengefasst (Akbar und Ashizawa, 2015). Die SCA stellen eine sowohl klinisch als auch genetisch heterogene Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen mit aktuell mehr als 40 bekannten unterschiedlichen Subtypen dar (Klockgether *et al.*, 2019). Die weltweite Prävalenz der SCA liegt bei 2,7 zu 100.000 Individuen mit einem mittleren Erkrankungsalter von 30 bis 40 Jahren (Ruano *et al.*, 2014; Wessel und Weiland, 2020a). Die SCA3 (20-50%) stellt den weltweit häufigsten Subtyp dar, gefolgt von der SCA2 (13-18%) und der SCA6 (13-15%), wobei die Häufigkeitsverteilung der SCA-Subtypen eine hohe geografische Variabilität aufweist (Hersheson *et al.*, 2012). Klinisch weisen Individuen mit SCA neben einer zerebellären Ataxie je nach Subtyp unterschiedliche neurologische Begleitsymptome, wie beispielsweise eine Optikusatrophie, extrapyramidale Störungen, Spastiken oder eine Demenz auf (Wessel und Weiland, 2020a). Molekulargenetisch finden sich bei vielen Formen der SCA Expansionen von repetitiven DNA-Sequenzen (*Repeat-Expansionen*) (Paulson *et al.*, 2017). So sind bei aktuell sechs SCA-Subtypen (SCA1, 2, 3, 6, 7 und 17) kodierende CAG-*Repeat-Expansionen* bekannt, welche in einem Polyglutaminexpansionen-enthaltenden Protein resultieren (Stoyas und La Spada, 2018). Des Weiteren konnten auch Subtypen nachgewiesen werden, bei denen nicht-kodierende CAG-Expansionen (SCA12) oder intronische Expansionen anderer *Repeat-Sequenzen* vorliegen (SCA10, 31, 36 und 37) (Sullivan *et al.*, 2019). Neben den *Repeat-Expansionen* sind bei anderen SCA-Subtypen (SCA5, 11 bis 16, 23 und 27) auch konventionelle Formen von Mutationen (z. B. Insertionen, Deletionen, Punktmutationen) bekannt (Klockgether *et al.*, 2019).

Die Gruppe der autosomal-rezessiv vererbten zerebellären Ataxien weist ähnlich den SCA eine hohe klinische und genetische Heterogenität auf (Anheim *et al.*, 2012). So umfasst diese uneinheitlich definierte Erkrankungsgruppe neben den häufigsten Vertretern (unter anderem Friedreich-Ataxie und Ataxia teleangiectatica) je nach Klassifikation über 90 weitere Syndrome (Rossi *et al.*, 2018; Beaudin *et al.*, 2019). Die Prävalenz wird mit 3,3 pro 100.000 Individuen weltweit angegeben, wobei die Häufigkeitsverteilung der einzelnen Erkrankungen eine hohe geografische Variabilität aufweist (Ruano *et al.*, 2014). Typischerweise manifestieren sich die autosomal-rezessiven, zerebellären Ataxien bereits im Kindes- und Jugendalter, in der Regel vor dem 20. Lebensjahr (Anheim *et al.*, 2012). Im Gegensatz zu den SCA ist bei den autosomal-rezessiv vererbten zerebellären Ataxien häufig

ein sporadisches Auftreten zu beobachten (Synofzik und Németh, 2018). Die Anwendung neuer molekulargenetischer Methoden, wie das *Next Generation Sequencing* (NGS), ermöglichte in den letzten Jahren die Identifikation von über 100 Genen, welche mit autosomal-rezessiven, zerebellären Ataxien assoziiert sind (Rossi *et al.*, 2018; Synofzik und Németh, 2018). Bei der weltweit häufigsten hereditären Ataxie, der Friedreich-Ataxie, können in über 90% der Fälle biallelische GAA-Repeat-Expansion im ersten Intron des Frataxin-Gens (*FXN*, Chromosom 9) nachgewiesen werden (Di Donato *et al.*, 2001; Bürk, 2016). Seltener weisen die Patientinnen und Patienten einen *Compound*-heterozygoten Trägerstatus auf, wobei auf einem Allel die beschriebene GAA-Expansion und auf dem anderen Allel eine Punktmutation im *FXN*-Gen vorliegt (Bürk, 2016).

Zerebelläre Ataxien mit unbekannter Ätiologie (idiopathisch) treten typischerweise sporadisch im Erwachsenenalter auf (Wessel und Weiland, 2020a). Die Nomenklatur dieser Erkrankungsgruppe ist uneinheitlich, so finden sich in der Literatur neben der Bezeichnung *Idiopathic Late Onset Cerebellar Ataxia* (ILOCA, IDCA) auch der Begriff der *Sporadic Adult Onset Ataxia* (SAOA) (Klockgether, 2010; Bürk, 2016; Wessel und Weiland, 2020a). In dieser Arbeit wurde die gängige Abkürzung ILOCA verwendet. Die Prävalenz der ILOCA wird mit 1 bis 4 zu 100.000 Individuen angegeben (Bürk, 2016; Wessel und Weiland, 2020a). Mittels neuer molekulargenetischer Verfahren lassen sich bei 20-30% initial mit ILOCA diagnostizierten Individuen zugrundeliegende Mutationen nachweisen und somit spezifische Diagnosen, wie die des in dieser Arbeit untersuchten CANVAS, stellen (Bürk, 2016; Cortese *et al.*, 2019).

1.2 *Cerebellar Ataxia with Neuropathy and bilateral Vestibular Areflexia Syndrome* (CANVAS)

Das *Cerebellar Ataxia with Neuropathy and bilateral vestibular Areflexia Syndrome* (CANVAS, [OMIM: 614575]) ist eine neurodegenerative Erkrankung, welche durch die klinische Kombination einer zerebellären Dysfunktion, sensiblen Neuropathie und bilateralen Vestibulopathie gekennzeichnet ist (Szmulewicz *et al.*, 2011c). Die Erkrankung manifestiert sich typischerweise im Erwachsenenalter mit einem mittleren Erkrankungsalter von 50 bis 60 Jahren (Szmulewicz *et al.*, 2011c; Cortese *et al.*, 2020). Zu Beginn dieser Promotionsarbeit fanden sich in der Literatur nur wenige berichtete CANVAS-Fälle (u. a. in Szmulewicz *et al.*, 2014a; Cazzato *et al.*, 2016; Infante *et al.*, 2018). Mittlerweile ist die Zahl

der beschriebenen Fälle, unter anderem auch durch diese Arbeit deutlich erweitert und das Syndrom als eine häufige Ursache bisher idiopathischer zerebellärer Ataxien im Erwachsenenalter identifiziert worden (Cortese *et al.*, 2019, 2020; Aboud Syriani *et al.*, 2020; Gisatulin *et al.*, 2020; Van Daele *et al.*, 2020; Kontogeorgiou *et al.*, 2021).

Klinisch weisen Individuen mit einem CANVAS aufgrund einer simultanen Beeinträchtigung des Kleinhirns sowie dessen vestibulären und somatosensiblen Afferenzen häufig eine schwere progrediente Gangunsicherheit mit Verschlechterung der Symptomatik bei Wegfall der visuellen Kontrolle (z.B. bei Dunkelheit) auf (Szmulewicz *et al.*, 2011c). In einer Vielzahl der Fälle werden weiterhin somatosensensible Symptome wie Hypästhesien, Dysästhesien, neuropathische Schmerzen oder eine Allodynie angegeben (Cortese *et al.*, 2020; Dominik *et al.*, 2021). Als Zeichen der bilateralen vestibulären Areflexie berichten einige Patientinnen und Patienten über eine zitternde bzw. oszillierende visuelle Wahrnehmung der Umgebung bei Bewegungen des Kopfes (Oszillopsien) (Dupré *et al.*, 2020). Zusätzlich können Individuen mit einem CANVAS Symptome einer autonomen Dysfunktion aufweisen, welche sich häufig in Form einer orthostatischen Hypotension, erektilen Dysfunktion, Obstipation oder Hypohidrose bemerkbar macht (Wu *et al.*, 2014; Cortese *et al.*, 2020). Bei einem Teil der Betroffenen wurde ein chronischer, unproduktiver Husten beobachtet, welcher der Manifestation weiterer CANVAS-Symptome mehrere Jahre vorausgehen kann (Szmulewicz *et al.*, 2014a; Infante *et al.*, 2018).

Der Verlauf der Erkrankung ist langsam progredient, sodass zwischen Beginn der ersten Symptome und der vollständigen Ausprägung der klinischen Trias durchschnittlich ~10 Jahre liegen (Szmulewicz *et al.*, 2014a). Das zeitliche Auftreten der Symptome folgt hierbei keiner einheitlichen Reihenfolge, weswegen eine frühe Diagnosestellung des CANVAS oft erschwert ist und sequenzielle Untersuchungen der Patientinnen und Patienten notwendig sind (Szmulewicz *et al.*, 2016).

Die Diagnose des CANVAS wird anhand der typischen Klinik, neurophysiologischen und bildgebenden Befunden sowie dem Ausschluss möglicher Differenzialdiagnosen (wie z. B. SCA3, Friedreich-Ataxie) gestellt. In der klinisch-neurologischen Untersuchung finden sich Zeichen einer zerebellären Dysfunktion, wie eine sakkadierte Blickfolge, ein Blickrichtungsnystagmus, dysmetrische Sakkaden, eine Dysarthrie sowie eine Gang- und/oder Standataxie (Szmulewicz *et al.*, 2016). Des Weiteren können Zeichen einer

sensiblen Neuropathie vorliegen, wie eine verminderte Vibrationswahrnehmung (Pallhypästhesie) oder eine herabgesetzte Wahrnehmung von diskreten Schmerzreizen (Szmulewicz *et al.*, 2011b). Die Muskeleigenreflexe können abgeschwächt oder erhalten sein (Burke und Halmagyi, 2018; Infante *et al.*, 2018). Die bilaterale vestibuläre Areflexie äußert sich in der klinischen Untersuchung in einem beidseitig beeinträchtigten Vestibulo-okulären-Reflex (VOR) im Kopfpulstest (Szmulewicz *et al.*, 2011c).

In der apparativen Diagnostik kann bei der Mehrzahl der Individuen mit einem CANVAS mittels des Video-Kopfpuls-Tests (vKIT) oder der kalorischen Testung beidseits ein quantitativ reduzierter VOR nachgewiesen werden (Dominik *et al.*, 2021). In der elektroneurografischen Untersuchung der oberen und unteren Extremität finden sich typischerweise verminderte bis fehlende sensible Nervenaktionspotentiale (SNAP) und eine normale bis leicht verminderte motorische Nervenleitung (Dupré *et al.*, 2020). Mittels kranialer Magnetresonanztomografie kann bei den meisten Betroffenen eine Atrophie des Zerebellums im Bereich der anterioren und dorsalen Vermis sowie des ersten Kleinhirnstiels (Crus I) beobachtet werden (Szmulewicz *et al.*, 2011c; Cortese *et al.*, 2020).

Neuropathologisch findet sich neben einer Atrophie zerebellärer Purkinje-Zellen (Vermis, Crus I) auch eine Degeneration von Nervenzellen der Spinalganglien (sensible Neuronopathie) sowie von multiplen Hirnnervenganglien (Nervus Vestibularis, Nervus Fazialis, Nervus Trigeminus), welche die klinischen Symptome und Befunde der Patientinnen und Patienten erklären könnten (Szmulewicz *et al.*, 2011a, 2014b).

Der genetische Hintergrund des Syndroms war für viele Jahre nicht bekannt, wobei aufgrund des gehäuft familiären Auftretens der CANVAS-Fälle unter Geschwistern schon früh ein autosomal-rezessiver Erbgang vermutet wurde (Szmulewicz *et al.*, 2011c, 2014a). Kürzlich gelang es zwei Arbeitsgruppen (Cortese *et al.*, 2019; Rafehi *et al.*, 2019) mittels unterschiedlicher molekulargenetischer Herangehensweisen eine ursächliche biallelische (AAGGG)_n-Pentanukleotidexpansion im zweiten Intron des *Replication Factor C Subunit 1*-Gens (*Replikationsfaktor C-Untereinheit 1*-, *RFC1*-Gen) zu identifizieren (siehe Abb. 1). Das *Repeat* befindet sich in dem Poly-A-Schwanz eines repetitiven, ~300 Basenpaare langen DNA-Abschnittes (AluSx3-Element) und unterscheidet sich sowohl in der Sequenz als auch in der Länge des *Repeats* von dem *RFC1*-(AAAAG)₁₁-Referenzallel (chr4:39350045-39350103, GRCh37/hg19) (Ade *et al.*, 2013; Cortese *et al.*, 2019). Die Länge der Expansion variiert zwischen 400 und 2000 *Repeats*, wobei bei der Mehrheit der Fälle eine Länge von

1000 *Repeats* beobachtet wurde (Cortese *et al.*, 2019). Die Heterozygoten-Frequenz der Mutation bei gesunden Europäern beträgt 0,7%-4%, sodass die Prävalenz der biallelischen Mutation auf 1:20.000 bis 1:625 geschätzt wird (Cortese *et al.*, 2019; Rafehi *et al.*, 2019). Bei Individuen mit einem CANVAS konnte in den genannten Studien die biallelische (AAGGG)-Expansion in ~85–95% der Fälle beobachtet werden. Die Mutation lag außerdem bei 22% der untersuchten Individuen mit einer spät beginnenden Ataxie vor (Cortese *et al.*, 2019).

Der molekulare Mechanismus, durch den die *Repeat*-Expansion die Erkrankung verursacht, ist nach aktuellem Stand der Forschung nicht bekannt und erfordert weiterer Untersuchungen (Cortese *et al.*, 2019; Rafehi *et al.*, 2019; Gisatulin *et al.*, 2020).

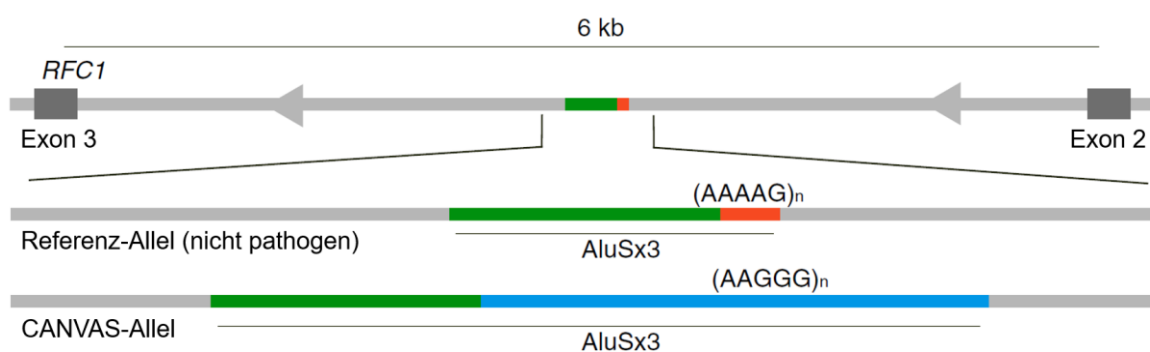


Abb. 1 Schematische Darstellung der *Repeat*-Expansion im zweiten Intron des *RFC1*-Gens.

Hier schematisch dargestellt ist das expandierte *Repeat* im zweiten Intron des *RFC1*-Gens. Das (AAAAG)₁₁-Motiv, welches sich im Referenzgenom in einem Alu-Element (AluSx3-Element) befindet, ist ersetzt durch eine (AAGGG)_n-*Repeat*-Expansion. CANVAS – *Cerebellar Ataxia with Neuropathy and bilateral Vestibular Areflexia Syndrome*; kb – Kilobasenpaar; *RFC1* – *Replication Factor C Subunit 1*. (Quelle: übersetzt nach Rafehi *et al.*, 2019)

1.3 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe

Alle im Rahmen dieser Arbeit molekulargenetisch untersuchten DNA-Proben wurden bereits im Vorfeld dieser Studie gewonnen. Bis auf die Proben von Individuen mit ILOCA erfolgte die DNA-Extraktion durch labortechnische Assistentinnen des Instituts für Neurogenetik der Universität zu Lübeck. Die DNA-Proben der eingeschlossenen ILOCA-Patientinnen und Patienten wurden von dem Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck bereitgestellt.

Die Erhebung der klinischen Daten der eingeschlossenen Individuen mit einer vollständigen Manifestation des CANVAS sowie der Individuen mit einem unvollständigen CANVAS

erfolgte im Vorfeld dieser Arbeit durch Ärztinnen und Ärzte der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck (siehe Abschnitt 2.1.1) und in zwei Fällen durch ärztliches Personal des Klinikums Aschaffenburg-Alzau.

Zur Identifikation der genetischen Ursache des CANVAS erfolgte bereits vor Beginn dieser Arbeit eine Exom-Sequenzierung von zwei Familien mit je einem betroffenen Geschwisterpaar (Familie LUE_01 und LUE_02, siehe Anhang 7.2), welche auch Teil der hier untersuchten Patientengruppe waren. Hierbei wurde bei den an CANVAS erkrankten Individuen der Familie LUE_01 eine heterozygote *Missense*-Variante im *Adenylyl Cyclase Type 6 (ADCY6)*-Gen (NM_015270; c.1904G>A, p.R635H) identifiziert. In demselben Gen wurde bei den betroffenen Individuen der Familie LUE_02 eine *Frameshift*-Variante (c.771delG, p.M257fs) nachgewiesen. Die identifizierten Varianten konnten weder bei den untersuchten gesunden Geschwistern noch bei 12 sporadischen CANVAS-Fällen beobachtet werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden bei diesen Individuen jedoch biallelische Pentanukleotidexpansionen im *RFC1*-Gen nachgewiesen (siehe Abschnitt 3.1.1), weswegen die Bedeutung der gefundenen Mutationen im *ADCY6*-Gen unklar ist und diese somit nicht Fokus dieser Promotionsarbeit waren.

1.4 Fragestellungen

Ziel dieser Arbeit war es die kürzlich mit CANVAS in Zusammenhang gebrachte biallelische (AAGGG)-Pentanukleotidexpansion im *RFC1*-Gen (siehe Abschnitt 1.2) in verschiedenen Stichproben von Patientinnen und Patienten mit Ataxien sowie Kontrollen zu validieren und molekulargenetisch zu charakterisieren. Folgende Fragestellungen wurden hierfür im Rahmen dieser Arbeit untersucht:

1. Mit welcher Prävalenz kann die neuartige *RFC1-Repeat*-Expansion bei den eingeschlossenen Individuen mit einem CANVAS sowie bei Individuen mit ILOCA beobachtet werden? Zur Identifizierung von Individuen mit biallelischen *RFC1-Repeat*-Expansionen in den untersuchten Patienten- und Kontrollgruppen wurde hier eine molekulargenetische Screeningmethode (Duplex-PCR) etabliert und durchgeführt.

2. Welche *RFC1*-Genotypen können bei den eingeschlossenen Ataxiepatientinnen und Ataxiepatienten sowie bei Kontrollen beobachtet werden? Zur Charakterisierung der Länge und Sequenz der Pentanukleotidexpansion im *RFC1*-Gen erfolgte die Etablierung und Durchführung verschiedener molekulargenetischen Methoden (*Repeat-Primed-PCR*, *Long-Range-PCR* mit anschließender Sanger-Sequenzierung, *Southern-Blot*, *Fragmentlängenanalyse*).
3. Lassen sich die biallelischen Expansionen im *RFC1*-Gen auf einen gemeinsamen ursprünglichen Haplotypen (*Founder-Mutation*) zurückführen? Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde bei Individuen mit massiven biallelischen *Repeat*-Expansionen im *RFC1*-Gen eine Mikrosatelliten-Genotypisierung durchgeführt.
4. Weisen nicht-massiv expandierte *RFC1*-Allele eine stabile intergenerationale Vererbung auf? Um diese Fragestellung zu überprüfen, wurde mittels *Fragmentlängenanalyse* ausgewertet, ob *Repeat*-Längenveränderungen bei der Vererbung an nachfolgende Generationen zu beobachten sind.
5. Lassen sich bei Individuen mit massiven biallelischen *RFC1-Repeat*-Expansionen Veränderungen der Genexpression oder der *messenger*-RNA (mRNA)-Prozessierung feststellen? Hierfür erfolgten funktionelle Untersuchungen des *RFC1*-Gens zur Analyse der molekularen Pathomechanismen mittels quantitativer Genexpressionsanalyse und Untersuchungen des *RFC1*-Gentranskripts auf *Exon-Skipping*, *Splice-Site*-Veränderungen und eine *Intron-Retention*.

2 Untersuchte Individuen, Material und Methoden

Im folgenden Abschnitt wird ein Überblick über die in dieser Arbeit untersuchten Individuen gegeben sowie die verwendeten Materialien und angewandten Methoden vorgestellt.

2.1 Untersuchte Individuen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 457 Individuen genetisch untersucht (siehe Abb. 2). Darunter befanden sich 96 Patientinnen und Patienten mit einer Ataxie, 208 Kontrollen sowie 153 Individuen aus 39 multigenerationalen Familien, bei welchen keine Ataxien bekannt waren. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Universität zu Lübeck genehmigt (siehe Ethikvotum in Anhang 7.1). Eine schriftliche Einwilligungserklärung wurde von allen rekrutierten Individuen vor der genetischen Testung eingeholt.

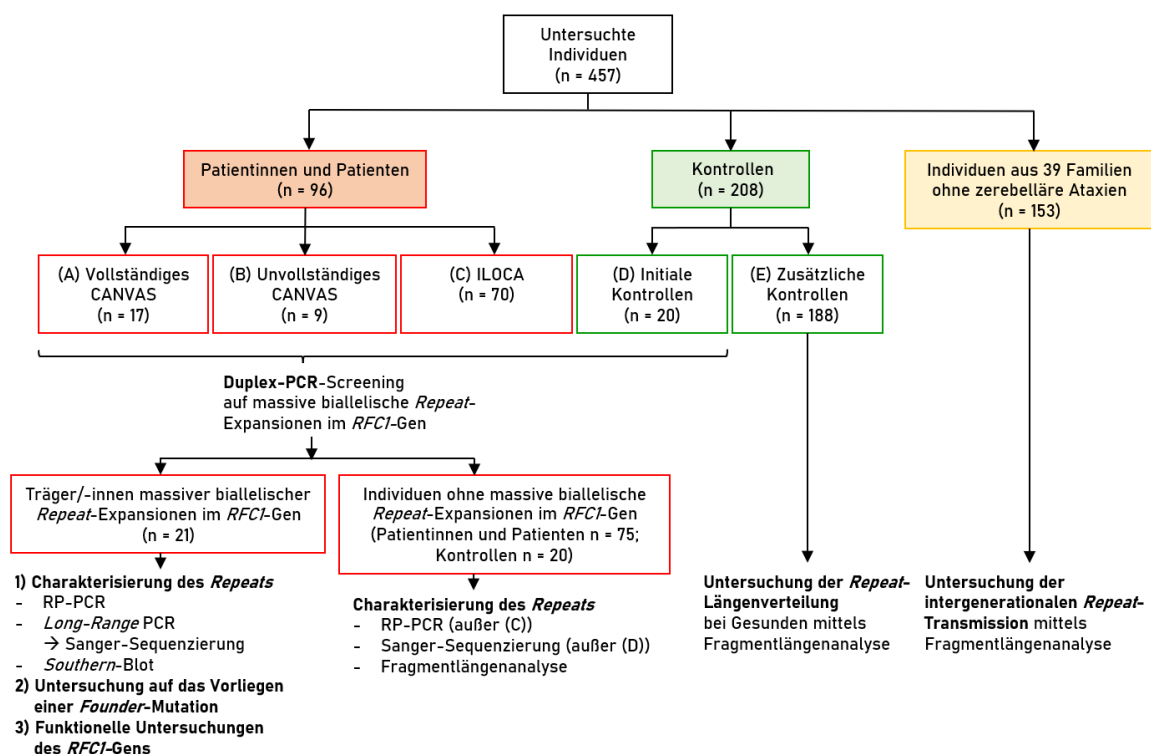


Abb. 2 Übersicht zum Studiendesign.

Diese Abbildung dient als Übersicht über die in dieser Arbeit untersuchten Individuen (n = 457). Die durchgeführten genetischen Analysen zur Identifikation von Individuen mit massiven biallelischen Repeat-Expansionen im RFC1-Gen sowie zur weiteren molekulargenetischen Charakterisierung des Repeats sind in der Abbildung dick-gedruckt und werden in Abschnitt 2.3 Methoden näher erläutert. CANVAS – *Cerebellar Ataxia with Neuropathy and bilateral Vestibular Areflexia Syndrome*; ILOCA – *Idiopathic Late Onset Cerebellar Ataxia*; PCR – Polymerase-Kettenreaktion; RFC1 – *Replication Factor C Subunit 1*; RP-PCR – *Repeat-Primed PCR*. (Quelle: Eigene Darstellung nach Gisatulin *et al.*, 2020).

2.1.1 Patientinnen und Patienten

Unter den in diese Arbeit eingeschlossenen Patientinnen und Patienten ($n = 96$) befanden sich 17 Individuen, welche das vollständige klinische Bild eines CANVAS aufwiesen, 9 Individuen mit einer unvollständigen Manifestation des CANVAS sowie 70 Individuen, welche eine ILOCA aufwiesen (siehe Abb. 2). In den folgenden Abschnitten A) – C) werden die Zusammensetzung und Diagnosekriterien dieser Gruppen näher beschrieben.

A) Patientinnen und Patienten mit einem vollständigen CANVAS

Siebzehn Individuen wurden gemäß der in Tab. 1 aufgeführten Kriterien mit einem vollständigen CANVAS diagnostiziert. Die Anamneseerhebung anhand strukturierter Interviews sowie die klinisch-neurologische Untersuchung erfolgte durch erfahrene Ärztinnen und Ärzte (Prof. Dr. med. Christoph Helmchen; Dr. med. Vera Tadic; Prof. Dr. med. Alexander Münchau; Prof. Dr. med. Norbert Brüggemann) der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck und in zwei Fällen durch ärztliches Fachpersonal der Klinik für Neurologie des Klinikums Aschaffenburg-Alzau. Individuen mit Verdacht auf CANVAS wurden mittels kranialer Magnetresonanztomographie (MRT) und Video-Kopfimpuls-Testung (vKIT) untersucht. Bei den meisten Individuen dieser Patientengruppe ($n = 12$) erfolgte zusätzlich eine elektroneurographische Untersuchung sensibler Nerven der unteren und/oder oberen Extremität.

Tab. 1 Diagnosekriterien für ein vollständiges CANVAS

I. Klinische Manifestation	<i>Typische klinische Trias:</i> Kombination von Symptomen einer – zerebellären Ataxie – bilateralen vestibulären Hypofunktion – sensorischen Neuropathie mit propriozeptiver Beeinträchtigung
II. Apparative Diagnostik	<i>Verminderter VOR</i> mittels: – vKIT: Reduktion des $VOR-Gain^* \leq 0,7$ für beide horizontalen Bogengänge und/oder – Kalorischer Testung: Exzitabilität $\leq 5^\circ$ für beide lateralen Bodengänge
III. Progressiver Krankheitsverlauf	
IV. Abwesenheit alternativer Differentialdiagnosen, die den Phänotyp erklären könnten	

* Der *VOR-Gain* gibt die Veränderung des Augenwinkels relativ zur Veränderung des Kopfwinkels während des Kopfimpulses an und beträgt im physiologisch Fall 1,0.

CANVAS – *Cerebellar Ataxia with Neuropathy and bilateral Vestibular Areflexia Syndrome*; VOR – Vestibulo-okulärer-Reflex; vKIT – Video-Kopfimpuls-Test. (Quelle: Eigene Darstellung nach Gisatulin *et al.*, 2020)

In dieser Patientengruppe befanden sich 4 (23,5%) weibliche und 13 (76,5%) männliche Individuen mit einem Altersdurchschnitt von 68,5 Jahren (SD = 10,1 Jahre) und einem mittleren Erkrankungsalter von 62,3 Jahren (SD = 10,3 Jahre). Die klinischen Daten der Individuen mit vollständigem CANVAS sind in Tab. 2 zusammengefasst.

Tab. 2 Klinische Beschreibung der Patientinnen und Patienten mit einem vollständigen CANVAS

	Vollständiges CANVAS (n = 17)
Erkrankungsalter, Durchschnitt (SD)	62,3 Jahre (10,3 Jahre)
Weiblich, n (%)	4 (23,5)
Positive Familienanamnese, n (%)	6/15 (40,0)
Initiales Symptom, n (%)	
Gangunsicherheit	16 (94,1)
Schwindel	10 (58,8)
Polyneuropathie	2 (11,8)
Hörschwäche	1 (5,9)
Autonome Dysfunktion, n (%)	3/8 (37,5)
Achillessehnenreflex (ASR)	
Normal, n (%)	2/15 (13,3)
Reduziert, n (%)	6/15 (40,0)
Abwesend, n (%)	7/15 (46,7)
SNAP obere Extremität (Nervus medianus)	
Reduziert, n (%)	5/10 (50,0)
Abwesend, n (%)	5/10 (50,0)
SNAP untere Extremität (Nervus suralis)	
Reduziert, n (%)	0/12 (0,0)
Abwesend, n (%)	12/12 (100,0)
Zerebelläre Atrophie im MRT, n (%)	5/14 (35,7)

ASR – Achillessehnenreflex; CANVAS – *Cerebellar Ataxia with Neuropathy and bilateral Vestibular Areflexia Syndrome*; SD – *Standard Deviation*; SNAP – *Sensibles Nervenaktionspotential*; MRT – *Magnetresonanztomographie*.

Die in diese Studie eingeschlossenen Individuen mit einem vollständigem CANVAS entstammen 15 unabhängigen Familien. In zwei Familien (Familie LUE_01 und LUE_02), wurden je zwei betroffene Geschwisterpaare in die Studie eingeschlossen. Eine nähere klinische Beschreibung dieser Familien ist dem Anhang 7.2 zu entnehmen und wurde von dem oben genannten ärztlichen Fachpersonal erhoben.

B) Patientinnen und Patienten mit einem unvollständigen CANVAS

Ein unvollständiges CANVAS wurde diagnostiziert, wenn die typische klinische Trias für ein CANVAS (gemäß Tab. 1) nicht vollständig vorlag. Ein progressiver Erkrankungsverlauf und die Abwesenheit alternativer Differentialdiagnosen wurden, wie auch bei dem vollständigen CANVAS, als Voraussetzungen festgelegt.

Folgende klinische Kombinationen wurden als unvollständiges CANVAS klassifiziert: Das Vorliegen einer **zerebellären Ataxie** mit

- I. einer sensorischen Neuropathie und einer **unilateralen** vestibulären Hypofunktion (gesichert durch apparative Diagnostik nach denselben Kriterien wie beim vollständigen CANVAS, Tab. 1) oder
- II. einer sensorischen Neuropathie und einer **normalen** vestibulären Funktion oder
- III. einer bilateralen vestibulären Hypofunktion ohne eine sensorische Neuropathie in den oberen Extremitäten oder
- IV. einer bilateralen vestibulären Hypofunktion ohne eine sensorische Neuropathie.

Neun Individuen mit einem unvollständigen CANVAS wurden rekrutiert, von denen 3 (33,3%) weiblich und 6 (66,7%) männlich waren. Das mittlere Alter der Patientengruppe betrug 73,4 Jahre (SD = 5,9 Jahre) und das mittlere Erkrankungsalter 66,1 Jahre (SD = 7,0 Jahre). Die Familienanamnese war bei allen Individuen negativ. Die klinischen Daten dieser Patientengruppe sind in Tab. 3 zusammengefasst.

Tab. 3 Klinische Beschreibung der Patientinnen und Patienten mit einem unvollständigen CANVAS

	Unvollständiges CANVAS (n = 9)
Erkrankungsalter, Durchschnitt (SD)	66,1 Jahre (SD = 7,0 Jahre)
Weiblich, n (%)	3 (33,3)
Positive Familienanamnese, n (%)	0/7 (0,0)
Initiales Symptom, n	
Gangunsicherheit	9 (100,0)
Schwindel	4 (44,4)
Autonome Dysfunktion, n (%)	1/3 (33,3)
Achillessehnenreflex (ASR)	
Normal, n (%)	3 (33,3)
Reduziert, n (%)	3 (33,3)
Abwesend, n (%)	3 (33,3)
SNAP untere Extremität (Nervus suralis)	
Reduziert, n (%)	3/5 (60,0)
Abwesend, n (%)	1/5 (20,0)
Zerebelläre Atrophie im MRT, n (%)	1/5 (20,0)

ASR – Achillessehnenreflex; CANVAS – *Cerebellar Ataxia with Neuropathy and bilateral Vestibular Areflexia Syndrome*; MRT – Magnetresonanztomographie; SD – *Standard Deviation*; SNAP – Sensibles Nervenaktionspotential.

C) Patientinnen und Patienten mit einer idiopathischen spät beginnenden zerebellären Ataxie (*Idiopathic Late Onset Cerebellar Ataxia, ILOCA*)

Insgesamt 70 Proben von Individuen mit ILOCA wurden vom Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck bereitgestellt. Die Patientinnen und Patienten hatten sich mit der Fragestellung nach einer molekulargenetischen Diagnostik an die Humangenetik gewandt. Bei diesen Individuen wurden bereits im Vorfeld häufige ursächliche Mutationen für hereditäre zerebelläre Ataxien in diagnostischen Tests ausgeschlossen. Von allen Patientinnen und Patienten wurde eine schriftliche Einverständniserklärung für eine weitere genetische Testung im Rahmen der Forschung eingeholt. Von den rekrutierten Individuen waren 32 (45,7%) weiblich und 38 (54,3%) männlich. Das Durchschnittsalter dieser Patientengruppe lag bei 63,2 Jahren (SD = 11,7 Jahre).

2.1.2 Kontrollen

Für die Etablierung der angewendeten Methoden zur Charakterisierung der *RFC1-Repeat*-Expansion in den Patientenproben wurden initial 20 Kontrollproben verwendet (siehe Abb. 2). Für die Bestimmung der *Repeat*-Längenverteilung innerhalb einer asymptomatischen norddeutschen Population wurden weitere 188 Kontrollen eingeschlossen, welche der DFG-geförderten SFB134-Studie entstammen und im Rahmen einer Kohortenstudie im Raum Lübeck rekrutiert wurden. Von den insgesamt 208 eingeschlossenen Kontrollen waren 135 weiblich (64,9%) und 73 männlich (35,1%). Das durchschnittliche Alter bei Einschluss betrug 41,4 Jahre (SD = 11,2 Jahre).

2.1.3 Individuen aus Familien ohne zerebelläre Ataxien

Um die Stabilität des *RFC1-Repeats* bei der Transmission auf nachfolgende Generationen zu beurteilen, wurden insgesamt 39 Mehrgenerationen-Familien eingeschlossen, deren Mitglieder keine zerebelläre Ataxie aufwiesen (siehe Abb. 2). Hierfür wurde auf im Institut für Neurogenetik vorhandene DNA-Proben zurückgegriffen, welche bereits für andere genetische Untersuchungen in den jeweiligen Familien verwendet wurden. Die Stammbäume der einzelnen Familien können dem Anhang 7.3 entnommen werden. Von den insgesamt 153 eingeschlossenen Individuen waren 79 (51,6%) weiblich und 74 (48,4%) männlich. Der Altersdurchschnitt bei Einschluss betrug 42 Jahre (SD = 18,5 Jahre).

2.2 Material

Der folgende Abschnitt gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Kits, Lösungen, Geräte und Software.

2.2.1 Chemikalien

Tab. 4 Übersicht über die verwendeten Chemikalien

Substanz	Hersteller
100 bp DNA Ladder	New England Bio Labs
Agarose	Biozym
Anti-Digoxigenin-AP, Fab fragments [0,75 U/μl] (from sheep)	Roche
Bam HI-HF® [20 U/μl]	New England Biolabs
Betain-Lösung [5 M]	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Serva
CDP- <i>Star</i> ® Chemilumineszenz-Substrat [0,25 mM]	Sigma-Aldrich
CutSmart® Buffer [10x]	New England Biolabs
dNTPs Mix [10 mM]	MP Biomedicals
DIG Easy Hyb™	Roche
Dimethylsulfoxid (DMSO) [99,9%]	Sigma-Aldrich
Eco RI-HF® [20 U/μl]	New England Biolabs
Ethanol [96%]	Merck
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich
Exonuclease I [20 U/μl]	Thermo Fisher Scientific
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase [1 U/μl]	Thermo Fisher Scientific
GeneScan™ 600 LIZ™ Size Standard v2.0	Applied Biosystems
Hi-Di™ Formamide	Applied Biosystems
HPLC grade H ₂ O	J. T. Baker
Human Genomic DNA	Roche
Maleinsäure	Sigma-Aldrich
Magnesium-Chloride Solution (MgCl ₂) [20 nM]	Solis Biotyne
Midori Green advance DNA stain [1 mM]	Nippon Genetics
Milchpulver	Carl Roth
Natrium-Acetat (NaAc) [3 M]	Merck
Natrium-Chlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich
Natrium-Hydroxid (NaOH)	Merck
Oligonukleotide / <i>Primer</i> [100 μM]	Eurofins MWG Synthesis GmbH

Fortsetzung Tab. 4 Übersicht über die verwendeten Chemikalien

Substanz	Hersteller
Quick-Load® 1 kb Extend DNA Ladder	New England Bio Labs
SSC Buffer [20x]	Sigma-Aldrich
TRIS, Ultra-Pure	MP Biomedicals
Tween 20	Bio-Rad
Salzsäure (HCl) [32%]	Carl Roth

bp – Basenpaar; CDP – Disodium 2-chloro-5-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5-chloro)tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decan}-4-yl)-1-phenyl phosphate; DIG – Digoxigenin; dNTP – Didesoxyribonukleosidtriphosphat; HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*; kb – Kilobasenpaar; SSC – *Standard Sodium Citrate*; TRIS – Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan; U – *Units*.

2.2.2 Kits

Tab. 5 Übersicht über die eingesetzten Kits

Bezeichnung	Hersteller
BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit, 2 nd Generation	Roche
FIREPol® DNA Polymerase [5 U/μl]	Solis BioDyne
Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR	Thermo Fisher Scientific
Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (2)	Thermo Fisher Scientific
PAXgene® Blood RNA Kit 50 v2	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit 250	Qiagen
PCR DIG Probe Synthesis Kit	Roche
Q5® Hot Start High-Fidelity 2x Master Mix	New England Bio Labs
Taq DNA polymerase [5 U/μl]	MP Biomedicals

cDNA – komplementäre DNA; DIG – Digoxigenin; RT-qPCR – Reverse Transkriptase quantitative Echtzeit-PCR; *Taq* – *Thermus aquaticus*; U – *Units*.

2.2.3 Lösungen

In der folgenden Tabelle (Tab. 6) werden die für die in dieser Arbeit durchgeführten DNA-Analysen eingesetzten Lösungen und deren Zusammensetzung aufgeführt.

Tab. 6 Übersicht über die für DNA-Analysen verwendeten Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
Agarosegel	0,7% (w/v) bis 3,0% (w/v)-Agarose in 1x TBE-Puffer
ExoFast	0,5 µl Exonuclease I [20U/µl]; 1 µl FastAP [1 U/µl]
Formamidfarbstoff	47,5 ml Formamid; 2 ml 0,5 M EDTA (pH 8); 0,01 g Bromphenolblau; 0,01g Xylenglykol
TBE-Puffer [5-fach]	445 mM TRIS; 445 mM Borsäure; 10 mM EDTA

EDTA – Ethylendiamintetraacetat; TBE – TRIS-Borat-EDTA; TRIS – Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan; U – *Units*.

Die für den *Southern*-Blot verwendeten Lösungen und deren Zusammensetzung sind Tab. 7 zu entnehmen.

Tab. 7 Übersicht über die für den *Southern*-Blot verwendeten Lösungen

Substanz	Zusammensetzung
0,5x-SSC-Waschpuffer	0,5x SSC; 0,1% (w/v) SDS
2x-SSC-Waschpuffer	2x SSC; 0,1% (w/v) SDS
Blocking-Puffer	2% (w/v) Milchpulver in Maleinsäurepuffer
Denaturierungspuffer	1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH
Depurinierungspuffer	0,25 M HCl
Detektionslösung	0,1 M NaCl; 0,1 M TRIS-HCl; pH = 9,5
Hybridisierungspuffer	50 ml DIG Easy Hyb TM ; 5 µl DIG-markierte Sonde
Maleinsäurepuffer	0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl; pH = 7,5
Neutralisierungspuffer	1,5 M NaCl; 1 M TRIS-HCl; pH 7,4
Prähybridisierungspuffer	50 ml DIG Easy Hyb TM
Transferpuffer	10x SSC
Waschpuffer mit Tween 20	0,3% (w/v) Tween 20 in Maleinsäurepuffer
Visualisierungspuffer	7,8 µl CDP-Star; 773 µl Detektionslösung

CDP – Disodium 2-chloro-5-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5-chloro)tricyclo [3.3.1.1^{3,7}]decan}-4-yl)-1-phenyl phosphate; DIG – Digoxigenin; HCl – Salzsäure; NaCl – Natriumchlorid; NaOH – Natriumhydroxid; SDS – *Sodium Dodecyl Sulfate*; SSC – *Standard Sodium Citrate*; TRIS – Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan.

2.2.4 Geräte

Tab. 8 Übersicht über die eingesetzten Geräte

Gerät	Hersteller
Centrifuge Biofuge Pico	Heraeus, Thermo Fisher Scientific
Centrifuge 5804	Eppendorf
Genetic Analyzer ABI 3130XL und 3500XL	Applied Biosystems
Hybrigene Hybridisation oven	Techne Bibby Scientific
LightCycler 480	Roche
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific
Thermocycler Biometra TAdvanced	Biometra, Analytik Jena
Thermocycler Flex Cycler	Analytik Jena
Thermocycler Master Cycler Pro	Eppendorf
UV-Kamera	BioDoc Analyse

2.2.5 Software und Websites

Tab. 9 Übersicht über die verwendete Software und Websites

Bezeichnung (URL)	Funktion	Hersteller / Urheber
BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)	Sequenz- <i>Alignment</i>	National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine
GeneMapper™ Software v.4.1	Fragmentanalyse	Applied Biosystems
Gene Runner v5.1	Sequenzdarstellung	Frank Buquicchio/ Helio Genetics
LightCycler 480 Software release 1.5.1.62 SP3	Quantitative Echtzeit-PCR-Auswertung	Roche
Mutation Surveyor v3.30	Sequenzanalyse	Soft Genetics
Oligo Explorer v1.1.0	<i>Primer</i> -Design	Gene Link
SNPCheck (https://secure.ngml.org.uk/SNPCheck/snpcheck.htm)	Prüfung der <i>Primer</i> auf das Vorliegen von SNPs	NGRL Manchester
UCSC Genome Browser (https://genome-euro.ucsc.edu)	Genom Browser und <i>In-silico</i> PCR	Jim Kent, University of California

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*; PCR – Polymerase-Kettenreaktion; SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*; UCSC - *University of California, Santa Cruz*.

2.3 Methoden

Um die eingeschlossenen Patienten- und Kontrollgruppen auf das Vorhandensein massiver biallelischer Pentanukleotidexpansionen im *RFC1*-Gen zu screenen sowie zur weiteren genetischen Charakterisierung des *Repeats*, wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Methoden etabliert und angewendet (siehe Abb. 2). Im Folgenden Abschnitt werden diese Methoden nun näher erläutert.

2.3.1 Präparation von Nukleinsäuren

Als Ausgangsmaterial für die genetische Testung der in diese Arbeit eingeschlossenen Individuen wurden Nukleinsäuren aus peripher-venösem Blut präpariert. Die Extraktion der verwendeten DNA-Proben erfolgte im Vorfeld dieser Arbeit durch die labortechnischen Assistentinnen der Arbeitsgruppe (siehe Abschnitt 1.3). In den folgenden Abschnitten wird aus diesem Grund nur auf die Extraktion und Aufarbeitung von RNA-Proben eingegangen, welche im Rahmen dieser Arbeit eigenständig durchgeführt wurden.

2.3.1.1 Präparation von RNA aus venösem Vollblut

Um Veränderungen der Expression des *RFC1*-Gentranskripts zu detektieren, wurde RNA aus peripher-venösem Blut von Individuen mit massiven biallelischen *RFC1-Repeat*-Expansionen sowie Kontrollen extrahiert. Eine wesentliche Herausforderung bei der RNA-Isolation stellt die unter anderem durch ubiquitär vorhandene RNasen bedingte hohe Instabilität von RNA *in-vitro* dar (Rainen *et al.*, 2002). In dieser Arbeit erfolgte die RNA-Extraktion mittels des PAXgene® Blood RNA Kit 50 v2 (siehe Tab. 5) gemäß dem Herstellerprotokoll. Bei diesem Kit werden spezielle Blutentnahmeröhrchen eingesetzt, die nach Herstellerangaben RNA-stabilisierende Reagenzien beinhalten. Aus dem Zelllysats der Leukozyten wird bei diesem System RNA an eine Silica-Membran adsorbiert und nach anschließender Aufreinigung in einem Elutionspuffer gelöst.

2.3.1.2 Synthese von komplementärer DNA (cDNA)

Um extrahierte RNA für anschließende Analysen, wie der Sanger-Sequenzierung oder quantitativen Echtzeit-PCR, zu verwenden, wurde diese mittels reverser Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die cDNA-Synthese erfolgte anhand des Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (siehe Tab. 5) entsprechend dem Herstellerprotokoll. Für die Synthese von cDNA wurden 500 ng RNA eingesetzt und eine 1:4 Verdünnung des Reaktionsprodukts für weitere Anwendungen genutzt.

2.3.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung von Konzentration und Qualität eines Nukleinsäure-Eluats erfolgte mittels Spektralphotometrie. Hierbei wird sich die Eigenschaft der Nukleinsäurebasen zu Nutzen gemacht, Licht einer Wellenlänge von 250 nm bis 270 nm zu absorbieren (Arneemann, 2019). Für die Konzentrationsbestimmung wurde in dieser Arbeit das NanoDrop 1000 Spectrophotometer (siehe Tab. 8) verwendet. Nach einem Nullabgleich gegen Wasser, wurde 1 µl der Nukleinsäurelösung mit Licht einer Wellenlänge von 260nm durchleuchtet und die Abschwächung der Lichtintensität (Extinktion) gemessen. Gemäß dem Lambert Beer'schen Gesetz ist die Extinktion proportional zu der Konzentration einer absorbierenden Substanz, sodass mittels der zugehörigen Geräte-Software automatisch die Nukleinsäurekonzentration berechnet werden konnte.

Im Gegensatz zu Nukleinsäuren, absorbieren Proteine vor allem Licht der Wellenlänge 280 nm (Arneemann, 2019). Als Maß für die Reinheit eines Nukleinsäure-Eluats wurde der Quotient aus der Extinktion bei 260 nm zu der Extinktion bei 280 nm verwendet. Bei einem Quotienten zwischen 1,8 und 2,0 wurde die Probe als rein gewertet.

2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht die *in-vitro*-Vervielfältigung eines definierten DNA-Abschnittes mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase (Saiki *et al.*, 1985; Mullis und Faloona, 1987). Die zu amplifizierende DNA-Region wird hierbei durch kurze Oligonukleotide (*Primer*) festgelegt, welche sich zu beiden Seiten der Zielsequenz komplementär an den Matrizen-Strang (*Forward-* bzw. *Vorwärts-Primer*) sowie den reversen DNA-Strang (*Reverse-* bzw. *Rückwärts-Primer*) anlagern. Die PCR-Reaktion

erfolgt in sich etwa 30- bis 40-mal wiederholenden Zyklen, wobei jeder Zyklus aus den im Folgenden beschriebenen drei Schritten besteht:

- 1) *Denaturierung*: Durch Erhitzen des Reaktionsgemisches auf 95°C werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Doppelsträngen und den *Primern* untereinander gelöst, sodass nur Einzelstränge vorliegen.
- 2) *Anlagerung (Annealing) der Primer*: Eine Temperaturabsenkung ermöglicht die Anlagerung der *Primer* an die komplementären Sequenzen der DNA-Stränge. Die optimale Anlagerungs- bzw. *Annealing*-Temperatur ist individuell für jedes *Primer*-Paar zu bestimmen und abhängig von Faktoren wie der *Primer*-Länge und dem Guanin-Cytosin-(GC)-Gehalt der *Primer*-Oligonukleotide.
- 3) *Elongation*: Das Reaktionsgemisch wird auf das Temperaturoptimum der verwendeten, thermostabilen DNA-Polymerase erhitzt (beispielsweise 72°C für die in den meisten Fällen verwendete *Taq*-DNA-Polymerase). Von der 3'-OH-Gruppe der *Primer* ausgehend, synthetisiert die Polymerase einen zur Matrize komplementären DNA-Strang unter Einbau der im Reaktionsgemisch befindlichen Desoxyribonukleotide (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) in 5'-3'-Richtung.

2.3.2.1 *Primer*-Design und PCR-Optimierung

Für das Design der *Primer* wurde die Software Oligo Explorer v1.1.0 (siehe Tab. 9) verwendet. Die hierfür notwendige Sequenz der Zielregion sowie der flankierenden DNA-Abschnitte (plus/minus 300 bp) wurde anhand der Sequenzdatenbank des UCSC Genome Browsers (Referenzgenom: GRCh37/hg19, siehe Tab. 9) ermittelt. Das *Primer*-Design erfolgte unter Berücksichtigung folgender Kriterien, um eine möglichst hohe Spezifität zu gewährleisten:

- Die Länge der *Primer* sollte 18 bp bis 24 bp betragen.
- Die *Annealing*-Temperatur sollte zwischen 55 °C und 65 °C liegen und sich innerhalb des *Primer*-Paares um weniger als 1 °C unterscheiden.
- Die *Primer* sollten, insbesondere am 3'-OH-Ende, möglichst keine Sekundärstrukturen ausbilden.
- Am 3'-OH-Ende der *Primer*-Sequenz sollten sich möglichst die Basen Guanin oder Cytosin befinden.

- Die komplementäre DNA-Sequenz der *Primer* sollte möglichst keine *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) enthalten. Die *Primer*-Sequenzen wurden mithilfe der Software SNPCheck (Referenzgenom: GRCh37/hg19, siehe Tab. 9) und des UCSC *In-silico* PCR-Tools (Referenzgenom: GRCh37/hg19, siehe Tab. 9) auf das Vorhandensein von SNPs untersucht.

Die Synthese der ausgewählten *Primer* wurde bei der Firma Eurofins MWG Synthesis GmbH in Auftrag gegeben.

Die Testung neuer *Primer*-Paare für die konventionelle PCR erfolgte zunächst bei einer *Annealing*-Temperatur, die anhand der Länge und des GC-Gehalts der *Primer* berechnet wurde. Bei keinem oder einem unspezifischen PCR-Produkt, wurde eine Gradienten-PCR durchgeführt. Hierbei werden innerhalb eines PCR-Programms unterschiedliche *Annealing*-Temperaturen getestet, um das Temperaturoptimum des *Primer*-Paares zu ermitteln. Eine weitere Möglichkeit zur Optimierung bestand in der Zugabe von Betain [0,5-1 M], DMSO [5-10% (v/v)] oder Mg^{2+} [0,5-2 mM].

2.3.2.2 Angewendete PCR-Protokolle

Im Rahmen dieser Arbeit wurden diverse PCR-basierte Untersuchungen zur Charakterisierung der *Repeat*-Expansion im *RFC1*-Gen etabliert und durchgeführt. In den folgenden Abschnitten (A – D) werden die verwendeten Protokolle für konventionelle PCR-Verfahren erläutert. Die PCR-Protokolle für die Sequenzierung (siehe Abschnitt 2.3.4), Fragmentlängenanalyse (siehe Abschnitt 2.3.5) und quantitative Echtzeit-PCR (siehe Abschnitt 2.3.7) werden in den jeweiligen Abschnitten aufgeführt. Alle verwendeten *Primer* mit Verweis auf die jeweiligen Protokolle sind Tab. 33 und Tab. 34 (siehe Anhang 7.4) zu entnehmen.

A) Standardprotokoll für die konventionelle PCR

Für die konventionelle PCR wurde in verschiedenen Fragestellungen ein Standardprotokoll verwendet, welches die rekombinante *Taq*-DNA-Polymerase (siehe Tab. 5) für die DNA-Synthese einsetzt. Aufgrund der limitierten Synthesegeschwindigkeit und Spezifität (keine Korrekturlesefunktion) dieses Enzyms, eignet es sich nur begrenzt für die Amplifikation langer komplexer Sequenzen (McInerney *et al.*, 2014). Daher wurde dieses Protokoll im Wesentlichen für die Vervielfältigung kurzer bis mittellangen DNA-Abschnitte (bis ~2000

bp) verwendet. Die Dauer des Elongationsschrittes im PCR-Zyklus wurde abhängig von der erwarteten Produktlänge und der DNA-Synthesegeschwindigkeit der *Taq*-DNA-Polymerase (~1 kb/min) gewählt. Der eingesetzte Reaktionsansatz und das verwendete Thermocycler-Programm sind Tab. 10 und Tab. 11 zu entnehmen.

Tab. 10 Reaktionsansatz für die Standard-PCR

Substanz	Konzentration	Konzentration im Ansatz	Volumen [µl]
HPLC-H ₂ O	-	-	4,23
dNTP-Mix	1 mM (je dNTP)	200 µM (je dNTP)	3,0
<i>Taq</i> -Puffer	10-fach	1-fach	1,5
F-Primer	10 µM	0,4 µM	0,6
R-Primer	10 µM	0,4 µM	0,6
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	5 U/µl	0,023 U/µl	0,07
DNA	10 ng/µl	3,33 ng/µl	5,0
Gesamtansatz			15,0

dNTP – Desoxyribonukleosidtriphosphat; F – *Forward* bzw. Vorwärts; HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*; PCR – Polymerase-Kettenreaktion; R – *Reverse* bzw. Rückwärts; *Taq* – *Thermus aquaticus*; U – *Units*.

Tab. 11 Thermocycler-Programm für die Standard-PCR

	Temperatur [°C]	Dauer	Funktion
	95	5 min	Initiale Denaturierung
35 Zyklen	95	30 sec	Denaturierung
	X*	30 sec	<i>Annealing</i>
	72	Y** sec	Elongation
	72	10 min	Terminale Elongation
	4	unendlich	Endtemperatur

*Die *Annealing*-Temperatur (hier als X gekennzeichnet) unterscheidet sich je nach *Primer*-Paar. Die genauen *Annealing*-Temperaturen der verwendeten *Primer* sind Tab. 33 und Tab. 34 (siehe Anhang 7.4) zu entnehmen.

**Die Elongationszeit (hier als Y gekennzeichnet) wurde entsprechend der erwarteten Produktlänge und der Synthesegeschwindigkeit der eingesetzten *Taq*-DNA-Polymerase (~ 1 min/kb) gewählt.

B) Duplex-PCR

Die Länge der zu untersuchenden Pentanukleotidexpansion im *RFCI*-Gen liegt in einem Bereich von ~2–10 kb (Cortese *et al.*, 2019) und ist damit zu groß, um mittels PCR nach Standardprotokoll (mit einer Elongationszeit von 30s) amplifiziert zu werden. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit als Screening-Methode für das Vorhandensein massiver biallelischer Expansionen eine Duplex-PCR etabliert.

Das Prinzip der Duplex-PCR basiert auf der Verwendung zweier verschiedener *Primer*-Paare in einem Reaktionsansatz.

- 1) Ein *Primer*-Paar, welches das potenziell expandierte *Repeat* (*RFCI*, Intron 2) überspannt.
- 2) Ein zweites *Primer*-Paar, welches in demselben Reaktionsansatz eine weitere unabhängige Sequenz amplifiziert (hier *PRKN*, Exon 2). Dieses PCR-Produkt dient als Positivkontrolle für die DNA-Beladung des Reaktionsgemischs.

Das PCR-Produkt wurde anschließend mittels Agarosegelelektrophorese (siehe Abschnitt 2.3.3) analysiert. Auf diese Weise konnten durch das Vorhandensein der Kontrollbande bei fehlender *RFCI*-Bande, Träger/-innen massiver biallelischer Expansionen identifiziert werden. Der für die Duplex-PCR eingesetzte Reaktionsansatz und das verwendete Thermocycler-Programm sind Tab. 12 und Tab. 13 zu entnehmen.

Tab. 12 Reaktionsansatz für die Duplex-PCR

Substanz	Konzentration	Konzentration im Ansatz	Volumen [μ l]
HPLC-H ₂ O	-	-	4,2
dNTP-Mix	1 mM (je dNTP)	200 μ M (je dNTP)	3,0
<i>Taq</i> -Puffer	10-fach	1-fach	1,5
<i>RFCI</i> -Intron 2-F- <i>Primer</i>	10 μ M	0,27 μ M	0,4
<i>RFCI</i> -Intron 2-R- <i>Primer</i>	10 μ M	0,27 μ M	0,4
<i>PRKN</i> -Exon 2-F- <i>Primer</i>	10 μ M	0,13 μ M	0,2
<i>PRKN</i> -Exon 2-R- <i>Primer</i>	10 μ M	0,13 μ M	0,2
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	5 U/ μ l	0,03 U/ μ l	0,1
DNA	10 ng/ μ l	3,33 ng/ μ l	5,0
Gesamtansatz			15,0

dNTP – Desoxyribonukleosidtriphosphat; F – *Forward* bzw. Vorwärts; HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*; PCR – Polymerase-Kettenreaktion; *PRKN* – *Parkin*; R – *Reverse* bzw. Rückwärts; *RFCI* – *Replication Factor C Subunit 1*; *Taq* – *Thermus aquaticus*; U – *Units*.

Tab. 13 Thermocycler-Programm für die Duplex-PCR

	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Dauer
	95	7 min
35 Zyklen	95	45 sec
	63	45 sec
	72	6 min
	72	10 min
	4	unendlich

C) Repeat-Primed-PCR (RP-PCR)

Um qualitativ bewerten zu können, ob das zu untersuchende *Repeat* (*RFC1*, Intron 2) in einer Probe expandiert war, wurde in dieser Arbeit eine *Repeat-Primed-PCR* (RP-PCR) etabliert. Bei dieser PCR-Methode werden in einem Reaktionsansatz drei verschiedene *Primer* verwendet (siehe Abb. 3):

- 1) *Locus-spezifischer Primer*: Der Locus-spezifische *Primer* lagert sich komplementär an eine definierte genomische Sequenz außerhalb des *Repeats* an.
- 2) *Repeat-Primer (RP-Primer)*: Der *RP-Primer* besteht aus der *Repeat*-Sequenz und einer 5'-M13-Sequenz. Der *RP-Primer* lagert sich willkürlich innerhalb der *Repeat*-Sequenz an, sodass viele unterschiedlich lange PCR-Fragmente resultieren.
- 3) *M13-Primer*: Die Sequenz des *M13-Primer* ist identisch zu der 5'-M13-Sequenz des *RP-Primers*. Das 5'-Ende des *Primers* ist mit einem fluoreszierenden Farbstoff (FAM) markiert, sodass die PCR-Fragmente mittels Fragmentlängenanalyse (siehe Abschnitt 2.3.5) untersucht werden können.

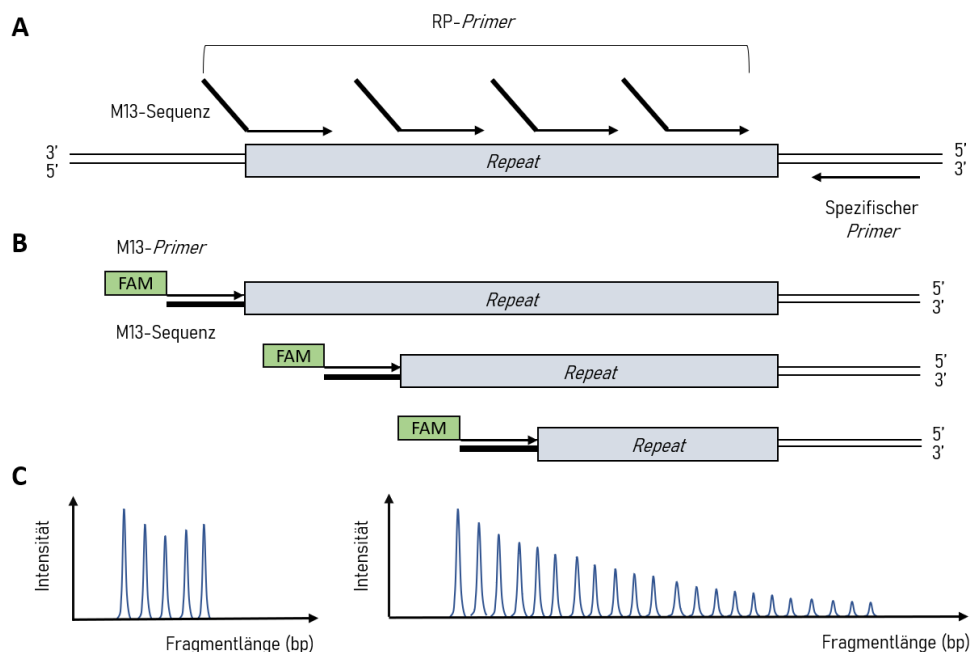


Abb. 3 Schematische Darstellung des Prinzips einer *Repeat-Primed-PCR* (RP-PCR).

(A) Der Locus-spezifische *Primer* bindet an eine definierte DNA-Sequenz außerhalb des *Repeats*. Der *Repeat-Primer* (RP-Primer) lagert sich zufällig innerhalb der *Repeat*-Sequenz an, sodass unterschiedlich lange PCR-Produkte resultieren. (B) In späteren PCR-Zyklen lagert sich der mit dem Fluoreszenzfarbstoff FAM markierte M13-Primer an die 5'-M13-Sequenz der Amplifikate an. Folglich entstehen 5'-FAM-markierte DNA-Fragmente, welche mittels Fragmentlängenanalyse (siehe Abschnitt 2.3.5) detektiert werden können. (C) Die Illustration zeigt beispielhafte Elektropherogramme einer nicht-expandierten (links) und einer expandierten Probe (rechts). Die *Peaks* entsprechen unterschiedlich langen DNA-Fragmenten. Ist ein *Repeat* expandiert resultieren längere DNA-Fragmente, welche ein typisches, kontinuierliches „Sägezahn“-Muster im Elektropherogramm erzeugen. bp – Basenpaar; FAM – Fluoreszenzfarbstoff 6-Carboxyfluorescein; PCR – Polymerase-Kettenreaktion; RP-Primer – *Repeat-Primer*. (Quelle: Eigene Darstellung)

Das expandierte *Repeat* im *RFCI*-Gen weist eine andere Sequenz auf (AAGGG oder AAAGG) als das Wildtyp-*Repeat* (AAAAG) (Cortese *et al.*, 2019). Aus diesem Grund wurden für die RP-PCR drei verschiedene Ansätze verwendet, welche jeweils einen der *Repeat*-Sequenz entsprechenden RP-*Primer* beinhalten (Ansatz 1: AAAAG-RP-*Primer*; Ansatz 2: AAAGG-RP-*Primer*; Ansatz 3: AAGGG-RP-*Primer*). Da die herkömmliche *Taq*-DNA-Polymerase nur bedingt zur Amplifikation langer, komplexer Sequenzen geeignet ist, wurde für die Ansätze 2 und 3 die *FIREPol*® DNA-Polymerase (siehe Tab. 5) verwendet, welche nach Herstellerangaben eine höhere Prozessivität und Spezifität aufweist. Die verwendeten Reaktionsansätze und Thermocycler-Programme sind Tab. 14 und Tab. 15 zu entnehmen.

Die PCR-Produkte wurden mittels Fragmentlängenanalyse (siehe Abschnitt 2.3.5) untersucht. Hierfür wurden 2 µl des RP-PCR-Produkts einem Gemisch aus 9,7 µl HiDi™-Formamide (siehe Tab. 4) und 0,3 µl GeneScan™ 600 LIZ™ Längenstandard (siehe Tab. 4) zugeben. Nach einer fünfminütigen Denaturierung bei 95°C in einem Thermocycler erfolgte die Analyse der PCR-Produkte mittels kapillarer Elektrophorese. Anhand der resultierenden Anzahl der *Peaks* in dem Elektropherogramm, konnte anschließend bewertet werden, ob eine *Repeat*-Expansion vorliegt.

Tab. 14 Reaktionsansatz für die *Repeat*-Primed-PCR (RP-PCR)

Substanz [Konzentration]	Konzentration im Ansatz	Ansatz 1* Volumen [µl]	Ansatz 2* + 3* Volumen [µl]
HPLC-H ₂ O	-	1,05	0,05
dNTP-Mix [1mM je dNTP]	200 µM (je dNTP)	3,0	3,0
Polymerase-Puffer [10-fach]	1-fach	1,5 (<i>Taq</i> -Puffer)	1,5 (<i>FIREPol</i> -Puffer)
Locus-spezifischer <i>Primer</i> -R [10 µM]	0,4 µM	0,6	0,6
<i>Repeat</i> - <i>Primer</i> -F [10 µM]	0,2 µM	0,3	0,3
5'-(FAM)-M13- <i>Primer</i> -F [10 µM]	0,2 µM	0,3	0,3
Betaine [5 M]	0,2 M	0,6	0,6
Solution S** [10-fach]	1-fach	1,5	1,5
MgCl ₂ [25 mM]	1,67 mM	-	1,0
DNA-Polymerase [5 U/µl]	0,05 U/µl	0,15 (<i>Taq</i> -DNA-Polymerase)	0,15 (<i>FIREPol</i> -DNA-Polymerase)
DNA [10 ng/µl]	4 ng/µl	6,0	6,0
Gesamtansatz		15,0	15,0

* Für Ansatz 1 wurde ein *Repeat*-*Primer* (RP-*Primer*) eingesetzt, der einer AAAAG-Sequenz entspricht. Für Ansatz 2 wurde der AAAGG-RP-*Primer* und für Ansatz 3 ein AAGGG-RP-*Primer* eingesetzt. Die genauen Sequenzen der verwendeten RP-*Primer* sind Tab. 33 (siehe Anhang 7.4) zu entnehmen.

**PCR-Zusatz aus dem *FIREPol*® DNA Polymerase-Kit (siehe Tab. 5).

dNTP – Desoxyribonukleosidtriphosphat; F – *Forward* bzw. Vorwärts; FAM – Fluoreszenzfarbstoff 6-Carboxyfluorescein; HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*; MgCl₂ – Magnesiumchlorid; PCR – Polymerase-Kettenreaktion; R – *Reverse* bzw. Rückwärts; *Taq* – *Thermus aquaticus*; U – *Units*.

Tab. 15 Thermocycler-Programm für die *Repeat-Primed-PCR* (RP-PCR)

	Temperatur [°C]	Dauer
	95	5 min
10 Zyklen	95	1 min
	X* – 0,4/Zyklus	30 sec
	72	4 min
25 Zyklen	95	1 min
	Y**	30 sec
	72	4 min + 10 sec/Zyklus
	72	15 min
	4	unendlich

* Für die ersten 10 PCR-Zyklen wurde für Ansatz 1 (beinhaltet den AAAAG-*Repeat* (RP)-*Primer*) eine *Annealing*-Temperatur (hier als X gekennzeichnet) von 64°C gewählt. Für Ansatz 2 (beinhaltet AAAGG-RP-*Primer*) sowie Ansatz 3 (beinhaltet AAGGG-RP-*Primer*) betrug die *Annealing*-Temperatur 66°C.

** Für die letzten 25 PCR-Zyklen wurde für Ansatz 1 (beinhaltet den AAAAG-RP-*Primer*) eine *Annealing*-Temperatur (hier als Y gekennzeichnet) von 60°C gewählt. Für Ansatz 2 (beinhaltet AAAGG-RP-*Primer*) sowie Ansatz 3 (beinhaltet AAGGG-RP-*Primer*) betrug die *Annealing*-Temperatur 62°C.

D) *Long-Range* PCR

Die Amplifikation langer DNA-Fragmente (ab ~2000 bp) ist mittels Standardprotokoll für die PCR nur bedingt möglich. Um die Analyse der großen biallelischen Expansionen im *RFC1*-Gen mittels Sanger-Sequenzierung zu ermöglichen, erfolgte im Rahmen dieser Arbeit die Etablierung einer sogenannten *Long-Range*-PCR. Hierbei wurde die Q5 High-Fidelity DNA-Polymerase (siehe Tab. 5) verwendet, welche im Vergleich zur herkömmlichen *Taq*-Polymerase, nach Herstellerangaben eine höhere Spezifität und DNA-Synthesegeschwindigkeit aufweist und die Vervielfältigung langer DNA-Fragmente ermöglicht. Der für die *Long-Range*-PCR verwendete Reaktionsansatz und das eingesetzte Thermocycler-Programm sind Tab. 16 und Tab. 17 zu entnehmen.

Tab. 16 Reaktionsansatz für die *Long-Range*-PCR

Substanz	Konzentration	Konzentration im Ansatz	Volumen [µl]
HPLC-H ₂ O	-	-	2,5
Q5-Master-Mix	2-fach	1-fach	12,5
F- <i>Primer</i>	10 µM	0,5 µM	1,25
R- <i>Primer</i>	10 µM	0,5 µM	1,25
Betain	5 M	0,5 M	2,5
DNA	10 ng/µl	2 ng/µl	5,0
Gesamtansatz			25,0

F – *Forward* bzw. Vorwärts; HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*; PCR – Polymerase-Kettenreaktion; R – *Reverse* bzw. Rückwärts.

Tab. 17 Thermocycler-Programm für die *Long-Range-PCR*

	Temperatur [°C]	Dauer
35 Zyklen	98	1 min
	98	10 sec
	68	30 sec
	72	4 min
	72	2 min
	4	unendlich

2.3.3 Agarosegelelektrophorese und Gelelution

Die Agarosegelelektrophorese ermöglicht mittels Anlegens elektrischer Spannung eine Längenauftrennung von DNA-Fragmenten. Aufgrund der negativen Ladung des Phosphodiesterückgrats der DNA-Stränge, wandern diese in einem elektrischen Feld in Richtung der positiv geladenen Anode. Die elektrophoretische Mobilität der DNA-Fragmente ist umgekehrt proportional zu deren Länge. Je nach Agarosekonzentration im Gel können DNA-Fragmente unterschiedlicher Längenbereiche aufgetrennt werden. Zur Visualisierung der Nukleinsäuren wird dem Gelgemisch ein interkalierender Farbstoff (hier Midori Green, siehe Tab. 4) zugesetzt, welcher bei Einlagerung zwischen DNA-Doppelstränge und UV-Bestrahlung fluoresziert. Somit lassen sich unter anderem der qualitative (Spezifität) und der quantitative Erfolg einer PCR beurteilen.

Durchführung einer Agarosegelelektrophorese

Je nach Fragestellung und Länge der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurde eine Agarosekonzentration von 0,7% (w/v) bis 3,0% (w/v) verwendet. Im Folgenden wird die Durchführung der Agarosegelelektrophorese beschrieben:

- 1) Suspension von Agarose in 1xTBE-Lösung (siehe Tab. 6). Je nach benötigter Konzentration und Größe des Gels wurden unterschiedliche Mengen Agarose und TBE-Lösung gewählt.
- 2) Aufkochen der Gelsuspension und Zugabe von 1/20 Vol. Midori Green
- 3) Gießen des Gels in eine mit ein bis zwei Kämme bestückte Gelkammer
- 4) Einlegen des Gels in eine mit 1-fach TBE-Puffer befüllte Elektrophoresekammer
- 5) Versetzen von 3 µl des PCR-Produkts mit 3 µl Formamid-haltigen Farbstoff
- 6) Elektrophorese der Proben sowie eines geeigneten Längenstandards bei 80-120 V für 20-60 min

Mittels des interkalierenden Farbstoffs Midori Green wurden die Banden unter UV-Beleuchtung visualisiert und mit einer Kamera mit angeschlossener Bildverarbeitungssoftware dokumentiert.

2.3.3.1 Gelelution

Die Elution von PCR-Produkten aus einem Agarosegel erfolgte zu deren Aufreinigung von Substanzen wie Nukleotiden, *Primern* und unspezifischen Amplifikaten. Hierfür wurden die PCR-Banden unter UV-Durchleuchtung aus dem Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten und mittels des QIAquick Gel Extraction Kits 250 (siehe Tab. 5) gemäß dem Herstellerprotokoll aufgereinigt. In diesem System werden die DNA-Fragmente an eine Silica-Membran adsorbiert und nach mehreren Wasch- und Zentrifugationsschritten in einem Elutionspuffer gelöst.

2.3.4 Sanger-Sequenzierung im ABI 3130XL/3500XL-System

Für die Sequenzierung PCR-amplifizierter DNA-Abschnitte wurde ein modifiziertes Protokoll des Kettenabbruchverfahrens nach Sanger verwendet (Sanger *et al.*, 1977). Zu sequenzierende PCR-Produkte werden hierbei einer PCR zugeführt, bei der neben Desoxyribonukleotiden (dNTPs) auch Didesoxyribonukleotide (ddNTPs) als Substrate verwendet werden. Durch die fehlende OH-Gruppe an der C3'-Position des Ribosemoleküls kommt es bei zufälligem Einbau der ddNTPs zu einem Abbruch der Polymerisationsreaktion. Dies führt bei ausreichend langer Reaktionsdauer dazu, dass unterschiedlich lange Kettenabbruchfragmente mit jeweils einem endständigen ddNTP entstehen, welche mit einem basenspezifischen Fluoreszenzfarbstoff markiert sind. Mittels kapillarelektrophoretischer Längenauftrennung der Kettenabbruchfragmente in einem ABI 3130XL/3500XL Genetic Analyzer (siehe Tab. 8) kann anhand der Messung der Fluoreszenzsignale die Basensequenz ermittelt werden.

Durchführung der Sanger-Sequenzierung

Zu sequenzierende PCR-Produkte wurden zunächst durch Zugabe von ExoFast-Lösung (1,5 µl, siehe Tab. 6) enzymatisch aufgereinigt. Hierbei werden endständige Einzelstrangreste durch die Exonuklease-I (siehe Tab. 4) verdaut und die DNA-Enden mittels der Fast Alkaline Phosphatase (siehe Tab. 4) dephosphoryliert. Der ExoFast-Verdau erfolgte unter den in Tab. 18 aufgeführten Bedingungen.

Tab. 18 Thermocycler-Programm für den ExoFast-Verdau

Temperatur [°C]	Dauer	Funktion
37	15 min	Inkubation
85	15 min	Inaktivierung
4	unendlich	Endtemperatur

Für die Sequenzier-PCR (siehe Tab. 19) wurde das BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (siehe Tab. 5) verwendet. Der zugehörige Terminormix 3.1. beinhaltet eine *Taq*-DNA-Polymerase, dNTPs und fluoreszenzmarkierte ddNTPs. Das für die Sequenzier-PCR verwendete Thermocycler-Programm ist Tab. 20 zu entnehmen.

Tab. 19 Reaktionsansatz für die Sequenzier-PCR

Substanz	Konzentration	Konzentration im Ansatz	Volumen [µl]
HPLC-H ₂ O	-	-	5,5
Sequenzpuffer	5-fach	0,75-fach	1,5
Primer (F oder R)	10 µM	0,5 µM	0,5
Terminormix 3.1	-	-	0,5
ExoFast-Produkt	-	-	2,0
Gesamtansatz			10,0

F – *Forward* bzw. Vorwärts; HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*; PCR – Polymerase-Kettenreaktion; R – *Reverse* bzw. Rückwärts.

Tab. 20 Thermocycler-Programm für die Sequenzier-PCR

	Temperatur [°C]	Dauer
25 Zyklen	96	1 min
	96	10 sec
	60	80 sec
	4	unendlich

Die Aufreinigung der Kettenabbruchfragmente aus dem Sequenzier-PCR-Produkt erfolgte mittels einer Natriumacetat-Ethanol-Fällung. Die Durchführung der Fällung erfolgte in den aufgeführten Schritten:

- 1) Zugabe eines Gemischs aus 2 µl Natrium-Acetat [3 M], 50 µl Ethanol [96%] und 10 µl H₂O zu dem Sequenzier-PCR-Produkt
- 2) Lichtgeschützte Inkubation bei Raumtemperatur für 15 min
- 3) Zentrifugation bei 13.000 rpm (16.060 g) für 15 min
- 4) Abnehmen des Überstandes und Zugabe von 100 µl Ethanol [70%]
- 5) Zentrifugation bei 13.000 rpm (16.060 g) für 10 min
- 6) Abnehmen des Überstandes und Trocknen bei 55 °C für 5 min
- 7) Zugabe von 15 µl HiDi™-Formamide und lichtgeschütztes Lösen bei 37°C für 1 h

Anschließend erfolgte die kapillarelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente durch die mit einem Polymer (POP-7TM Polymer, Applied Biosystems) gefüllten Kapillaren eines ABI 3130XL oder 3500XL Genetic Analyzers (siehe Tab. 8). Mittels eines Lasers wurden die endständigen, fluoreszierenden ddNTPs der Kettenabbruchfragmente detektiert und anhand der Abfolge der jeweiligen Fluoreszenzsignale die Basensequenz bestimmt. Die Darstellung der Sequenzen erfolgte in Form eines Elektropherogramms, bei dem die gemessenen Fluoreszenzintensitäten in Form von Kurven bzw. *Peaks* dargestellt wurden (Cytosin = blau, Guanin = schwarz, Adenin = grün, Thymin = rot). Die Sequenzen wurden entweder manuell durch den Vergleich mit einer aus einer Genomdatenbank gewonnen Referenzsequenz oder mit Hilfe der Software Mutation Surveyor v3.30 (siehe Tab. 9) ausgewertet.

2.3.5 Fragmentlängenanalyse im ABI 3130XL/3500XL System

Die Fragmentlängenanalyse ermöglicht eine basenpaargenaue Längenbestimmung fluoreszenzmarkierter DNA-Fragmente mittels kapillarer Elektrophorese. Hierfür erfolgte zunächst eine PCR-Amplifikation des zu untersuchenden DNA-Abschnitts unter zusätzlicher Verwendung eines fluoreszenzmarkierten M13-*Primers*, sodass resultierende PCR-Produkte mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt waren. Anschließend erfolgte eine Auftrennung der PCR-Produkte sowie eines fluoreszenzmarkierten Längenstandards mittels kapillarer Elektrophorese in einem ABI 3130XL/3500XL Genetic Analyzer (siehe Tab. 8). Aufgrund der negativen Ladung des Phosphodiesterückgrats der DNA-Fragmente wandern diese durch das Polymer (POP-7TM Polymer, Applied Biosystems) in den Kapillaren in Richtung der positiv geladenen Anode. Durch einen am Ende der Kapillaren installierten Laser werden die Fluorochrome der DNA-Fragmente zur Fluoreszenz angeregt. Entstehende Lichtsignale werden detektiert und mittels der zugehörigen Computer-Software (GeneMapperTM v.4.1, siehe Tab. 9) ausgewertet. Anhand der Laufzeit der PCR-Produkte und der Fragmente des Längenstandards wird somit eine automatische Berechnung der Fragmentlänge ermöglicht.

Durchführung der Fragmentlängenanalyse

Die Fluoreszenzmarkierung der DNA-Fragmente erfolgte durch Zugabe eines am 5'-Ende mit einem Fluorochrom (FAM) markierten M13F-*Primer*. Die Vorwärts-PCR-*Primer* der spezifischen *Primer*-Paare sind an ihrem 5'-Ende durch die M13F-Sequenz erweitert,

wodurch eine Anlagerung des fluoreszenzmarkierten *Primers* an die resultierenden DNA-Stränge ermöglicht wurde. Auf diese Weise entstanden 5'-(FAM)-markierte PCR-Produkte, welche anschließend mittels Fragmentlängenanalyse untersucht wurden. Der Reaktionsansatz für die PCR und das verwendete Thermocycler-Programm sind Tab. 21 und Tab. 22 zu entnehmen.

Tab. 21 Reaktionsansatz für die Fragmentlängenanalyse

Substanz	Konzentration	Konzentration im Ansatz	Volumen [μ l]
HPLC-H ₂ O	-	-	2,08
dNTPs	1 mM (je dNTP)	200 μ M (je dNTP)	1,0
Taq-Puffer	10-fach	1-fach	0,5
F- <i>Primer</i>	10 μ M	0,12 μ M	0,06
R- <i>Primer</i>	10 μ M	0,12 μ M	0,06
5'-[FAM]-M13F- <i>Primer</i>	10 μ M	0,10 μ M	0,05
Betain	5 M	0,2 M	0,2
Taq-Polymerase	5 U/ μ l	0,05 U/ μ l	0,05
DNA	10 ng/ μ l	2 ng/ μ l	1,0
Gesamtansatz			5,0

dNTP – Desoxyribonukleosidtriphosphat; F – *Forward* bzw. Vorwärts; FAM – Fluoreszenzfarbstoff 6-Carboxyfluorescein; HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*; PCR – Polymerase-Kettenreaktion; R – *Reverse* bzw. Rückwärts; Taq – *Thermus aquaticus*; U – *Units*.

Tab. 22 Thermocycler-Programm für die Fragmentlängenanalyse

	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Dauer
	95	7 min
35 Zyklen	95	45 sec
	X*	45 sec
	72	Y** sec
	72	10 min
	4	unendlich

*Die *Annealing*-Temperatur (hier als X gekennzeichnet) unterscheidet sich je nach *Primer*-Paar. Die genauen *Annealing*-Temperaturen der verwendeten *Primer* sind Tab. 33 und Tab. 34 (siehe Anhang 7.4) zu entnehmen.

**Die Elongationszeit (hier als Y gekennzeichnet) wurde entsprechend der erwarteten Produktlänge und der Synthesegeschwindigkeit der eingesetzten Taq-DNA-Polymerase (~ 1 min/kb) gewählt.

Die Vorbereitungsschritte der PCR-Produkte für die Kapillarelektrophorese waren wie folgt:

- 1) Verdünnung des PCR-Produkts in HPLC-H₂O (1:6)
- 2) Zugabe von 1 μ l verdünntem PCR-Produkt zu einer Mischung aus HiDiTM-Formamide [10,7 μ l] und fluoreszenzmarkiertem Längenstandard [0,3 μ l]
- 3) Denaturierung der Proben durch Inkubation in einem Thermocycler bei 95 $^{\circ}$ C für 5 min
- 4) Anschließend sofortiges Kühlen der Proben auf Eis
- 5) Kapillare Elektrophorese in einem ABI 3130XL oder 3500XL Genetic Analyzer und Auswertung mittels GeneMapperTM v.4.1-Software

2.3.6 Mikrosatelliten-Genotypisierung

Um zu überprüfen, ob die biallelischen Expansionen im *RFC1*-Gen auf einen gemeinsamen ursprünglichen Haplotypen zurückzuführen sind (*Founder*-Mutation), erfolgte eine Genotypisierung der Expansionsträger/-innen anhand von Mikrosatelliten-Markern. Mikrosatelliten (auch *Short Tandem Repeats*, STR) sind polymorphe, vorwiegend nicht-kodierende Bereiche des humanen Genoms, welche aus zwei bis sechs Basenpaare langen, repetitiven Sequenzen bestehen (Gymrek, 2017).

Die Genotypisierung der *RFC1*-Region (Chromosom 4p14) erfolgte unter Verwendung von vier Mikrosatelliten-Markern (siehe Tab. 23), welche in an diese angrenzenden genomischen Bereichen lokalisiert sind. Mittels PCR-Amplifikation und Bestimmung der Produktlängen konnten für Expansionsträger/-innen die Längen der Mikrosatelliten-Marker (Genotypen) bestimmt werden. Werden die Genotypen mehrerer Mikrosatelliten-Marker, die auf einem einzelnen der beiden homologen Chromosomen aufeinander folgen, geordnet, spricht man von Haplotypen. Eine Übereinstimmung der Mikrosatelliten-Haplotypen der Expansionsträger/-innen würde für einen gemeinsamen Ursprung der Mutation (*Founder*) sprechen.

Die PCR-Amplifikation sowie die Längenbestimmung der Mikrosatelliten-Marker erfolgte gemäß dem in Abschnitt 2.3.5 beschriebenen Protokoll für die Fragmentlängenanalyse. Um eine korrekte Längenbestimmung der Allele zu gewährleisten, wurden zwei Kontrollproben der Individuen 1331.1 und 1331.2 des *Centre d'Étude du Polymorphisme Humain* (CEPH) für die Genotypisierung der einzelnen Marker verwendet. Die entsprechenden Allellängen dieser Proben sind unter <https://www.biostat.wisc.edu/~kbroman/publications/-mfdmaps/info/info4.txt> (Stand: 14.12.2021) zu finden.

Tab. 23 Verwendete Mikrosatelliten-Marker

Mikrosatelliten-Marker	Lokus	Genomische Position	Länge	Entfernung zum <i>RFC1</i> -Repeat
D4S3001	4p15.1	Chr4: 33083477 - 33083783	306 bp	- 6,27 Mb
D4S1581	4p14	Chr4: 38137384 - 38137680	296 bp	- 1,21 Mb
D4S2382	4p14	Chr4: 40050655 - 40051047	392 bp	+ 0,70 Mb
D4S174	4p14	Chr4: 40833788 - 40834103	315 bp	+ 1,48 Mb

bp – Basenpaare; Chr4 – Chromosom 4; Mb – Megabasenpaare; *RFC1* – *Replication Factor C Subunit 1*.

2.3.7 Quantitative Echtzeit-PCR mit SYBR-Green

Die quantitative Echtzeit-PCR ist eine auf der konventionellen PCR (siehe Abschnitt 2.3.2) basierende Methode, welche die Quantifizierung von Ausgangsmaterial für eine PCR ermöglicht. Das Verfahren beruht auf der Markierung doppelsträngiger DNA durch Zugabe eines interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs (hier SYBR-Green I) zu dem PCR-Reaktionsansatz. Mittels Fluoreszenzmessungen nach jedem Amplifikationszyklus kann auf diese Weise in Echtzeit die Zunahme des PCR-Produkts verfolgt werden. Dies ermöglicht die Identifizierung jenes PCR-Zyklus, bei dem die gemessene Fluoreszenz erstmalig die Hintergrundintensität überschreitet (*Threshold Cycle*, C_T) und die PCR in eine exponentielle (log-lineare) Phase übergeht. Da die für eine PCR eingesetzte DNA-Menge umgekehrt proportional zu dem C_T -Wert ist, kann durch Amplifikation bekannter Mengen Standard-DNA und Messung der jeweiligen C_T -Werte eine Standardkurve ermittelt werden. Für zu analysierende Proben kann deren DNA-Ausgangsmenge anschließend anhand des gemessenen C_T -Werts und der Standardkurve berechnet werden.

Die quantitative Echtzeit-PCR wurde in dieser Arbeit einerseits für die Identifizierung homozygoter Träger/-innen des Wildtyp-Allels für das untersuchte *Repeat* (*RFC1*, Intron 2, genomische DNA-Ebene), andererseits für die Expressionsanalyse des *RFC1*- und *WDR19*-Gens (cDNA-Ebene) verwendet.

Durchführung der quantitativen Echtzeit-PCR

- 1) Ansetzen einer Verdünnungsreihe für die Generierung einer Standardkurve. Für quantitative Echtzeit-PCR-Experimente mit genomischer DNA wurde eine Verdünnungsreihe aus einer Standard-DNA (Human Genomic DNA, siehe Tab. 4) erstellt (50 ng/μl; 25 ng/μl; 12,5 ng/μl; 6,25 ng/μl; 3,125 ng/μl). Für die Expressionsanalyse wurde hierfür cDNA aller verwendeten Proben gepoolt und in fünf Schritten je 1:2 verdünnt.
- 2) Ansetzen des Reaktionsgemisches wie in Tab. 24 beschrieben. Hierfür wurde der Maxima SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (2) (siehe Tab. 5) verwendet, welcher eine Maxima Hot-start *Taq*-DNA-Polymerase, dNTPs, einen Reaktionspuffer und SYBR-Green I beinhaltet.

- 3) Durchführung der quantitativen Echtzeit-PCR für die jeweilige Standardverdünnungsreihe, die DNA- bzw. cDNA-Proben und eine Negativkontrolle jeweils in Doppelbestimmung. Alle Experimente wurden in dem LightCycler 480 (siehe Tab. 8) nach dem in Tab. 25 beschriebenen LightCycler-Programm durchgeführt. Die Fluoreszenzmessungen fanden hierbei nach jedem Elongationsschritt statt.
- 4) Absolute Quantifizierung der eingesetzten Ausgangsmengen für die PCR mit der zugehörigen LightCycler 480 Software (siehe Tab. 9).
- 5) Durchführung einer Schmelzkurvenanalyse. Hierbei wurden die PCR-Produkte unter kontinuierlicher Temperaturerhöhung (0,1 °C/s) und Fluoreszenzmessung denaturiert. Abhängig von der Länge und dem GC-Gehalt des PCR-Produkts kam es bei einer spezifischen Schmelztemperatur zu einer Abnahme der gemessenen Fluoreszenz, sodass anhand der Schmelzkurve die Spezifität der PCR beurteilt werden konnte.

Tab. 24 Reaktionsansatz für die quantitative Echtzeit-PCR

Substanz	Konzentration	Konzentration im Ansatz	Volumen [µl]
HPLC-H ₂ O	-	-	2,4
F-Primer	10 µM	0,3 µM	0,3
R-Primer	10 µM	0,3 µM	0,3
SYBR-Green Master-Mix	2-fach	1-fach	5,0
DNA / cDNA*	10 ng/µl (DNA)	2 ng/µl (DNA)	2,0
Gesamtansatz			10,0

*Es wurden 1:4-Verdünnungen des cDNA-Syntheseprodukts (siehe Abschnitt 2.3.1.2) verwendet, wobei die exakten Konzentrationen nicht bekannt waren.

cDNA – komplementäre DNA; F-Primer – Vorwärts-Primer; HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*; PCR – Polymerase-Kettenreaktion; R-Primer – Rückwärts-Primer.

Tab. 25 LightCycler-Programm für die quantitative Echtzeit-PCR

	Temperatur [°C]	Dauer	Funktion
	95 °C	10 min	Initiale Denaturierung (bei Hot Start-Enzym)
38 Zyklen	95 °C	15 sec	Denaturierung
	X* °C	30 sec	Annealing
	72 °C	30 sec	Elongation
	65 °C → 97 °C	10 min	Schmelzkurve

*Die Annealing-Temperatur (hier als X gekennzeichnet) unterscheidet sich je nach Primer-Paar. Die genauen Annealing-Temperaturen der verwendeten Primer sind Tab. 34 (siehe Anhang 7.4) zu entnehmen.

Die quantitative Echtzeit-PCR wurde unter anderem eingesetzt, um homozygote Träger/-innen des Wildtyp-Repeat-Allels (*RFCI*, Intron 2) von heterozygoten zu unterscheiden. Hierfür wurden die Konzentrationen des Repeat-überspannenden Intronabschnitts und eines Referenzgens (hier *YWHAZ*) gemessen und zueinander ins Verhältnis gesetzt. Bei einem

Quotienten von 0,4 bis 0,7 wurde das Individuum als heterozygote/-r Träger/-in des Wildtyp-Allels (das andere Allel war aufgrund einer Expansion bei der hier verwendeten Elongationszeit von 30s nicht amplifizierbar) und bei einem Quotienten von 0,8 bis 1,2 als homozygote/-r Träger/-in des Wildtyp-Allels gewertet. Die statistische Auswertung der zur Expressionsanalyse des *RFC1*- und *WDR19*-Gens durchgeführten qPCR-Experimente ist Abschnitt 2.3.9 zu entnehmen.

2.3.8 Southern-Blot

Um qualitativ nachzuweisen, dass biallelische große Expansionen im *RFC1*-Gen vorliegen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Protokoll für genomische *Southern*-Blots etabliert. Bei dieser Methode werden enzymatisch verdaute, genomische DNA-Fragmente mittels Agarosegelelektrophorese der Länge nach aufgetrennt, auf eine Membran transferiert (Blot) und unter Verwendung einer markierten Oligonukleotidsonde visualisiert (Southern, 1975).

A) Herstellung einer Oligonukleotidsonde

Für die Detektion geblotteter DNA-Fragmente wurde eine markierte Oligonukleotidsonde benötigt. Die Synthese der Sonde erfolgte mittels konventioneller PCR (siehe Abschnitt 2.3.2). Um das Risiko einer unspezifischen Detektion von DNA-Fragmenten zu minimieren, wurde die Sequenz des PCR-Produkts bzw. der Oligonukleotidsonde mittels des online Sequenz-Alignment-Tools BLAST (Referenzgenom: GRCh37/hg19, siehe Tab. 9) auf Einzigartigkeit überprüft. Hieraus resultierte ein 184 bp langes Sondenoligonukleotid, dessen Binderegion sich -521 bp *upstream* des zu untersuchenden *Repeats* im *RFC1*-Gen befand (siehe Abb. 4).

In dieser Arbeit erfolgte die Markierung (*Labeling*) der Sonde mit Digoxigenin (DIG), sodass eine anschließende Detektion mittels eines enzymgekoppelten Anti-DIG-Antikörpers ermöglicht war. Hierfür wurde das mittels PCR synthetisierte Sondenoligonukleotid durch Gelelution (siehe Abschnitt 2.3.3.1) aufgereinigt und eine 1:100 Verdünnung des Eluats für die *Labeling*-PCR eingesetzt. Unter Verwendung des PCR DIG Probe Synthesis Kits (siehe Tab. 5) erfolgte anschließend die DIG-Markierung mittels einer PCR, bei der das markierte DIG-11-dUTP in das PCR-Produkt eingebaut wurde. Die *Labeling*-Reaktion der Oligonukleotidsonde erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll.

B) Markierung des Längenstandards.

Um die Länge der detektierten DNA-Fragmente abschätzen zu können, wurde ein markierter Längenstandard benötigt. Hierfür wurde eine DNA-Leiter mit passendem Größenbereich mittels des DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Kit, 2nd Generation (siehe Tab. 5) am 3'-Ende der Fragmente mit DIG markiert. Die *Labeling*-Reaktion des Längenstandards wurde gemäß dem Herstellerprotokoll durchgeführt.

C) Restriktionsverdau genomischer DNA

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, welche bestimmte Sequenzmotive erkennen und die Phosphodiesterbindungen beider DNA-Stränge an spezifischen Stellen spalten. Um bei den getesteten Individuen massive biallelische *Repeat*-Expansionen zu detektieren, wurden DNA-Proben mittels Restriktionsenzymen verdaut, sodass je nach verwendetem Enzym Restriktionsfragmente einer bestimmten zu erwartenden Länge generiert wurden (siehe Abb. 4). Auf diese Weise konnten bei Vorliegen von *Repeat*-Expansionen in dem anschließenden *Southern*-Blot Restriktionsfragmente detektiert werden, die länger waren als es bei Vorliegen eines Referenzallels zu erwarten wäre.

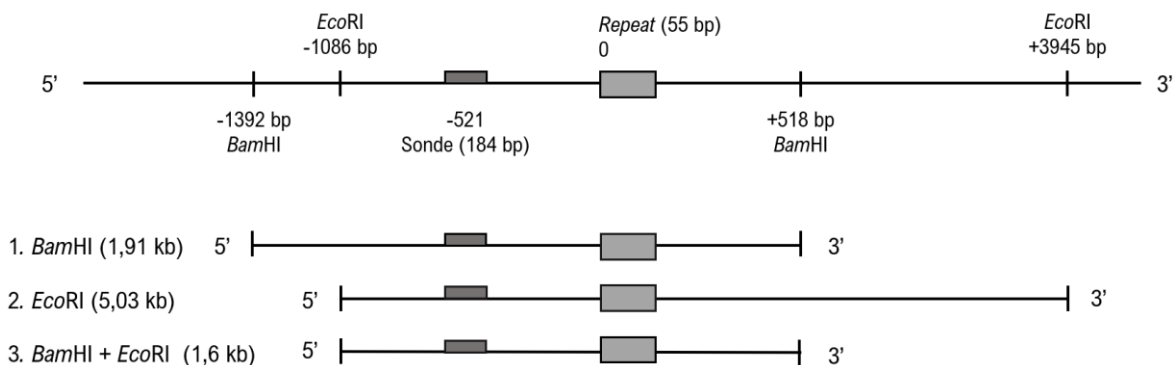


Abb. 4 Schnittstellen der Restriktionsenzyme und resultierende Fragmente.

In der genomischen Umgebung des *Repeats* (hellgrauer Kasten) im *RFX1*-Gen (Intron 2) befinden sich Erkennungssequenzen für die Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Eco*RI. Die Schnittstellen der Enzyme sind in der Abbildung schematisch durch kurze vertikale Striche dargestellt. Aus dem Verdau mit *Bam*HI (1.), *Eco*RI (2.) sowie einer Kombination beider Enzyme (3.) resultieren drei unterschiedlich lange Restriktionsfragmente, welche mittels einer markierten Oligonukleotidsonde (dunkelgrauer Kasten) detektiert werden können. Bei einer Expansion der *Repeat*-Sequenz kommt es zu einer entsprechenden Verlängerung der resultierenden Restriktionsfragmente. bp – Basenpaar; kb – Kilobasenpaar. (Quelle: Eigene Darstellung)

Zur Auswahl passender Restriktionsenzyme wurde mit Hilfe des online UCSC Genome Browsers (Referenzgenom: GRCh37/hg19, siehe Tab. 9) die das zu untersuchende *Repeat* flankierende (± 5000 bp) DNA-Sequenz ermittelt und anhand der Gene Runner v5.1-Software (siehe Tab. 9) nach Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen abgesucht. In

dem das *Repeat* umgebenden Bereich wurden die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Eco*RI identifiziert, sodass diese Enzyme für den Versuch ausgewählt wurden. Jede Probe wurde in drei verschiedenen Ansätzen jeweils mit 1. *Bam*HI, 2. *Eco*RI und 3. *Bam*HI und *Eco*RI verdaut. Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme und die jeweils resultierenden DNA-Fragmente können Abb. 4 entnommen werden.

Für den Restriktionsverdau wurden jeweils 7 µg der zu analysierenden DNA und 20 U des Restriktionsenzyms eingesetzt und mit dem CutSmart® Buffer (siehe Tab. 4) auf ein Gesamtvolumen 50 µl aufgefüllt. Die Reaktionsansätze wurden anschließend in einem Wasserbad bei 37°C über Nacht inkubiert. Für *Eco*RI enthaltende Ansätze erfolgte eine Hitzeinaktivierung in einem Thermocycler bei 65°C für 20 min. Da das resultierende Volumen des Reaktionsgemisches (50 µl) das Volumen der Geltaschen des Agarose-Gels (~30 µl) überschreitet, erfolgte nach dem Verdau eine Verringerung des Reaktionsvolumens (auf ~20 µl) mittels Verdunstung. Hierfür wurden die Reaktionsansätze in einem Thermocycler mit offenem Deckel der Reaktionsgefäße bei 60°C für ~2 h inkubiert.

D) Agarosegelelektrophorese und Vorbereitung für den *Southern*-Blot

Die Restriktionsfragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese der Länge nach aufgetrennt. Die Durchführung entsprach hierbei weitestgehend dem in Abschnitt 2.3.3 beschriebenen Protokoll. Da die erwartete Länge der zu untersuchenden DNA-Fragmente bis zu 10 kb (Cortese *et al.*, 2019) betrug, wurde ein Gel mit einer niedrigen Agarosekonzentration verwendet [0,8% (w/v)-Agarose]. Die Dicke des Gels betrug maximal 7 mm, um einen suffizienten Transfer langer Restriktionsfragmente zu gewährleisten. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 40 V für 8 Stunden.

Um den Transfer langer DNA-Fragmente (> 5 kb) zu verbessern, wurde das Agarosegel im Anschluss an die Elektrophorese in einem Depurinierungspuffer (siehe Tab. 7) inkubiert, wobei es durch die enthaltene Salzsäure zu DNA-Strangbrüchen kommt. Die elektrophoretisch aufgetrennten Restriktionsfragmente liegen somit in den jeweiligen Banden in kleineren Fragmenten vor, welche besser auf eine Membran übertragen werden können.

Für die Hybridisierung mit einer Oligonukleotid-Sonde müssen geblottete DNA-Fragmente in Form von einzelsträngiger DNA vorliegen. Aus diesem Grund erfolgte eine Denaturierung der Restriktionsfragmente mittels Inkubation des Agarosegels in einer alkalischen Lösung (Denaturierungspuffer, siehe Tab. 7).

Vorbereitung des Agarosegels für den *Southern-Blot*:

- 1) Inkubation des Gels in Depurinierungspuffer (10-15 min)
- 2) Abgießen des Puffers und Waschen des Gels (2x mit deionisiertem H₂O für 1 min)
- 3) Inkubation des Gels in Denaturierungspuffer auf einem Schüttler (2x 20 min)
- 4) Abgießen des Puffer und Waschen des Gels (3x mit deionisiertem H₂O für 1 min)
- 5) Inkubation des Gels in Neutralisierungspuffer (Tab. 7) auf einem Schüttler (2x 20 min)

E) *Southern-Blot*

Der Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Restriktionsfragmente aus dem Agarosegel auf eine Nylon-Membran erfolgte mittels kapillarer Kräfte (Kapillar-Blot). Hierbei diffundiert ein Transferpuffer (siehe Tab. 7) durch das Agarosegel und die aufliegende Membran zu einem Stapel trockener, saugfähiger Papiertücher (siehe Abb. 5). Die negativ geladenen DNA-Einzelstränge im Gel wandern mit dem Transferpuffer und werden an die positiv geladene Nylon-Membran adsorbiert. Durch eine anschließende UV-Bestrahlung erfolgt die kovalente Bindung der DNA-Stränge an die Membran.

Durchführung:

- 1) Equilibrieren des Gels in dem Transferpuffer (10x SSC-Puffer) für 10 min
- 2) Aufbau des *Southern-Blots* wie in Abb. 5 dargestellt. Luftblasen müssen hierbei vermieden werden, da diese den Flüssigkeitsstrom und damit den Transfer unterbrechen.
- 3) Transfer bei Raumtemperatur über Nacht (~ 12 h)
- 4) Abbau des Blots und UV-Bestrahlung der Membran von beiden Seiten für 5 min

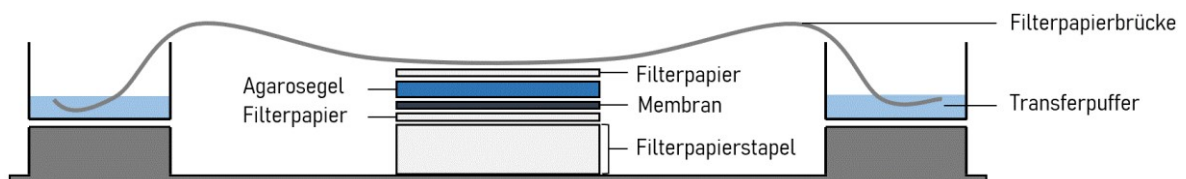


Abb. 5 Schematische Darstellung des verwendeten Aufbaus für den *Southern-Blot*.

Der Transferpuffer (hier hellblau) diffundiert über die Filterpapierbrücke durch das Agarosegel (hier dunkelblau) und die darunter aufliegende Membran (hier dunkelgrau) zu einem Stapel trockener Filterpapiertücher. Auf diese Weise werden, die sich in dem Agarosegel befindenden negativ geladenen Restriktionsfragmente mittels kapillarer Kräfte auf die positiv geladene Nylon-Membran transferiert bzw. gebloftet. (Quelle: Eigene Darstellung)

F) Hybridisierung

Im Anschluss an den Blot erfolgte die Hybridisierung der Membran mit der Oligonukleotidsonde (siehe Abschnitt 2.3.8 A).

Durchführung:

- 1) Transfer der Membran in eine Glasröhre (*Hybridization-Tube*) und Zugabe von 50 ml Prähybridisierungspuffer (siehe Tab. 7)
- 2) Inkubation bei 42°C für 3 h in einem Hybridisierungsofen (siehe Tab. 8) unter konstanter Rotation der Glasröhre
- 3) Abgießen des Prähybridisierungspuffers und Zugabe von 50 ml Hybridisierungspuffer (siehe Tab. 7), welcher 5 µl der DIG-markierten Oligonukleotidsonde enthielt
- 4) Inkubation bei 42°C über Nacht (~12 h) in einem Hybridisierungsofen unter konstanter Rotation der Glasröhre

G) Detektion

Der Nachweis der DIG-markierten Oligonukleotidsonde erfolgte durch einen Anti-DIG-Antikörper (siehe Tab. 4). Dieser ist mit einer Alkalischen Phosphatase (AP) konjugiert, welche das chemilumineszente Substrat CDP-*Star*® (siehe Tab. 4) umsetzt. Mittels eines Röntgenfilms kann somit die Position des Dimers aus Restriktionsfragment und Oligonukleotidsonde auf der Membran detektiert werden.

Durchführung:

- 1) Waschen der Membran in 2x-SSC-Waschpuffer (2 x 10 min, siehe Tab. 7)
- 2) Waschen der Membran in 0,5x-SSC-Waschpuffer (siehe Tab. 7) bei 65°C in einem Hybridisierungsofen (2x 20 min)
- 3) Inkubation der Membran in einer 2%-igen Blocking-Lösung (45 min, siehe Tab. 7)
- 4) Hybridisierung mit Anti-DIG-Antikörper (1:20.000 Verhältnis) in 2%-iger Blocking-Lösung (30 min)
- 5) Waschen der Membran in einem Tween20 enthaltenden Waschpuffer (2x 20 min, siehe Tab. 7)
- 6) Inkubation der Membran in Detektionslösung (5 min, siehe Tab. 7)
- 7) Zugabe eines chemilumineszenten Substrat (CDP-*Star*®) auf die Membran und Inkubation für 5 min
- 8) Detektion des Signals mittels eines Röntgenfilms

2.3.9 Statistische Auswertung

Um zu testen, ob auf einem Signifikanzniveau von 5% eine Korrelation zwischen den mittels Fragmentlängenanalyse bestimmten *RFC1*-Genotypen bzw. Allel-Frequenzen und der Gruppenzugehörigkeit bestand (siehe Abschnitt 3.1.3.2) wurde ein Chi-Quadrat-Unabhängigkeitstest angewandt.

Für die Expressionsanalyse des *RFC1*- und *WDR19*-Gens wurden in cDNA-Proben von Individuen mit einem CANVAS ($n = 4$) und Kontrollen ($n = 5$) die Konzentrationen der jeweiligen mRNA-Transkripte mittels quantitativer Echtzeit-PCR in Doppelbestimmung erhoben. Diese wurden mit den gemessenen Transkriptkonzentrationen von drei konstitutiv exprimierten Referenzgenen (*β -Actin*, *HGPRT*, *YWHAZ*) ins Verhältnis gesetzt. Die auf diese Weise normierten Transkriptkonzentrationen wurden jeweils für die Patienten- und Kontrollgruppe gemittelt. Anschließend wurde anhand eines zweiseitigen t-Tests für unabhängige Stichproben getestet, ob ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen den Gruppen vorliegt. Da hierbei für jede Gruppe drei auf die Expression der Referenzgene normierte Mittelwerte der *RFC1* bzw. *WDR19*-Transkriptkonzentrationen getestet wurden, besteht das Problem der α -Fehlerkumulation. Aus diesem Grund wurde die Bonferroni-Korrektur für multiples Testen angewendet und das daraus resultierende Signifikanzniveau von $\alpha = 0,0167$ festgelegt.

3 Ergebnisse

In dem folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der bei den eingeschlossenen Individuen durchgeführten genetischen Analysen dargelegt. Neben der Genotypisierung der Ataxiepatientinnen und -patienten sowie der Kontrollen in Bezug auf das *RFC1-Repeat* (siehe Abschnitt 3.1), erfolgte weiterhin eine Haplotypisierung der Träger/-innen massiver biallelischer *RFC1-Repeat*-Expansionen zur Identifikation eines möglichen *Founder*-Haplotypen (siehe Abschnitt 3.2). Des Weiteren wurde untersucht, ob eine stabile intergenerationale *Repeat*-Transmission zu beobachten ist (siehe Abschnitt 3.3) sowie welche funktionellen Folgen aus einer massiven biallelischen *Repeat*-Expansion im *RFC1*-Gen resultieren (siehe Abschnitt 3.4).

3.1 Genotypisierung

Zur Genotypisierung der Patientinnen und Patienten sowie der Kontrollen in Hinblick auf das *RFC1-Repeat* erfolgte zunächst die Identifizierung von Individuen mit massiven biallelischen Expansionen mittels Duplex-PCR (siehe Abschnitt 3.1.1). Zur Analyse der *Repeat*-Sequenz kam folgend eine *Repeat-Primed*-PCR sowie die Sanger-Sequenzierung zur Anwendung (siehe Abschnitt 3.1.2). Zur Bestimmung der *Repeat*-Länge erfolgte die Etablierung eines *Southern*-Blots sowie die Durchführung einer Fragmentlängenanalyse (siehe Abschnitt 3.1.3).

3.1.1 Identifizierung von Individuen mit massiven biallelischen *Repeat*-Expansionen im *RFC1*-Gen mittels Duplex-PCR

Um in den eingeschlossenen Patientengruppen Träger/-innen massiver biallelischer *Repeat*-Expansionen im *RFC1*-Gen zu identifizieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Duplex-PCR-Assay (siehe Abschnitt 2.3.2.2. B) etabliert. Insgesamt wurden 116 Individuen mittels Duplex-PCR getestet. Darunter befanden sich 17 Individuen mit einer vollständigen Manifestation des CANVAS, 9 Individuen mit einem unvollständigen CANVAS, 70 Individuen mit einer ILOCA sowie 20 Kontrollen (siehe Abb. 2).

Ergebnisse

In der Agarosegelelektrophorese der Duplex-PCR-Produkte konnten verschiedene PCR-Bandenmuster beobachtet werden, welche in Abb. 6 repräsentativ dargestellt sind. Bei insgesamt 38 der 116 getesteten Individuen (32,8%) wurden zwei PCR-Banden beobachtet – eine *RFC1*-Referenzbande (bei 457 bp), die einem *Repeat*-überspannenden PCR-Produkt (*RFC1*, Intron 2) mit einer *Repeat*-Länge des *RFC1*-(AAAAG)₁₁-Referenzallels entspricht sowie eine als Positivkontrolle dienende Bande (bei 308 bp), welche dem Amplifikat eines unabhängigen genetischen Bereiches (hier *PRKN*, Exon 2) entspricht (siehe Tab. 26).

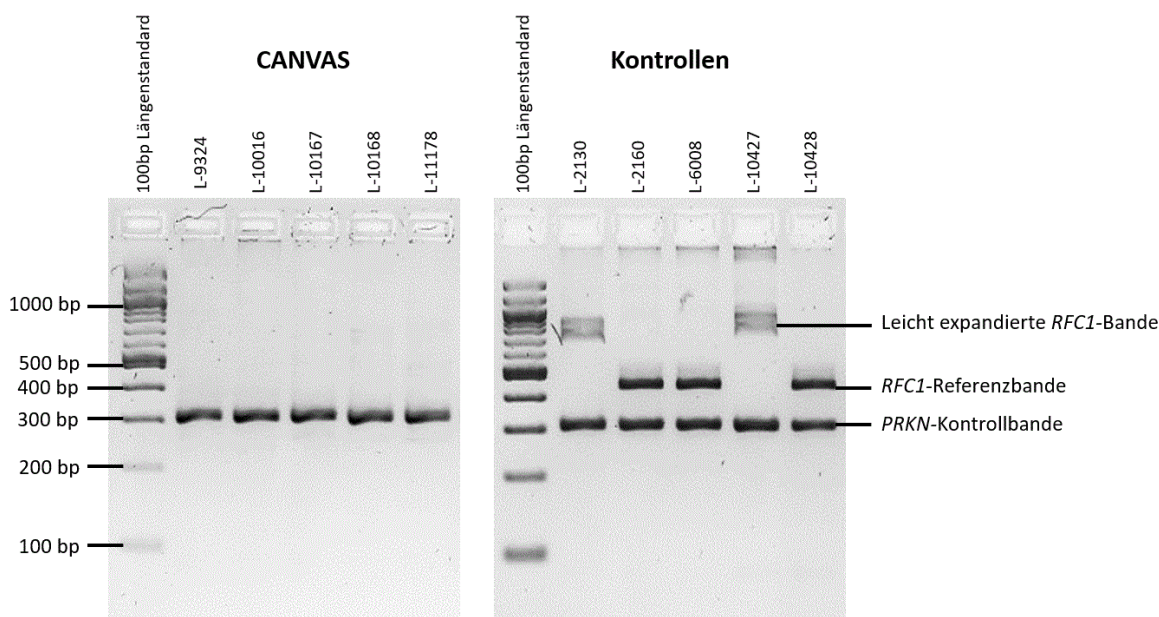


Abb. 6 Repräsentative Bilder der Agarosegelelektrophorese von Duplex-PCR-Produkten.

Dargestellt sind exemplarische Resultate der Agarosegelelektrophorese von Duplex-PCR-Produkten von 5 Individuen mit einem CANVAS (links) sowie 5 Kontrollen (rechts). Die aufgetrennten PCR-Produkte sowie ein 100-bp-Längenstandard sind als Banden zu erkennen. Lag in einer getesteten Probe keine *Repeat*-Expansion im *RFC1*-Gen vor, konnten bei der Agarosegelelektrophorese der Duplex-PCR-Produkte zwei Banden beobachtet werden – eine *RFC1*-Referenzbande bei 457 bp, die einem *Repeat*-überspannendem PCR-Produkt (*RFC1*, Intron 2) mit einer *Repeat*-Länge des *RFC1*-(AAAAG)₁₁-Referenzallels entspricht sowie eine als Positivkontrolle dienende *PRKN*-Kontrollbande (*PRKN*, Exon 2) bei 308 bp. Lagen massive biallelische *Repeat*-Expansionen vor, konnten diese bei den gegebenen PCR-Bedingungen nicht amplifiziert werden, sodass nur die *PRKN*-Kontrollbande zu beobachten war. Des Weiteren wurden bei einigen getesteten Individuen Duplex-PCR-Produkte beobachtet, die länger waren als es bei der *Repeat*-Länge des Referenzallels zu erwarten wäre. Mittels Sanger-Sequenzierung dieser PCR-Produkte konnte nachgewiesen werden, dass es sich hierbei um leichte Expansionen des *RFC1*-(AAAAG)₁₁-Referenzallels handelte. bp – Basenpaar; CANVAS – *Cerebellar Ataxia with Neuropathy and bilateral Vestibular Areflexia Syndrome*; L-Nummer – Laborinterne Identifikationsnummer; PCR – Polymerase-Kettenreaktion; *PRKN* – *Parkin*; *RFC1* – *Replication Factor C Subunit 1*. (Quelle: Eigene Darstellung nach Gisatulin *et al.*, 2020)

Bei 57 von 116 Individuen (49,2%) konnten in der Agarosegelelektrophorese der Duplex-PCR-Produkte Banden beobachtet werden, die länger waren (bis zu ~ 1200 bp) als es bei Vorliegen des *RFC1*-(AAAAG)₁₁-Referenzallels zu erwarten wäre (siehe Tab. 26). Mittels Gelelektrophorese der entsprechenden Banden und anschließender Sanger-Sequenzierung konnte

nachgewiesen werden, dass es sich hierbei um leichte Expansionen des untersuchten *RFC1*-(*AAAAG*)₁₁-Referenzallels und nicht um unspezifische PCR-Amplifikate handelte. Diese PCR-Banden wurden entweder in Kombination mit der *RFC1*-Referenzbande und der *PRKN*-Kontrollbande (*n* = 27 bzw. 23,3%) oder nur in Kombination mit der *PRKN*-Kontrollbande (*n* = 30 bzw. 25,9%) beobachtet (siehe Tab. 26). Der Locus (chr4:39350045-39350103, GRCh37/hg19) des untersuchten *Repeats* im *RFC1*-Gen scheint somit eine hohe Variabilität der *Repeat*-Länge aufzuweisen.

Bei insgesamt 21 von 116 Individuen (18,1%) konnte in der Agarosegelelektrophorese der Duplex-PCR-Produkte nur eine *PRKN*-Kontrollbande (bei 308 bp) nachgewiesen werden. Da die massiven biallelischen *Repeat*-Expansionen bei den gegebenen Duplex-PCR-Bedingungen aufgrund ihrer Länge von bis zu ~ 10 kb nicht amplifiziert worden sein sollten (Cortese *et al.*, 2019; Rafehi *et al.*, 2019), wurde in diesen Fällen auf das Vorliegen von massiven *Repeat*-Expansionen geschlossen. Unter den mittels Duplex-PCR identifizierten Individuen mit massiven biallelischen *Repeat*-Expansionen befanden sich 15 von 17 Individuen mit einem vollständigen CANVAS (88,2%), 2 von 9 Individuen mit einem unvollständigen CANVAS (22,2%) sowie 4 von 70 Individuen mit einer ILOCA (5,7%). Bei keiner der Kontrollen konnten massive biallelische *RFC1-Repeat*-Expansionen nachgewiesen werden.

Tab. 26 Zusammenfassung der Duplex-PCR-Ergebnisse aller getesteten Individuen

Duplex-PCR-Banden	Vollst. CANVAS (<i>n</i> = 17)	Unvollst. CANVAS (<i>n</i> = 9)	ILOCA (<i>n</i> = 70)	Kontrollen (<i>n</i> = 20)	Insgesamt (<i>n</i> = 116)
Nur <i>PRKN</i> -Kontrollbande	15 (88,2%)	2 (22,2%)	4 (5,7%)	0 (0,0%)	21 (18,1%)
<i>PRKN</i> -Kontrollbande + <i>RFC1</i> -Referenzbande	1 (5,9%)	3 (33,3%)	22 (31,4%)	12 (60,0%)	38 (32,8%)
<i>PRKN</i> -Kontrollbande + <i>RFC1</i> -Referenzbande + Leicht exp. <i>RFC1</i> -Bande	0 (0,0%)	1 (11,1%)	23 (32,9%)	3 (15,0%)	27 (23,3%)
<i>PRKN</i> -Kontrollbande + Leicht exp. <i>RFC1</i> -Bande	1 (5,9%)	3 (33,3%)	21 (30,0%)	5 (25,0%)	30 (25,9%)

CANVAS – *Cerebellar Ataxia with Neuropathy and bilateral Vestibular Areflexia Syndrome*; exp. – expandiert; ILOCA – *Idiopathic Late Onset Cerebellar Ataxia*; PCR – Polymerase-Kettenreaktion; *PRKN* – *Parkin*; *RFC1* – *Replication Factor C Subunit 1*; Unvollst. – Unvollständig; Vollst. – Vollständig.

3.1.2 Charakterisierung der *Repeat*-Sequenz mittels *Repeat-Primed* PCR und Sanger-Sequenzierung

Um das Vorliegen massiver biallelischer *Repeat*-Expansionen (*RFC1*, Intron 2) bei den identifizierten Mutationsträgerinnen und Mutationsträgern (siehe Abschnitt 3.1.1) zu bestätigen und um überdies Informationen über die Sequenz der expandierten *Repeats* zu erlangen, wurde im Rahmen dieser Arbeit sowohl eine *Repeat-Primed*-PCR (RP-PCR) als auch eine Sanger-Sequenzierung der expandierten Allele etabliert.

3.1.2.1 Ergebnisse der *Repeat-Primed*-PCR (RP-PCR)

Alle mittels Duplex-PCR identifizierten Träger/-innen massiver biallelischer Expansionen im *RFC1*-Gen (n = 21, siehe Abschnitt 3.1.1) wurden mittels *Repeat-Primed* (RP)-PCR getestet (siehe Abschnitt 2.3.2.2 C). Von den übrigen Individuen, bei denen in der Duplex-PCR-Analyse keine massiven biallelischen *Repeat*-Expansionen nachgewiesen werden konnten (n = 95), wurden nur die Gruppen „Vollständiges CANVAS“ (n = 2), „Unvollständiges CANVAS“ (n = 7) und „Kontrollen“ (n = 20) getestet, da für Individuen aus der Gruppe „ILOCA“ nicht genügend genetisches Material vorlag (siehe Abb. 2).

In Publikationen zum genetischen Hintergrund des CANVAS (Cortese *et al.*, 2019; Rafehi *et al.*, 2019) wurde berichtet, dass das massiv expandierte *Repeat* im *RFC1*-Gen eine von dem (AAAAG)₁₁-Referenzallel abweichende Sequenz (AAGGG oder AAAGG) aufweist. Jede Probe wurde daher in drei verschiedenen RP-PCR-Ansätzen mit jeweils unterschiedlichen *Repeat* (RP)-*Primern* getestet, wobei jeder dieser *Primer* jeweils an eine der genannten *Repeat*-Sequenzen bindet (Ansatz 1: (AAAAG)-RP-*Primer*; Ansatz 2: (AAAGG)-RP-*Primer*; Ansatz 3: (AAGGG)-RP-*Primer*).

Bei allen erfolgreich getesteten Individuen mit massiven biallelischen *Repeat*-Expansionen (n = 20) zeigte sich unter Verwendung des (AAGGG)-RP-*Primers* in der kapillarelektrophoretischen Analyse der RP-PCR-Produkte das für eine *Repeat*-Expansion typische „Sägezahn“-Muster in den resultierenden Elektropherogrammen (siehe Abb. 7 A). Bei einem Individuum dieser Gruppe konnte zusätzlich ein expansionstypisches Muster bei Einsatz des (AAAGG)-RP-*Primers* beobachtet werden (siehe Abb. 7 B). Die Verwendung des (AAAAG)-RP-*Primers* generierte bei keinem Individuum dieser Gruppe ein RP-PCR-

Produkt. Bei einem Individuen mit einer massiven biallelischen Expansion konnte bei keinem der drei Ansätze ein RP-PCR-Produkt in dem resultierenden Elektropherogramm beobachtet werden. Bei diesem Individuum wurde die *Repeat*-Sequenz mittels Sanger-Sequenzierung weiterhin untersucht (siehe Abschnitt 3.1.2.2).

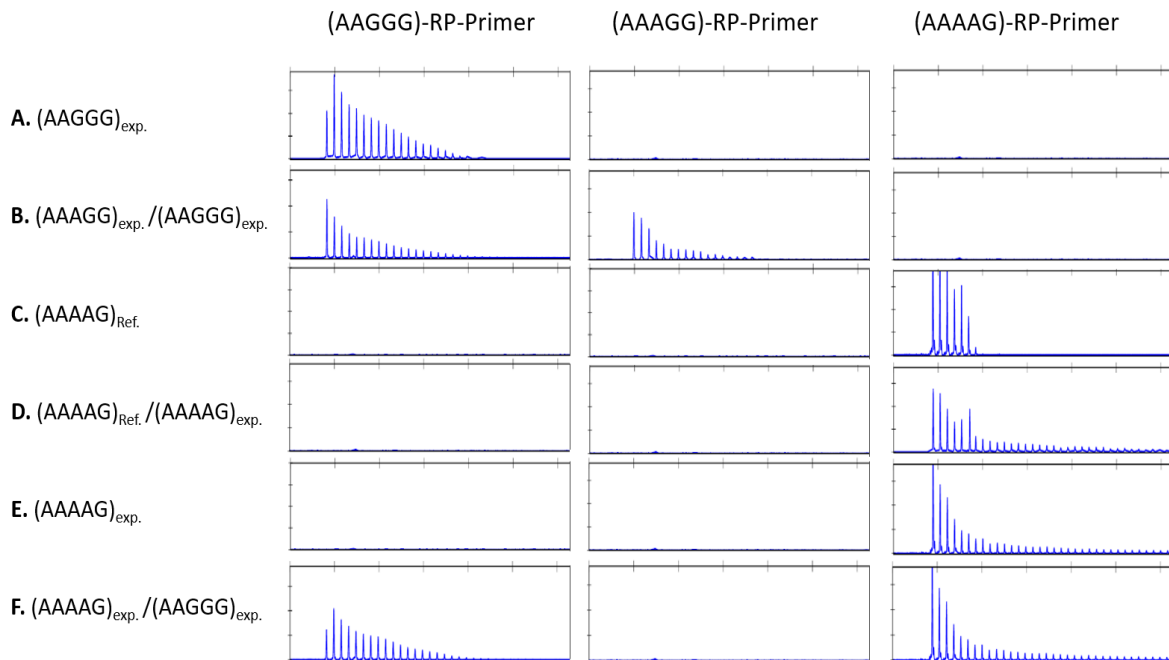


Abb. 7 Repräsentative Elektropherogramme kapillarelektrophoretisch aufgetrennter *Repeat-Primed* (RP)-PCR-Produkte.

Dargestellt sind exemplarische Elektropherogramme der *Repeat-Primed* (RP)-PCR mit dem (AAGGG)-*Repeat*- bzw. RP-Primer (links), dem (AAAGG)-RP-Primer (Mitte) sowie dem (AAAAG)-RP-Primer (rechts). Die *Peaks* entsprechen den der Länge nach aufgetrennten, fluoreszenzmarkierten RP-PCR-Produkten. Liegt eine *Repeat*-Expansion vor, resultieren aufgrund der zufälligen Anlagerung des RP-Primers an die *Repeat*-Sequenz viele unterschiedlich lange PCR-Produkte, die in dem resultierenden Elektropherogramm ein typisches „Sägezahn“-Muster entstehen lassen. Es wurden insgesamt sechs unterschiedliche Elektropherogrammmuster beobachtet: ein einer (AAGGG)-Expansion entsprechendes Muster (hier **A.**); ein *Peak*-Muster, bei dem sowohl ein expandiertes (AAGGG)- als auch ein expandiertes (AAAGG)-*Repeat* vorlag (hier **B.**); ein dem *RFC1*-(AAAAG)₁₁-Referenzallel entsprechendes Muster (hier **C.**); ein Muster, bei dem sowohl ein dem Referenzallel entsprechendes als auch ein einer (AAAAG)-Expansion entsprechendes *Peak*-Muster zu sehen war (hier **D.**); ein einer (AAAAG)-Expansion entsprechendes Muster (hier **E.**); sowie ein Muster bei dem sowohl ein expandiertes (AAGGG)- als auch ein expandiertes (AAAAG)-*Repeat* vorlag (hier **F.**). exp. – expandiert; PCR – Polymerase-Kettenreaktion; RP-Primer – *Repeat-Primer*; Ref. – *RFC1*-(AAAAG)₁₁-Referenzallel. (Quelle: Eigene Darstellung)

Somit konnte bei 20 von 21 mittels Duplex-PCR identifizierten Individuen mit massiven biallelischen *Repeat*-Expansionen im *RFC1*-Gen das Vorliegen expandierter (AAGGG)_n-Allele mittels RP-PCR nachgewiesen werden. Ein Individuum wies zusätzlich ein expandiertes (AAAGG)_n-*Repeat* auf. Die Ergebnisse der RP-PCR für diese Gruppe sind in Tab. 27 zusammengefasst.

Ergebnisse

Tab. 27 Ergebnisse der Repeat-Primed-PCR bei Patientinnen und Patienten mit massiven biallelischen Repeat-Expansionen im *RFC1*-Gen

Beobachtete <i>Peak</i> -Muster in den resultierenden Elektropherogrammen	Vollst. CANVAS (n = 15)	Unvollst. CANVAS (n = 2)	ILOCA (n = 4)	Insgesamt (n = 21)
n.a.	1	0	0	1
(AAAAG) _{Ref.}	0	0	0	0
(AAAAG) _{Ref.} / (AAAAG) _{exp.}	0	0	0	0
(AAAAG) _{exp.}	0	0	0	0
(AAAAG) _{exp.} / (AAGGG) _{exp.}	0	0	0	0
(AAGGG) _{exp.}	14 (100,0%)	1 (50,0%)	4 (100,0%)	19 (95,0%)
(AAGGG) _{exp.} / (AAAGG) _{exp.}	0	1 (50,0%)	0	1 (5,0%)

CANVAS – *Cerebellar Ataxia with Neuropathy and bilateral Vestibular Areflexia Syndrome*; exp. – expandiert; ILOCA – *Idiopathic Late Onset Cerebellar Ataxia*; n.a. – *not available* bzw. nicht verfügbar; PCR – Polymerase-Kettenreaktion; Ref. – *RFC1*-(AAAAG)₁₁-Referenzallel; *RFC1* – *Replication Factor C Subunit 1*; Unvollst. – Unvollständig; Vollst. – Vollständig.

Bei allen getesteten Individuen ohne massive biallelische Expansionen (n = 29) konnte unter Verwendung des (AAAAG)-RP-Primers ein RP-PCR-Produkt beobachtet werden. Nur bei einem Individuum, welches Teil der Kontrollgruppe war, konnte zusätzlich bei Einsatz des (AAGGG)-RP-Primers ein expansionstypisches Muster im Elektropherogramm festgestellt werden (siehe Tab. 28).

Tab. 28 Ergebnisse der Repeat-Primed-PCR bei Individuen ohne massive biallelische Repeat-Expansionen im *RFC1*-Gen

Beobachtete <i>Peak</i> -Muster in den resultierenden Elektropherogrammen	Vollst. CANVAS (n = 2)	Unvollst. CANVAS (n = 7)	Kontrollen (n = 20)	Insgesamt (n = 29)
n.a.	0	0	1	1
(AAAAG) _{Ref.}	0	3 (42,9%)	7 (36,8%)	10 (35,7%)
(AAAAG) _{Ref.} / (AAAAG) _{exp.}	1 (50,0%)	1 (14,3%)	6 (31,6%)	8 (28,6%)
(AAAAG) _{exp.}	1 (50,0%)	3 (42,9%)	5 (26,3%)	9 (32,1%)
(AAAAG) _{exp.} / (AAGGG) _{exp.}	0	0	1 (5,3%)	1 (3,6%)
(AAGGG) _{exp.}	0	0	0	0
(AAGGG) _{exp.} / (AAAGG) _{exp.}	0	0	0	0

CANVAS – *Cerebellar Ataxia with Neuropathy and bilateral Vestibular Areflexia Syndrome*; exp. – expandiert; ILOCA – *Idiopathic Late Onset Cerebellar Ataxia*; n.a. – *not available* bzw. nicht verfügbar; PCR – Polymerase-Kettenreaktion; Ref. – *RFC1*-(AAAAG)₁₁-Referenzallel; *RFC1* – *Replication Factor C Subunit 1*; Unvollst. – Unvollständig; Vollst. – Vollständig.

In der kapillarelektrophoretischen Analyse der unter Verwendung des (AAAAG)-RP-Primers generierten RP-PCR-Produkten konnten verschiedene Muster in den resultierenden Elektropherogrammen beobachtet werden. So konnte bei 10 Individuen ohne massive

biallelische *Repeat*-Expansionen (35,7%) ein dem *RFCI*-(AAAAG)₁₁-Referenzallel entsprechendes *Peak*-Muster nachgewiesen werden (siehe Abb. 7 C). Bei 8 Individuen dieser Gruppe (28,6%) wurde sowohl ein dem Referenzallel entsprechendes als auch ein expansionstypisches Muster detektiert (siehe Abb. 7 D). In 9 Fällen (32,1%) wurde allein ein expansionstypisches *Peak*-Muster beobachtet (siehe Abb. 7 E).

Die bereits mittels Duplex-PCR beobachtete Variabilität des untersuchten *RFCI*-Locus in nicht-massiv expandierten Allelen, konnte somit auch in der RP-PCR-Analyse nachgewiesen werden.

3.1.2.2 Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung

Mittels RP-PCR konnten bei den identifizierten Individuen mit massiven biallelischen *Repeat*-Expansionen im *RFCI*-Gen (AAGGG)_n-Allele nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 3.1.2.1). Um das Vorliegen dieser *Repeat*-Sequenz bei diesen Individuen zu validieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein *Long-Range*-PCR-Assay (siehe Abschnitt 2.3.2.2 D) etabliert. Mittels dieses PCR-Assays gelang es die massiv expandierten Allele zu amplifizieren und anschließend Teile der *Repeats* mittels Sanger-Sequenzierung (siehe Abschnitt 2.3.4) zu analysieren. Dabei ist anzumerken, dass die Leselänge bei Sanger-Sequenzierung generell auf ca. 700-800 bp beschränkt ist, sodass ein expandiertes Allel nie vollständig mit dieser Technologie analysiert werden kann (Stranneheim und Lundeborg, 2012). Für die Sequenzanalyse von nicht-massiv expandierten Allelen, konnten die Sequenzier-*Templates* anhand eines Standard-PCR-Protokolls (siehe Abschnitt 2.3.2.2 A) amplifiziert und im Anschluss mittels Sanger-Sequenzierung untersucht werden.

Insgesamt wurden 192 Allele von 96 Ataxiepatientinnen und -patienten sequenziert. Darunter befanden sich 17 Individuen mit einem vollständigen klinischen Bild des CANVAS, 9 Individuen mit einem unvollständigen CANVAS sowie 70 Individuen mit einer ILOCA (siehe Abb. 2).

Bei allen untersuchten Individuen mit massiven biallelischen *Repeat*-Expansionen im *RFCI*-Gen (n = 21) konnte das Vorliegen einer (AAGGG)-Sequenz in dem analysierten *Repeat*-Abschnitt bestätigt werden (siehe Abb. 8). Analog zur RP-PCR, konnte auch mittels Sanger-Sequenzierung bei einem Individuum dieser Gruppe zusätzlich ein expandiertes (AAAGG)-*Repeat* nachgewiesen werden (siehe Tab. 29).

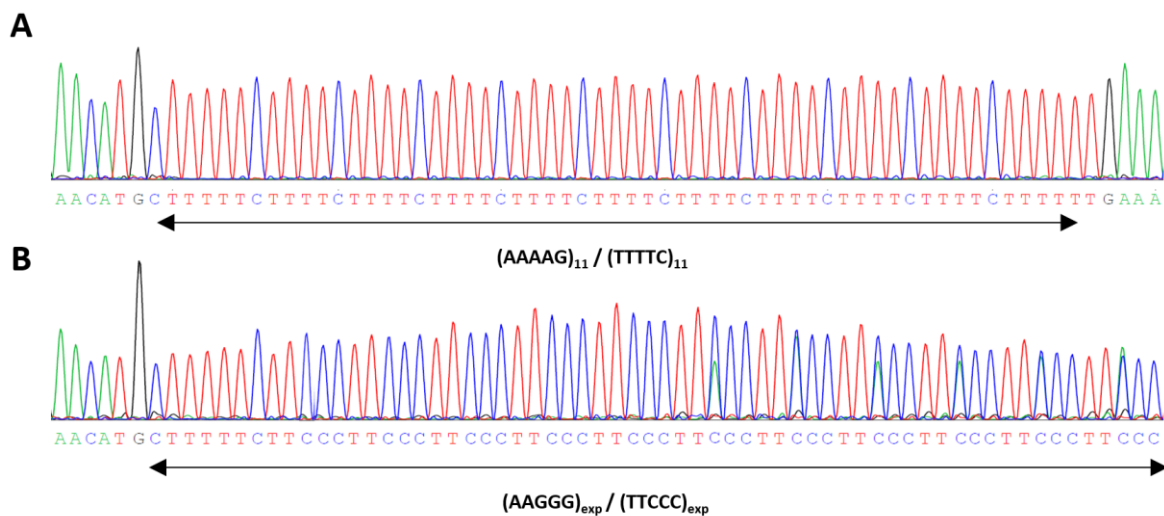


Abb. 8 Repräsentative Elektropherogramme von Sanger-sequenzierten *Long-Range*-PCR-Produkten.

Gezeigt sind beispielhafte Elektropherogramme der Sanger-Sequenzierung eines Individuums mit einer dem *RFC1*-(AAAAG)₁₁-Referenzallel entsprechenden *Repeat*-Sequenz (A) sowie eines Individuums mit einer massiven biallelischen *Repeat*-Expansion der (AAGGG)-Sequenz (B). Gezeigt sind die komplementären Sequenzen, da die Sequenzierung mit dem *Reverse-Primer* bessere Ergebnisse erzielte. exp. – expandiert; PCR – Polymerase-Kettenreaktion; *RFC1* – *Replication Factor C Subunit 1*. (Quelle: Eigene Darstellung nach Gisatulin *et al.*, 2020)

Von den 150 mittels Sanger-Sequenzierung analysierten Allelen ohne massive biallelische *Repeat*-Expansionen im *RFC1*-Gen, wiesen 127 Allele eine (AAAAG)-*Repeat*-Sequenz auf (siehe Tab. 29). Davon konnte bei 66 Allelen (52,0%) eine *Repeat*-Länge von 8 – 12 *Repeats* beobachtet werden. Aufgrund ihrer geringen Abweichung von der Länge des *RFC1*-(AAAAG)₁₁-Referenzallels wurden diese Allele als Wildtyp- bzw. (AAAAG)_{WT}-Allele zusammengefasst. Bei 61 der 127 nicht-massiv expandierten Allele (48,0%) wurde eine *Repeat*-Anzahl von 30 bis 150 *Repeats* detektiert, weswegen diese als leichte *RFC1-Repeat*-Expansionen bzw. (AAAAG)_{exp}-Allele bezeichnet wurden (siehe Tab. 29). Bei 14 dieser Allele wurde die expandierte (AAAAG)-*Repeat*-Sequenz durch *Repeats* einer anderen Sequenz unterbrochen. Diese Unterbrechungen wiesen bei 6 Allelen ein (AGAAG)_n-Motiv, bei 2 Allelen ein (AAGAG)_n-Motiv und bei einem Allel ein (AAAGG)_n-Motiv auf. Bei 5 (AAAAG)_{exp}-Allelen konnte die Sequenz der *Repeat*-Unterbrechungen, aufgrund von Artefakten in den entsprechenden Elektropherogrammen, nicht eindeutig bestimmt werden. Bei 2 von den 127 untersuchten Allelen ohne massive biallelische Expansionen wurde eine (AAAGG)-*Repeat*-Sequenz beobachtet.

Für 21 der insgesamt 192 untersuchten Allele (10,9%) konnten die Elektropherogramme der Sanger-Sequenzierung aufgrund eines zu hohen Hintergrundrauschens nicht eindeutig interpretiert werden.

Tab. 29 Sanger-Sequenzierungsergebnisse von allen eingeschlossenen Patientengruppen

Sequenz	Vollst. CANVAS (n = 17)	Unvollst. CANVAS (n = 9)	ILOCA (n = 70)	Insgesamt (n = 96)
Anzahl insgesamt untersuchter Allele	34	18	140	192
AAAAG	4 (11,8%)	13 (72,2%)	110 (78,6%)	127 (66,1%)
Wildtyp*	1 (2,9%)	5 (27,8%)	60 (42,9%)	66 (34,3%)
Leichte <i>RFC1</i> -Repeat-Expansion*	3 (8,8%)	8 (44,4%)	50 (35,7%)	61 (31,8%)
Mit Unterbrechungen	0	3	11	14
AAAGG		0	1	1
AGAAG		1	5	6
AAGAG		0	2	2
unbestimmt		2	3	5
AAAGG	0	1 (5,6%)	2 (1,4%)	3 (1,6%)
Leichte <i>RFC1</i> -Repeat-Expansion		0	2	2
Massive <i>RFC1</i> -Repeat-Expansion*		1	0	1
AAGGG				
Massive <i>RFC1</i> -Repeat-Expansion	30 (88,2%)	3 (16,7%)	8 (5,7%)	41 (21,4%)
Unbestimmt		1 (5,6%)	20 (14,3%)	21 (10,9%)

*Wildtyp: 8 – 12 *Repeats*; Leichte *RFC1*-Repeat-Expansion: 30 – 150 *Repeats*; Massive *RFC1*-Repeat-Expansion: > 500 *Repeats*.

CANVAS – *Cerebellar Ataxia with Neuropathy and bilateral Vestibular Areflexia Syndrome*; ILOCA – *Idiopathic Late Onset Cerebellar Ataxia*; *RFC1* – *Replication Factor C Subunit 1*; Unvollst. – Unvollständig; Vollst. – Vollständig. (Quelle: Eigene Darstellung nach Gisatulin *et al.*, 2020)

3.1.3 Charakterisierung der *Repeat*-Länge mittels *Southern*-Blot-Analyse und Fragmentlängenanalyse

Um das untersuchte *Repeat* im *RFC1*-Gen bezüglich seiner Länge zu charakterisieren, erfolgte bei Individuen mit massiven biallelischen *Repeat*-Expansionen die Etablierung eines *Southern*-Blot-Protokolls (siehe Abschnitt 2.3.8), wohingegen für die *Repeat*-Längenbestimmung von nicht-massiv expandierten Allelen die Fragmentlängenanalyse angewandt wurde (siehe Abschnitt 2.3.5). Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Analysen dargestellt.

3.1.3.1 Ergebnisse der *Repeat*-Längenbestimmung von massiv expandierten Allelen mittels *Southern*-Blot-Analyse

Um die Größe der massiven biallelischen *Repeat*-Expansionen in dem untersuchten *RFC1*-Locus abzuschätzen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein *Southern*-Blot-Protokoll (siehe Abschnitt 2.3.8) etabliert. Für insgesamt 4 Patientinnen und Patienten mit massiven biallelischen *RFC1*-*Repeat*-Expansionen sowie 3 Kontrollen wurden *Southern*-Blots

Ergebnisse

durchgeführt. Aufgrund des hohen zeitlichen Aufwands und der großen Menge an notwendiger DNA (7 µg pro Analyse) konnte die *Southern*-Blot-Analyse nur bei diesen Personen durchgeführt werden.

Die für das *RFC1*-(AAAAG)₁₁-Referenzallel zu erwartenden Banden bei 1,9 kb, 5,0 kb und 1,6 kb für den jeweiligen Restriktionsverdau mit *Bam*HI, *Eco*RI bzw. *Bam*HI+*Eco*RI (siehe Abb. 4) wurden nur bei den Kontrollen beobachtet. Für die getesteten Individuen mit massiv expandierten Allelen waren die detektierten Fragmente 4 – 5 kb länger als es bei Vorliegen des Referenzallels zu erwarten wäre (siehe Abb. 9). Da es sich um eine Pentanukleotidexpansion handelt, konnten somit für die massiv expandierten Allele *Repeat*-Anzahlen von 800-1000 *Repeats* ermittelt werden.

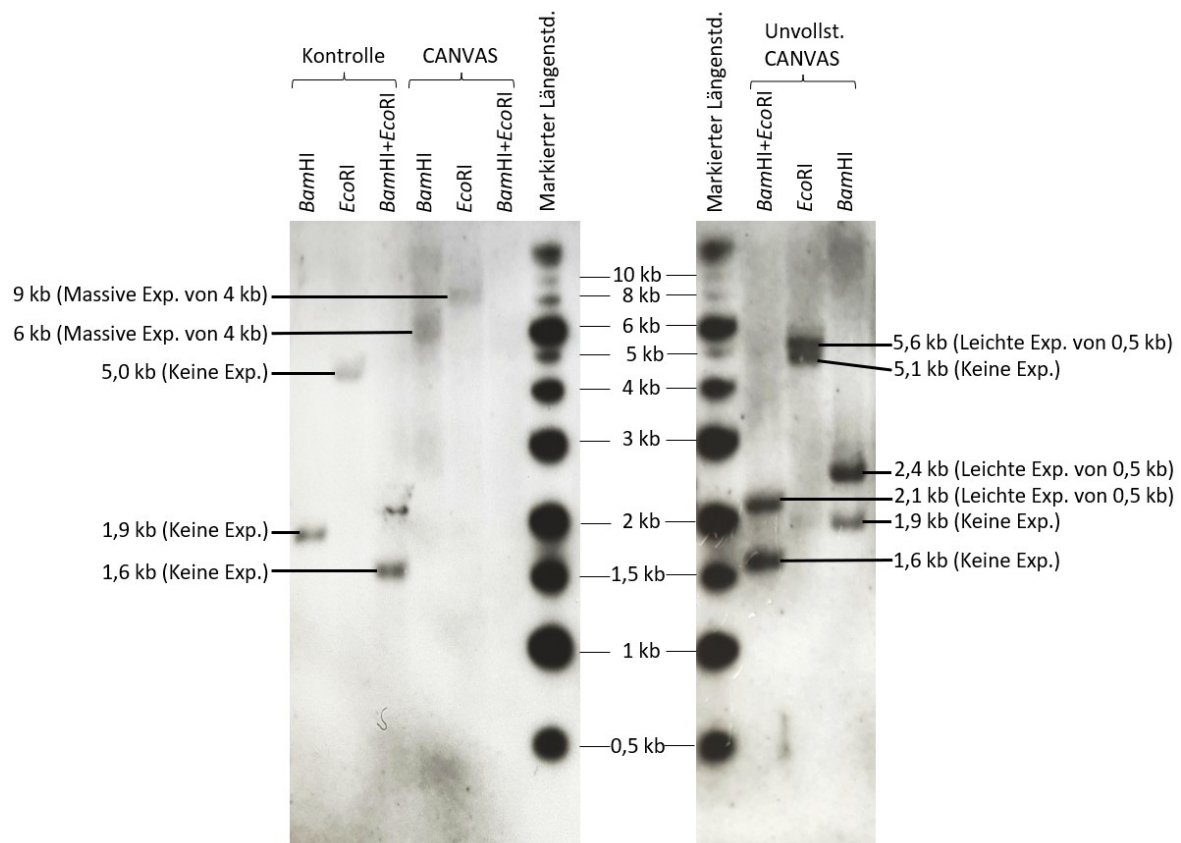


Abb. 9 Repräsentative *Southern*-Blots.

Dargestellt sind exemplarische *Southern*-Blot-Ergebnisse einer Probe ohne Expansionen im *RFC1*-Gen (links – Kontrolle), einer Probe mit einer leichten Expansion (rechts – Individuum mit unvollständigem CANVAS) sowie einer Probe mit massiven biallelischen Expansionen (mittig – Individuum mit CANVAS). Die erwarteten Fragmentlängen für das Referenzallel (hier „keine Exp.“) waren 1,9 kb für den *Bam*HI-Verdau, 5,0 kb für den *Eco*RI-Verdau und 1,6 kb für den Restriktionsverdau mit *Bam*HI und *Eco*RI. Bei der/-m Träger/-in massiver biallelischer Expansionen waren die beobachteten Fragmente ~4 kb länger als die erwarteten *RFC1*-Referenzbanden. CANVAS – *Cerebellar Ataxia with Neuropathy and bilateral Vestibular Areflexia Syndrome*; Exp. – Expansion; kb – Kilobasenpaare; Längenstd. – Längenstandard; Unvollst. – Unvollständig. (Quelle: Eigene Darstellung nach Gisatulin *et al.*, 2020)

3.1.3.2 Ergebnisse der *Repeat*-Längenbestimmung von nicht-massiv expandierten Allelen mittels Fragmentlängenanalyse

Die Bestimmung der *Repeat*-Länge mittels *Southern*-Blot-Analyse erfordert große Mengen qualitativ hochwertiger genomischer DNA und ist überdies sehr zeitaufwändig. Aus diesen Gründen erfolgte die *Repeat*-Längenbestimmung für Individuen ohne massive biallelische Expansionen mittels Fragmentlängenanalyse (siehe Abschnitt 2.3.5) von *Repeat*-überspannenden PCR-Produkten. Wurde in dem resultierenden Elektropherogramm (siehe Abb. 10) nur ein einzelnes PCR-Produkt im Längenbereich des *RFC1*-(AAAAG)₁₁-Referenzallels beobachtet, erfolgte zusätzlich eine quantitative Echtzeit-PCR (siehe Abschnitt 2.3.7), um zu differenzieren, ob bei dem jeweiligen Individuum ein homo- oder heterozygoter Trägerstatus des Referenzallels vorliegt.

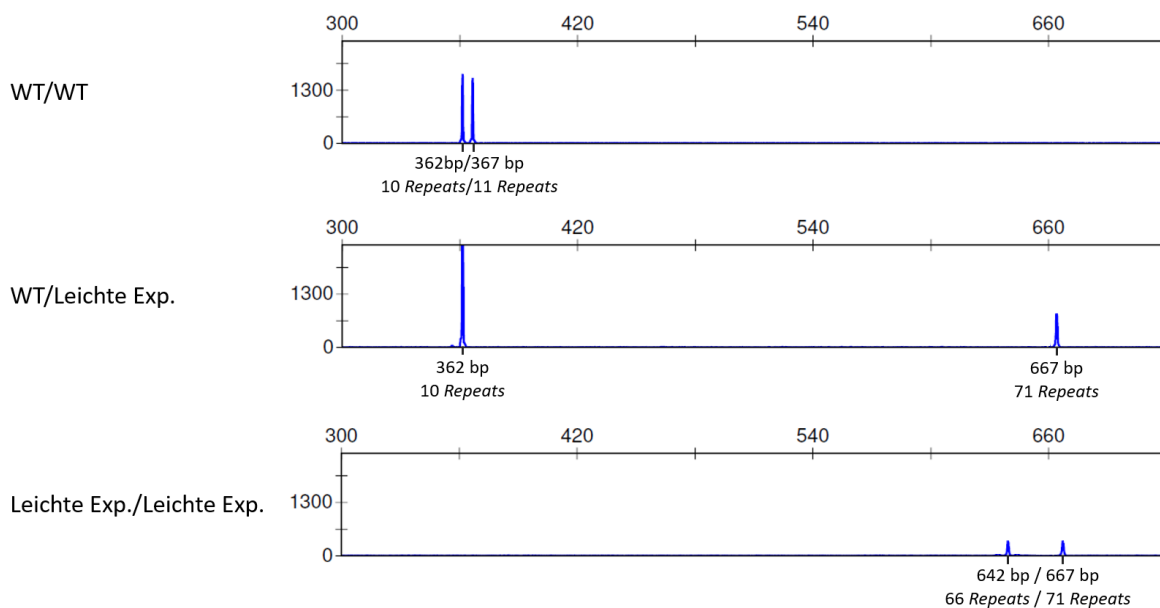


Abb. 10 Exemplarische Elektropherogramme der Fragmentlängenanalyse.

Die *Peaks* entsprechen kapillarelektrophoretisch aufgetrennten Produkten einer das untersuchte *Repeat* (*RFC1*, Intron 2) überspannenden PCR. Anhand der ermittelten Länge der PCR-Fragmente (dargestellt auf der x-Achse) kann, ausgehend von fünf Basenpaaren pro *Repeat*, die *Repeat*-Anzahl bestimmt werden. Auf der y-Achse sind die gemessenen Intensitätswerte aufgetragen. Weist ein Individuum Allele unterschiedlicher *Repeat*-Länge auf, sind zwei unterschiedlich lange PCR-Produkte (*Peaks*) in dem Elektropherogramm zu beobachten. *Repeat*-Längen in einem Bereich von 7 bis 12 *Repeats* wurden aufgrund der geringen Abweichung von dem Referenzallel (11 *Repeats*) als Wildtyp-(WT)-Allele zusammengefasst. *Peaks*, die *Repeat*-Anzahlen zwischen 33 und 137 *Repeats* entsprachen, wurden als leicht expandierte Allele definiert. Gezeigt sind je ein repräsentatives Elektropherogramm von einem Individuum mit zwei WT-*Peaks* (oben), einem Individuum mit einem WT- und einem leicht expandierten *Peak* (Mitte) sowie einem Individuum mit zwei *Peaks*, welche leichten Expansionen entsprachen (unten). bp – Basenpaar; Exp. – Expansion; PCR – Polymerase-Kettenreaktion; *RFC1* – Replication Factor C Subunit 1; WT – Wildtyp. (Quelle: Eigene Darstellung)

Insgesamt wurde bei 283 Individuen eine *Repeat*-Längenbestimmung mittels Fragmentlängenanalyse durchgeführt. Alle Patientinnen und Patienten ohne massive biallelische Expansionen (n = 75) wurden mittels Fragmentlängenanalyse getestet. Darunter

befanden sich 2 Individuen mit einer vollständigen klinischen Manifestation des CANVAS, 7 Individuen mit einem unvollständigen CANVAS sowie 66 Individuen mit einer ILOCA. Um eine Aussage über die *Repeat*-Längenverteilung in der gesunden Population treffen zu können, wurden zusätzlich zu den initial eingeschlossenen Kontrollen ($n = 20$), eine Gruppe von 188 Kontrollen norddeutscher Herkunft getestet (siehe Abb. 2).

Bei den getesteten Individuen ($n = 283$) konnten *Repeat*-Längen zwischen 7 bis 137 *Repeats* detektiert werden (siehe Abb. 11). Die Verteilung der *Repeat*-Längen in sowohl der Patienten- als auch der Kontrollgruppe wies zwei Häufungen auf, welche in einem Bereich zwischen 7 und 12 *Repeats*, beziehungsweise zwischen 33 und 137 *Repeats* lagen. Da die erste Häufung (bei 7 – 12 *Repeats*) nur eine geringe Abweichung vom *RFC1*-(AAAAG)₁₁-Referenzallel aufwies, wurden diese Allele als Wildtyp-(WT)-Allele zusammengefasst. Allele mit 33 bis 137 *Repeats* wurden dementsprechend als leichte *Repeat*-Expansionen definiert.

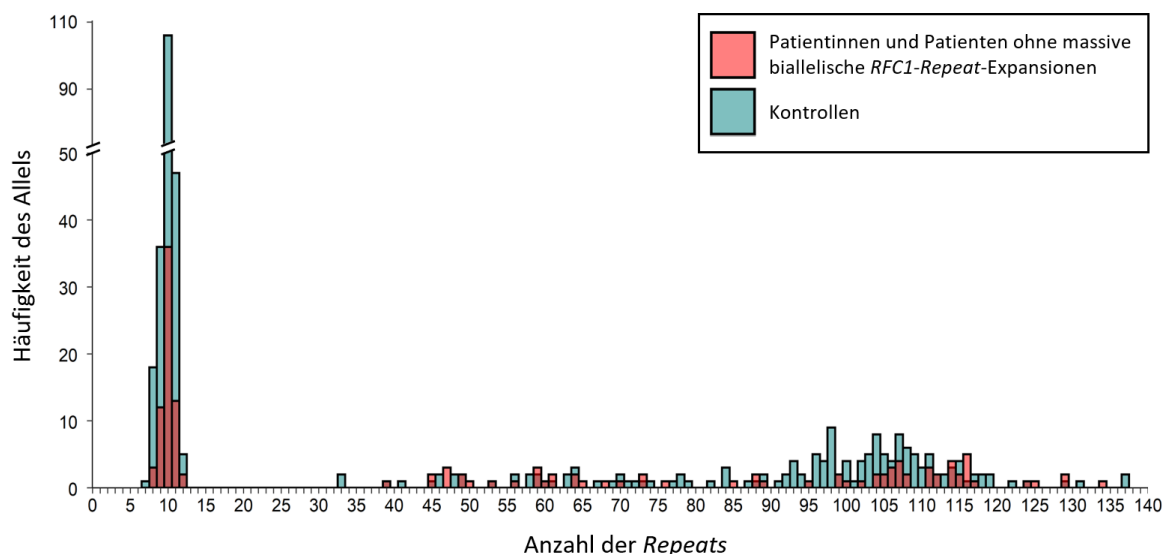


Abb. 11 Histogramm der mittels Fragmentlängenanalyse beobachteten *Repeat*-Längen bei Patientinnen und Patienten ohne massive biallelische *RFC1*-*Repeat*-Expansionen sowie bei Kontrollen.

Dargestellt sind die mittels Fragmentlängenanalyse erhobenen *Repeat*-Längenverteilungen bei den 75 getesteten Patientinnen und Patienten ohne massive biallelische *RFC1*-*Repeat*-Expansionen (rot) sowie bei 208 Kontrollen (blau). Es konnten für beide Gruppen vergleichbare Verteilungen der *Repeat*-Längen mit je einer Häufung in dem *Repeat*-Längenbereich von 7 – 12 *Repeats* und 33 – 137 *Repeats* beobachtet werden. Aufgrund der geringen Abweichung von dem Referenzallel (*Repeat*-Anzahl: 11) wurden Allele mit *Repeat*-Längen in dem Bereich der ersten Häufung (7 – 12 *Repeats*) als Wildtyp-(WT)-Allele und *Repeat*-Längen zwischen 33 und 137 *Repeats* als leichte *Repeat*-Expansionen definiert. *RFC1* – *Replication Factor C Subunit 1*. (Quelle: Eigene Darstellung nach Gisatulin *et al.*, 2020)

Es konnten 16 von 75 Patientinnen und Patienten (21,3%) sowie 54 von 208 Kontrollen (26,0%) als biallelische Träger/-innen eines Wildtyp-Allels identifiziert werden (siehe Tab.

30). Bei diesen Individuen wurden in den aus der Fragmentlängenanalyse resultierenden Elektropherogrammen entweder zwei unterschiedliche *Peaks* in dem *Repeat*-Längenbereich des Wildtyp-Allels (7 – 12 *Repeats*) oder nur ein Wildtyp-*Peak* beobachtet. Bei letzteren Proben wurde mittels anschließender quantitativer Echtzeit-PCR (siehe Abschnitt 2.3.7) das biallelische Vorliegen eines Wildtyp-Allels festgestellt.

In der Patientengruppe konnte bei 34,7% der Individuen (n = 26) und in der Kontrollgruppe bei 40,9% der Individuen (n = 85) sowohl ein Wildtyp-*Peak* als auch ein *Peak* in dem als leichte *Repeat*-Expansion zusammengefassten Längenbereich (33 – 137 *Repeats*) in den resultierenden Elektropherogrammen detektiert werden (siehe Tab. 30). Bei 8 der 75 Patientinnen und Patienten (10,7%) sowie 22 der 208 Kontrollen (10,6%) konnte nur ein Wildtyp-*Peak* beobachtet und mittels quantitativer Echtzeit-PCR-Analyse ein heterozygoter Trägerstatus des Wildtyp-Allels bestimmt werden. Die Länge des zweiten Allels konnte bei diesen Individuen mittels Fragmentlängenanalyse nicht bestimmt werden, weswegen bei diesen Allelen von Expansionen ausgegangen wurde, die oberhalb der Nachweisgrenze dieser Methode liegen (~950 bp, gemäß den Herstellerangaben des zur Kapillarelektrophorese verwendeten POP-7TM Polymer, Applied Biosystems).

Bei 18 von 75 Patientinnen und Patienten (24,0%) sowie 31 von 208 Kontrollen (14,9%) waren zwei unterschiedliche, leichten *Repeat*-Expansionen entsprechende *Peaks* in den jeweiligen Elektropherogrammen zu sehen (siehe Tab. 30). 9,3% der getesteten Individuen der Patientengruppe (n = 7) und 4,8% der Kontrollen (n = 10) wiesen nur einen *Peak* in dem Längenbereich einer leichten *Repeat*-Expansion auf. Diese Individuen weisen somit entweder zwei gleichlange leicht expandierte Allele oder ein weiteres Allel mit einer *Repeat*-Expansion oberhalb der Nachweisgrenze der Fragmentlängenanalyse auf.

In der untersuchten Kontrollgruppe konnte bei 6 von 208 Individuen (2,9%) kein *Peak* in dem resultierenden Elektropherogramm beobachtet werden. Um zu untersuchen, ob in diesen Proben DNA vorlag, wurde eine Duplex-PCR (siehe Abschnitt 2.3.2.2 B) durchgeführt. Bei vier Proben konnte in der Agarosegelelektrophorese der Duplex-PCR-Produkte sowohl eine *PRKN*-Kontrollbande als auch eine leicht expandierte *RFC1*-Bande (bei ~1 bis 1,2 kb) beobachtet werden. Bei diesen Individuen lagen somit expandierte Allele vor, deren Länge oberhalb der Nachweisgrenze der Fragmentlängenanalyse lagen, jedoch nicht massiv expandiert waren (> 500 *Repeats*). Bei einem Individuum konnte in der

Ergebnisse

Agarosegelelektrophorese kein PCR-Produkt beobachtet werden, sodass diese Probe vermutlich nicht mit DNA beladen war. Ein Individuum wies in der Agarosegelelektrophorese nur eine dem *RFC1*-Referenzallel entsprechende Bande und keine *PRKN*-Kontrollbande auf, sodass das Duplex-PCR-Ergebnis und damit auch der Trägerstatus hier nicht eindeutig bewertbar waren.

Auf einem Signifikanzniveau von 5% konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Gruppenzugehörigkeit und der Allelfrequenz ($p = 0,199$), beziehungsweise zwischen der Gruppenzugehörigkeit und dem Genotyp ($p = 0,191$) festgestellt werden.

Tab. 30 Ergebnisse der Genotypisierung mittels Fragmentlängenanalyse

	Patientinnen und Patienten ohne massive biallelische Expansionen (n = 75)	Kontrollen (n = 208)	p-Wert*
Insgesamt getestete Allele	150	416	
Allelfrequenz			0,199
WT	66 (44,0%)	215 (51,7%)	
Leichte Exp.	69 (46,0%)	157 (37,7%)	
Unbestimmt	15 (10,0%)	44 (10,6%)	
Genotyp			0,191
WT/WT	16 (21,3%)	54 (26,0%)	
WT/Leichte Exp.	26 (34,7%)	85 (40,9%)	
WT/unbestimmt	8 (10,7%)	22 (10,6%)	
Leichte Exp./Leichte Exp.	18 (24,0%)	31 (14,9%)	
Leichte Exp./unbestimmt	7 (9,3%)	10 (4,8%)	
Unbestimmt/unbestimmt	0 (0,0%)	6 (2,9%)	

*Chi-Quadrat-Test

Wildtyp (WT): 7 – 12 *Repeats*; Leichte Expansion (Exp.): 33 – 137 *Repeats*. (Quelle: Eigene Darstellung Gisatulin *et al.*, 2020)

3.2 Untersuchung auf das Vorliegen einer *Founder*-Mutation

Um zu überprüfen, ob die massiven biallelischen *Repeat*-Expansionen in dem *RFC1*-Gen auf einen gemeinsamen ursprünglichen Haplotypen (Gründer- bzw. *Founder*-Mutation) zurückzuführen sind, erfolgte eine Genotypisierung der Expansionsträger/-innen anhand von Mikrosatelliten-Markern (siehe Abschnitt 2.3.6). Hierfür wurden in dieser Arbeit vier verschiedene Mikrosatelliten-Marker (D4S3001, D4S1581, D4S2382 und D4S174) untersucht, welche in an die *RFC1*-Region (Chromosom 4p14) angrenzenden genomischen Bereichen lokalisiert sind (siehe Abb. 12).

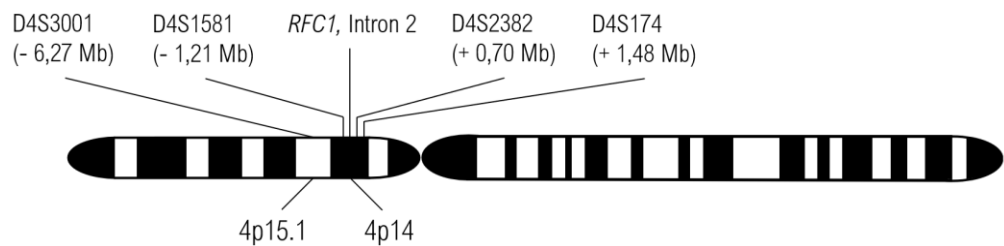


Abb. 12 Schematische Darstellung des Chromosoms 4 mit eingezeichneten Positionen der untersuchten Mikrosatelliten-Marker sowie des *RFC1*-Repeats.

Die Abbildung zeigt die chromosomalen Loci der untersuchten Mikrosatelliten-Marker (4p15.1 für D4S3001, und 4p14 für D4S1581, D4S2382, D4S174) auf dem hier schematisch dargestellten Chromosom 4 sowie deren Entfernung zu dem untersuchten Repeat (*RFC1*, Intron 2). Mb – Megabasenpaar; *RFC1* – Replication Factor C Subunit 1. (Quelle: Eigene Darstellung)

Bei insgesamt 17 von 21 Individuen mit massiven biallelischen *RFC1*-Repeat-Expansionen wurde eine Mikrosatelliten-Genotypisierung durchgeführt (siehe Abb. 2). Darunter befanden sich 15 Individuen mit einem vollständigen CANVAS sowie 2 Individuen mit einem unvollständigen CANVAS. Aufgrund von mangelndem genetischem Material wurden die 4 Expansionsträger/-innen aus der ILOCA-Patientengruppe nicht getestet. Des Weiteren wurden 2 Kontrollproben von Individuen des *Centre d'Étude du Polymorphisme Humain* (CEPH) getestet.

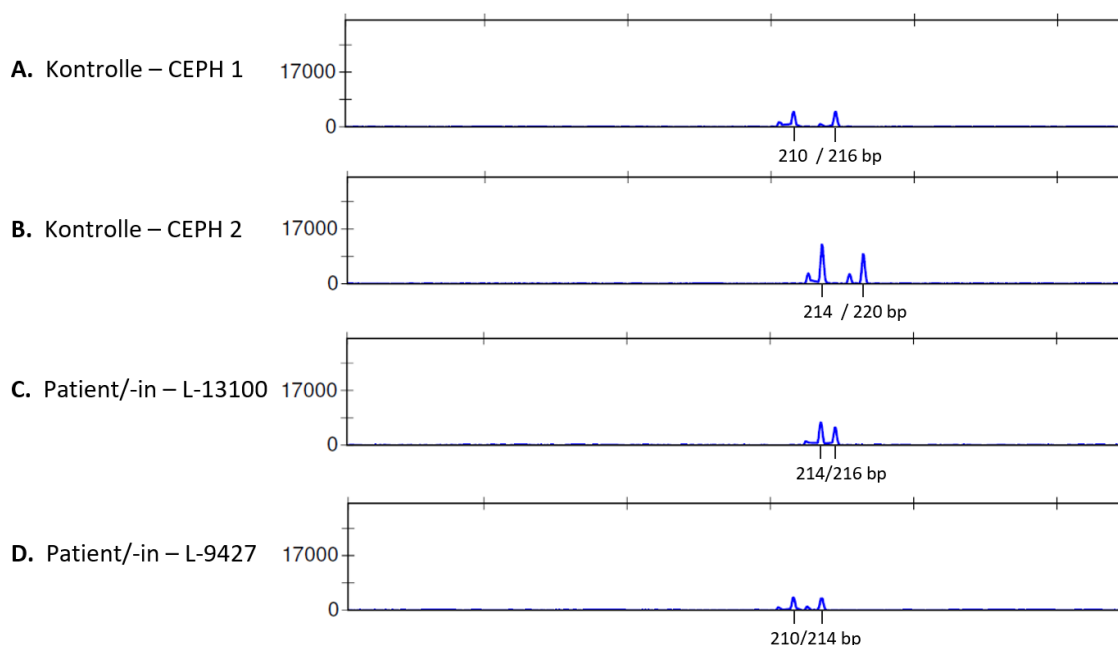


Abb. 13 Repräsentative Elektropherogramme der Mikrosatelliten-Genotypisierung von Individuen mit einem vollständigen CANVAS und Kontrollen am Beispiel des D4S1581-Mikrosatelliten-Markers.

Die *Peaks* entsprechen kapillarelektrophoretisch aufgetrennten Produkten einer den D4S1581-Mikrosatelliten-Marker überspannenden PCR. Auf der y-Achse sind die gemessenen Intensitätswerte aufgetragen. Weist ein Individuum unterschiedlich langen Allele auf, sind zwei verschieden lange PCR-Produkte (*Peaks*) in dem Elektropherogramm zu beobachten. Gezeigt sind Ausschnitte aus repräsentativen Elektropherogrammen von zwei Kontrollen (A. und B.) und zwei Individuen mit einem CANVAS (C. und D.). bp – Basenpaar; CANVAS – Cerebellar Ataxia with Neuropathy and bilateral Vestibular Areflexia Syndrome; CEPH – Centre d'Étude du Polymorphisme Humain; L-Nummer – Laborinterne Identifikationsnummer. (Quelle: Eigene Darstellung)

Ergebnisse

Die Längenbestimmung der vier untersuchten Mikrosatelliten-Marker erfolgte mittels PCR-Amplifikation des Marker-Bereichs und anschließender Fragmentlängenanalyse der PCR-Produkte. Exemplarische Elektropherogramme der Mikrosatelliten-Genotypisierung sind in Abb. 13 dargestellt. Eine für einen gemeinsamen Ursprung der Mutation sprechende Übereinstimmung der Mikrosatelliten-Haplotypen wurde unter den Individuen mit massiven biallelischen Expansionen nicht beobachtet. In Tab. 31 sind alle erhobenen Mikrosatelliten-Genotypen der untersuchten Individuen zusammengefasst.

Tab. 31 Ergebnisse der Mikrosatelliten-Genotypisierung bei den untersuchten Patientinnen und Patienten sowie Kontrollen

Getestetes Individuum	Gruppe	Untersuchte Mikrosatelliten-Marker			
		D4S3001	D4S1581	D4S2382	D4S174
CEPH 1	Kontrolle	218 / 220 bp	210 / 216 bp	237 / 241 bp	179 / 179 bp
CEPH 2	Kontrolle	218 / 224 bp	214 / 220 bp	237 / 240 bp	179 / 185 bp
L-9324	Vollst. CAVNAS	218 / 222 bp	214 / 220 bp	240 / 246 bp	177 / 177 bp
L-10016	Vollst. CANVAS	222 / 224 bp	214 / 216 bp	240 / 240 bp	189 / 189 bp
L-10167	Vollst. CANVAS	218 / 224 bp	216 / 220 bp	232 / 237 bp	177 / 179 bp
L-10168	Vollst. CANVAS	218 / 224 bp	216 / 220 bp	232 / 237 bp	177 / 179 bp
L-11178	Vollst. CANVAS	218 / 222 bp	214 / 220 bp	240 / 246 bp	177 / 177 bp
L-11205	Vollst. CANVAS	220 / 224 bp	216 / 216 bp	240 / 243 bp	175 / 181 bp
L-11310	Vollst. CANVAS	216 / 222 bp	216 / 220 bp	240 / 240 bp	177 / 183 bp
L-11941	Vollst. CANVAS	216 / 224 bp	216 / 216 bp	240 / 240 bp	185 / 189 bp
L-12010	Vollst. CANVAS	220 / 224 bp	210 / 212 bp	232 / 240 bp	177 / 183 bp
L-13068	Vollst. CANVAS	218 / 220 bp	216 / 216 bp	240 / 240 bp	179 / 189 bp
L-13100	Vollst. CANVAS	224 / 224 bp	214 / 216 bp	232 / 240 bp	177 / 189 bp
L-13655	Vollst. CANVAS	222 / 226 bp	214 / 216 bp	240 / 240 bp	179 / 179 bp
L-13770	Vollst. CANVAS	218 / 218 bp	214 / 220 bp	241 / 243 bp	179 / 187 bp
L-13825	Vollst. CANVAS	218 / 224 bp	214 / 218 bp	240 / 243 bp	179 / 189 bp
L-14591	Vollst. CANVAS	216 / 224 bp	214 / 220 bp	232 / 240 bp	185 / 187 bp
L-9427	Unvollst. CANVAS	220 / 224 bp	210 / 214 bp	237 / 240 bp	177 / 187 bp
L-14467	Unvollst. CANVAS	218 / 220 bp	214 / 216 bp	240 / 242 bp	179 / 185 bp

bp – Basenpaar; CANVAS – *Cerebellar Ataxia with Neuropathy and bilateral Vestibular Areflexia Syndrome*; CEPH – *Centre d'Étude du Polymorphisme Humain*; L-Nummer – Laborinterne Identifikationsnummer. Unvollst. – Unvollständig; Vollst. – Vollständig.

3.3 Untersuchung der intergenerationalen *Repeat*-Stabilität

Bei den Individuen ohne massive biallelische *RFCI-Repeat*-Expansionen wurde eine hohe Heterogenität der *Repeat*-Länge in dem untersuchten *RFCI*-Locus (chr4:39350045-39350103, GRCh37/hg19) beobachtet (siehe Abschnitt 3.1.3.2). Aus diesem Grund wurde die Hypothese aufgestellt, dass solche nicht-massiv expandierten *Repeats* möglicherweise ein instabiles Vererbungsmuster aufweisen. Um diese Hypothese zu testen, wurde eine Gruppe von 153 Individuen aus insgesamt 39 multigenerationalen Familien herangezogen,

bei denen keine zerebellären Ataxien bekannt waren (siehe Abb. 2). Bei diesen Individuen wurden die *Repeat*-Längen mittels Fragmentlängenanalyse (siehe Abschnitt 2.3.5) eines *Repeat*-überspannenden PCR-Produktes ermittelt und anschließend innerhalb der Familien ausgewertet, ob *Repeat*-Längenveränderungen bei der Vererbung an nachfolgende Generationen zu beobachten waren.

Bei den getesteten Familienmitgliedern ($n = 153$) konnten *Repeat*-Längen zwischen 7 und 134 *Repeats* beobachtet werden mit einer vergleichbaren Verteilung wie bei den in Abschnitt 3.1.3.2 getesteten Patientinnen und Patienten sowie Kontrollen ohne massive biallelische *RFCI*-Expansionen. Insgesamt konnten 101 Transmissionen des *Repeats* ausgewertet werden, von denen 92 (91,1%) stabil vererbt wurden. Bei neun Allelen (8,9%) wurde eine Veränderung der *Repeat*-Länge bei der Vererbung an nachfolgende Generationen beobachtet (siehe Abb. 14). Hierbei handelte es sich bei 4 Allelen um Expansionen um 1 *Repeat* (von 9, 10, 10 und 122 *Repeats*). Bei 5 transmittierten Allelen konnte eine Verkürzung der *Repeat*-Länge (Kontraktion) beobachtet werden, wobei bei 2 Allelen eine Kontraktion um 1 *Repeat* (von 116 und 121 *Repeats*), bei 2 Allelen eine Verkürzung um 2 *Repeats* (von 10 und 11 *Repeats*) und bei einem Allel eine Verkürzung um 3 *Repeats* (von 10 *Repeats*) vorlag.

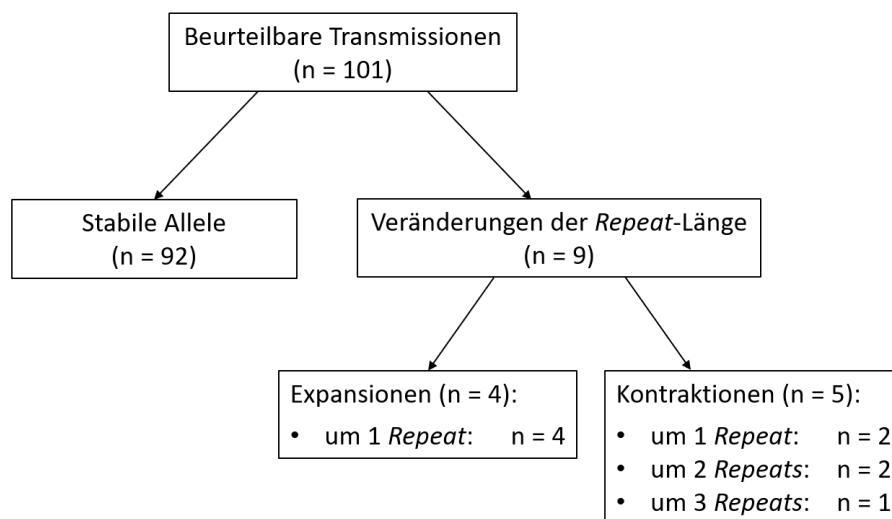


Abb. 14 Übersichtsabbildung der ausgewerteten intergenerationalen *Repeat*-Transmissionen.

Um die Stabilität des *Repeats* bei der Vererbung an nachfolgende Generationen zu beurteilen, wurden bei 153 Mitgliedern von 39 Familien ohne bekannte Ataxien die *Repeat*-Längen bestimmt. Von 101 analysierten Transmissionen wurden 92 (91,1%) Allele stabil vererbt. Bei 9 (8,9%) der Allele wurde eine Veränderung der *Repeat*-Länge beobachtet, darunter 4 Expansionen um 1 *Repeat* und 5 Kontraktionen um 1–3 *Repeats*. (Quelle: Eigene Darstellung nach Gisatulin *et al.*, 2020)

3.4 Funktionelle Untersuchungen des *RFCI*-Gens

Auf welchem Weg die massiven biallelischen *Repeat*-Expansion im nicht-kodierenden Bereich des *RFCI*-Gens auf molekularer Ebene zu dem CANVAS-Phänotyp führen, ist nach dem aktuellen Forschungsstand nicht bekannt (Cortese *et al.*, 2019; Rafehi *et al.*, 2019). Aus diesem Grund wurden unterschiedliche funktionelle Analysen des *RFCI*-Gens durchgeführt (siehe Abb. 2), deren Ergebnisse in den folgenden Abschnitten aufgeführt sind.

3.4.1 Expressionsanalyse des *RFCI*- und *WDR19*-Gens

Einen möglichen molekularen Pathomechanismus stellt die Beeinträchtigung der Expression des *RFCI*-Gens selbst oder dessen benachbarter Gene dar. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden aus peripher-venösem Blut extrahierte RNA-Proben von 4 Individuen mit massiven biallelischen *Repeat*-Expansionen sowie von 5 Kontrollproben herangezogen.

Mittels reverser Transkription der RNA zu cDNA und einer anschließenden quantitativen Echtzeit-PCR (siehe Abschnitt 2.3.7) konnte die relative Expression des *RFCI*-Gens und des 5'-benachbarten *WD Repeat-containing Protein 19-* (*WDR19*)-Gens im Verhältnis zu konstitutiv exprimierten Referenzgenen (β -Aktin, *HGPRT* und *YWHAZ*) bestimmt werden. Es wurden hierbei keine statistisch signifikanten Unterschiede in der relativen Expression des *RFCI*- oder *WDR19*-Gens zwischen Individuen mit massiven biallelischen Expansionen und Kontrollen beobachtet (siehe Abb. 15).

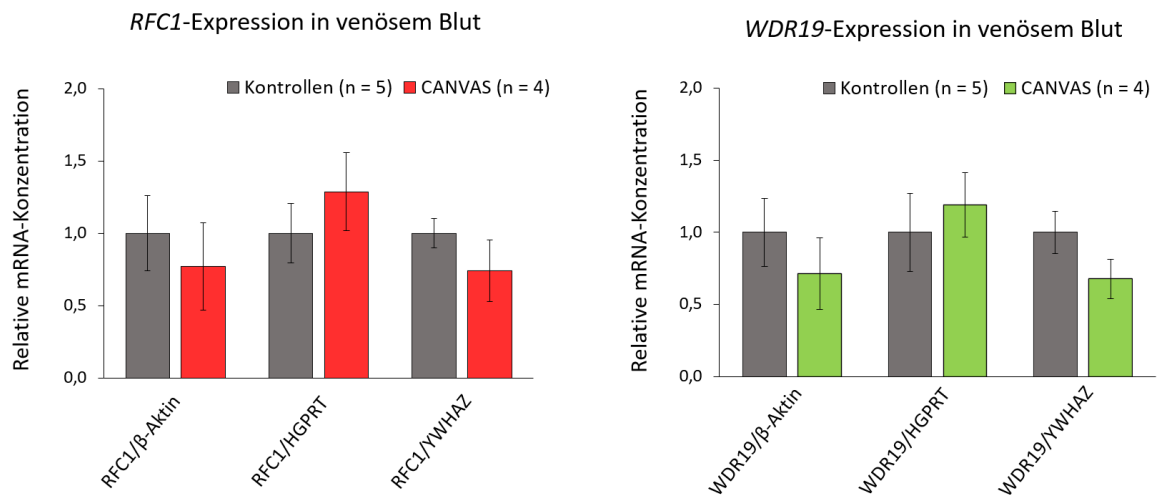


Abb. 15 Ergebnisse der Expressionsanalyse des *RFC1*- und *WDR19*-Gens in peripher-venösem Blut bei Individuen mit einem vollständigen CANVAS und Kontrollen.

Für die Expressionsanalyse des *RFC1*- und *WDR19*-Gens wurden mittels quantitativer Echtzeit-PCR die jeweiligen Transkriptkonzentrationen bei Expansionsträgerinnen und Expansionsträgern mit einem vollständigen CANVAS (n = 4) sowie Kontrollen (n = 5) gemessen und mit mRNA-Konzentrationen von drei konstitutiv exprimierten Referenzgenen (*β -Actin*, *HGPRT*, *YWHAZ*) ins Verhältnis gesetzt. Dargestellt sind die gemittelten relativen mRNA-Konzentrationen der Patienten- und Kontrollgruppe für das *RFC1*-Gen (links) sowie das *WDR19*-Gen (rechts) unter Angabe der Standardabweichung (Fehlerbalken). Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied (zweiseitiger t-Test) in der relativen Expression beider Gene zwischen der Patienten- und Kontrollgruppe beobachtet werden. CANVAS – *Cerebellar Ataxia with Neuropathy and bilateral Vestibular Areflexia Syndrome*; *HGPRT* – *Hypoxantin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 1*; mRNA – messenger RNA; *RFC1* – *Replication Factor C Subunit 1*; *WDR19* – *WD repeat-containing Protein 19*; *YWHAZ* – *14-3-3 Protein zeta/delta*. (Quelle: Eigene Darstellung nach Gisatulin *et al.*, 2020)

3.4.2 Untersuchungen der *RFC1*-prä-mRNA-Prozessierung

Neben einer veränderten Genexpression stellt die durch das Vorhandensein intronischer *Repeat*-Expansion bedingte fehlerhafte Prozessierung der *RFC1*-prä-mRNA einen weiteren möglichen molekularen Pathomechanismus dar (Malik *et al.*, 2021). Hierbei sind insbesondere Alterationen des Spleißvorgangs, wie die Retention des *Repeat*-Expansions-beinhaltenenden Introns 2 oder das Überspringen benachbarter Exons (*Exon-Skipping*), als denkbare Pathomechanismen zu erwähnen.

Die Untersuchungen auf das Vorliegen von Prozessierungsalterationen der *RFC1*-prä-mRNA bei Expansionsträgerinnen und Expansionsträgern erfolgte anhand von RNA-Proben aus peripher-venösem Blut. Hierfür wurden wieder Proben der 4 verfügbaren Individuen mit massiven biallelischen Expansionen verwendet, bei welchen ein vollständiges klinisches Bild des CANVAS vorlag. Zusätzlich wurden 7 Kontrollproben untersucht. Für die anschließenden Analysen wurden diese RNA-Proben mittels reverser Transkription zu cDNA umgeschrieben (siehe Abschnitt 2.3.1.2).

Ergebnisse

Um zu testen, ob es bei Individuen mit massiven biallelischen *Repeat*-Expansionen zu einer zumindest teilweisen Retention des betroffenen zweiten Introns im Rahmen der *RFC1*-prä-mRNA-Prozessierung kommt, wurde mittels konventioneller PCR (siehe Abschnitt 2.3.2.2 A) ein cDNA-Abschnitt amplifiziert, welcher den Übergang von Exon 2 zu Exon 3 des *RFC1*-Gens überspannt. Ein einer Retention des etwa 6 kb langen Intron 2 entsprechendes PCR-Produkt konnte weder bei den Trägerinnen und Trägern der *Repeat*-Expansion noch bei den Kontrollproben nachgewiesen werden, womit sich die Hypothese einer (Teil-) Intronretention, auch bei beobachteter gleichbleibender Expression (siehe Abschnitt 3.4.1), nicht bestätigte (siehe Abb. 16 A).

Um weiterhin zu überprüfen, ob es durch das Vorhandensein intronischer Expansionen in dem *RFC1*-Gen zu dem Überspringen von Exons (*Exon-Skipping*) kommt, wurde ein die ersten neun Exons des *RFC1*-Transkripts umfassendes cDNA-Fragment nach PCR-Amplifikation mittels Sanger-Sequenzierung (siehe Abschnitt 2.3.4) analysiert. Sowohl bei den getesteten Expansionsträgerinnen und Expansionsträgern ($n = 4$) als auch bei den Kontrollen ($n = 7$) konnten hierbei keine Abweichungen von der Referenzsequenz und somit kein *Exon-Skipping* beobachtet werden (siehe Abb. 16 B).

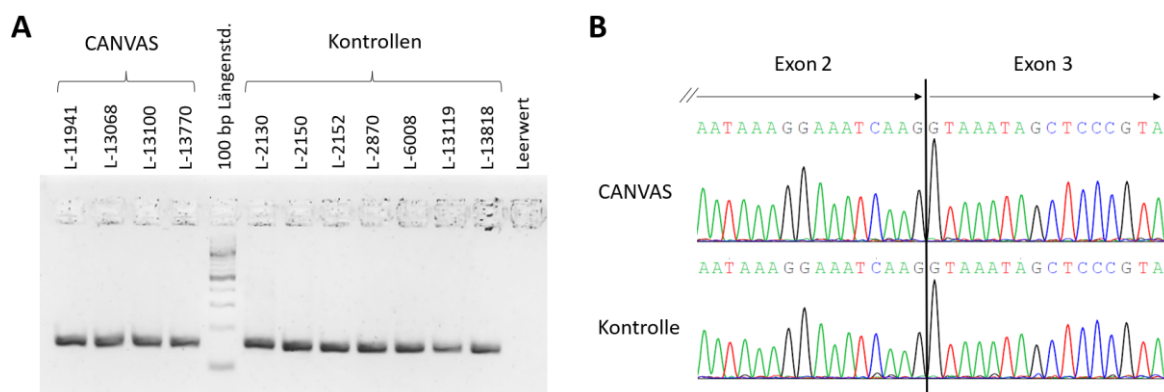


Abb. 16 Ergebnisse der Untersuchungen auf Prozessierungsalterationen der *RFC1*-prä-mRNA bei Individuen mit einem vollständigen CANVAS und Kontrollen.

(A) Dargestellt ist das Ergebnis der Agarosegelelektrophorese der den Übergang von Exon 2 zu Exon 3 des *RFC1*-Gens überspannenden cDNA-PCR von Expansionsträgerinnen und Expansionsträgern mit einem vollständigem CANVAS ($n = 4$) sowie Kontrollen ($n = 7$). Bei den Individuen mit einem CANVAS konnte kein alternatives PCR-Produkt detektiert werden, welches auf eine (teilweise) Retention des Expansions-beinhaltenden zweiten Introns des *RFC1*-Gens hinweisen würde. (B) Gezeigt sind Ausschnitte von exemplarische Elektropherogrammen der Sanger-Sequenzierung von PCR-Fragmenten, welche die ersten neun Exons des *RFC1*-Gens umfassen. Sowohl bei den untersuchten Patientinnen und Patienten (hier repräsentativ oben dargestellt) als auch bei den Kontrollen (hier repräsentativ unten gezeigt) konnte kein Überspringen von Exons (*Exon-Skipping*) beobachtet werden. bp – Basenpaar; CANVAS – *Cerebellar Ataxia with Neuropathy and bilateral Vestibular Areflexia Syndrome*; Längenstd. – Längenstandard; L-Nummer – Laborinterne Identifikationsnummer. (Quelle: Eigene Darstellung nach Gisatulin *et al.*, 2020)

4 Diskussion

In der Krankheitsgruppe der spät beginnenden zerebellären Ataxien weist ein wesentlicher Anteil der Patientinnen und Patienten eine idiopathische Ätiologie auf (Klockgether, 2010). In den letzten Jahren konnte, parallel zu den eigenen Arbeiten (Gisatulin *et al.*, 2020) auch von anderen Arbeitsgruppen, das Vorhandensein einer biallelischen *Repeat*-Expansion im zweiten Intron des *RFC1*-Gens nicht nur in verschiedenen CANVAS-Patientengruppen, sondern auch bei Patientinnen und Patienten mit anderen Ataxieformen nachgewiesen werden (Aboud Syriani *et al.*, 2020; Cortese *et al.*, 2020). Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die genetische Charakterisierung von Individuen mit einem klinisch vollständigen und unvollständigen CANVAS, von Individuen mit spät beginnenden zerebellären Ataxien sowie von Kontrollen in Bezug auf die massiven biallelischen *Repeat*-Expansionen im *RFC1*-Gen. Die hier erhobenen Daten sollen folgend im Hinblick auf die aktuelle Literatur eingeordnet und vor dem Hintergrund der verwendeten Methoden kritisch bewertet werden.

4.1 Genotypisierung des *RFC1-Repeats* bei Patientinnen und Patienten mit verschiedenen Ataxieformen

Die Identifikation der massiven biallelischen *Repeat*-Expansionen im *RFC1*-Gen durch Cortese *et al.* ermöglichte es ein besseres Verständnis für die Ätiologie von CANVAS sowie von anderen Ataxieformen des Erwachsenenalters zu schaffen (Cortese *et al.*, 2019). Dennoch sind die in der Literatur beschriebenen Fallzahlen gering, sodass zur Bewertung der klinischen Relevanz dieser *Repeat*-Expansion die Erfassung der Prävalenz und Ausprägung der Mutation in möglichst vielen Patientengruppen entscheidend ist. Dazu werden auch Verlaufsstudien über viele Jahre von Bedeutung sein. Die in dieser Arbeit etablierte Duplex-PCR ermöglichte es, in einer Gruppe von 96 Ataxiepatientinnen und Ataxiepatienten Träger/-innen massiver biallelischer *RFC1-Repeat*-Expansionen zu identifizieren und diese folgend mittels *Repeat-Primed*-PCR, Sanger-Sequenzierung sowie *Southern*-Blot und Fragmentlängenanalyse zu charakterisieren.

Massive biallelische *Repeat*-Expansionen im *RFC1*-Gen konnten in dieser Arbeit mittels Duplex-PCR-Screening bei 88,2% (15 von 17) der eingeschlossenen Individuen mit einer vollständigen klinischen Manifestation des CANVAS nachgewiesen werden (siehe

Diskussion

Abschnitt 3.1.1). Für die Prävalenz der biallelischen *RFCI-Repeat*-Expansion bei Individuen mit einem vollständigen CANVAS finden sich in der aktuellen Literatur unterschiedliche Angaben, welche je nach betrachteter Studie von 73% bis 100% reichen (siehe Tab. 32). Die in dieser Arbeit ermittelte Häufigkeit der Mutation ist somit vergleichbar mit den mittlerweile erhobenen Daten durch andere Arbeitsgruppen. Die teilweise sehr unterschiedlichen Prävalenzen der *RFCI*-Expansion in den verschiedenen Studien (siehe Tab. 32), lassen sich womöglich auf die unterschiedlich großen Fallzahlen, die verschiedenen untersuchten Ethnizitäten sowie uneinheitliche Diagnosekriterien für ein vollständiges CANVAS zurückführen. Möglicherweise kam es auch in Studien mit niedrigen Fallzahlen zu einer Untererfassung von Mutationsträgerinnen und Mutationsträgern.

Tab. 32 Zusammenfassung der berichteten Häufigkeiten massiver biallelischer *Repeat*-Expansionen im *RFCI*-Gen bei Patientinnen und Patienten mit spät beginnenden zerebellären Ataxien

Publikation	Vollst. CANVAS			Unvollst. CANVAS*	Spät beginnende zerebelläre Ataxie
	Insgesamt	sporadisch	familiär		
Gisatulin <i>et al.</i> , 2020	88,2% (15/17)	84,6% (11/13)	100% (4/4)	22,2% (2/9)	21,9% (21/96)
Cortese <i>et al.</i> , 2019	96,3% (26/27)	92% (11/12)	100% (15/15)	53,8% (21/39)	32,4% (56/173)
Rafehi <i>et al.</i> , 2019	85,7% (30/35)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Akçimen <i>et al.</i> , 2019	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	1,1% (2/177)
Cortese <i>et al.</i> , 2020	90% (63/70)	n.a.	n.a.	n.a.	28,9% (105/363)
Fan <i>et al.</i> , 2020	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0% (0/91)
Aboud Syriani <i>et al.</i> , 2020	73% (8/11)	n.a.	n.a.	22% (14/63)	3,2% (29/911)
Beecroft <i>et al.</i> , 2020	100% (13/13)	100% (5/5)	100% (8/8)	n.a.	n.a.
Van Daele <i>et al.</i> , 2020	100% (4/4)	100% (2/2)	100% (2/2)	22,2% (6/27)	13,9% (10/72)
Tsuchiya <i>et al.</i> , 2020	100% (4/4)	100% (1/1)	100% (3/3)	n.a.	10,5% (4/38)
Çakar <i>et al.</i> , 2021	100% (5/5)	100% (5/5)	n.a.	n.a.	n.a.
Kontogeorgiou <i>et al.</i> , 2021	85,7% (6/7)	66,6% (2/3)	100% (4/4)	0 % (0/10)	8,9% (7/79)

*, „Unvollständiges CANVAS“ wird, bis auf in Gisatulin *et al.*, 2020 (siehe Abschnitt 2.1.1 B), als das gleichzeitige Vorliegen einer zerebellären Ataxie und einer sensiblen Neuropathie definiert.

Diese Tabelle soll einen Überblick geben über die in verschiedenen aktuellen Studien berichteten Prävalenzdaten der massiven biallelischen *Repeat*-Expansionen im *RFCI*-Gen. In den aufgeführten Original-Publikationen werden die Häufigkeiten der Mutation auf eine uneinheitliche Art und Weise berechnet. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten, wurden für diese Übersicht die Häufigkeiten in einer einheitlichen Form angegeben, weswegen sich die Einzelwerte von den konkret in den Publikationen genannten Angaben unterscheiden können. CANVAS – *Cerebellar Ataxia with Neuropathie and bilateral Areflexia Syndrome*; n.a. – *not available*; Unvollst. – unvollständig; Vollst. – vollständig.

In dieser Arbeit wurden neben Individuen mit einem vollständigen CANVAS auch Patientinnen und Patienten mit einer unvollständigen Manifestation des Syndroms mittels Duplex-PCR auf das Vorhandensein massiver biallelischer Expansionen im *RFCI*-Gen gescreent. Insgesamt 22,2% (2 von 9) dieser Individuen konnten hierbei als Träger/-innen der biallelischen *RFCI*-Expansion identifiziert werden (siehe Abschnitt 3.1.1). In der

aktuellen Literatur finden sich vergleichbar wenige Studien, in denen die Prävalenz der Mutation bei Individuen mit einem unvollständigen CANVAS erhoben wurde. Die berichteten Häufigkeiten für diese Patientengruppe sind sehr unterschiedlich und liegen zwischen 0% bis 53,8% je nach Studie (siehe Tab. 32). Die in dieser Arbeit erhobene Häufigkeit von ~22% wurde auch in zwei weiteren Studien bei Individuen mit einem unvollständigen CANVAS beobachtet (Aboud Syriani *et al.*, 2020; Van Daele *et al.*, 2020). Die Vergleichbarkeit der in dieser Promotionsarbeit erhobenen Prävalenzdaten für Individuen mit einem unvollständigen CANVAS ist jedoch eingeschränkt, da die Einschlusskriterien für diese Patientengruppe in den betrachteten Studien von den hier verwendeten abweichen. So werden in den Tab. 32 zu entnehmenden Studien nur Patientinnen und Patienten mit einer zerebellären Ataxie und einer sensorischen Neuropathie der Gruppe „unvollständiges CANVAS“ zugeordnet, wohingegen in dieser Arbeit diese Gruppe auch weitere unvollständige CANVAS-Manifestationen umfasst (siehe Abschnitt 2.1.1). Außerdem ist die Gruppe mit neun Patientinnen und Patienten klein, sodass das 95% Konfidenzintervall der Häufigkeit zwischen 0 und 54% liegt.

Mittels Duplex-PCR-Screening wurde in dieser Arbeit weiterhin eine Gruppe von Individuen mit einer ILOCA untersucht, von denen 5,7% (4 von 70) als Träger/-innen der massiven biallelischen *Repeat*-Expansionen im *RFCI*-Gen identifiziert werden konnten. Von den im Rahmen dieser Arbeit insgesamt gescreenten Patientinnen und Patienten mit einer spät beginnenden zerebellären Ataxie konnten bei 21,9% (21 von 96) massive biallelische Expansionen im *RFCI*-Gen nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 3.1.1). Es finden sich in der Literatur diverse Studien, in denen die Häufigkeit der biallelischen *RFCI*-*Repeat*-Expansion in verschiedenen Ataxiekohorten erhoben wurde. Die Angaben zur Prävalenz der Mutation bei Individuen mit einer spät beginnenden zerebellären Ataxie weisen in der Literatur erhebliche Unterschiede auf und reichen von 0% bis 32,4% (siehe Tab. 32). Die in dieser Arbeit ermittelte Häufigkeit von 21,9% ist somit im Einklang mit den Daten anderer Arbeitsgruppen. Insbesondere bei Ataxiekohorten mit größtenteils europäischer Abstammung konnten zu dieser Arbeit vergleichbare Häufigkeiten beobachtet werden (Cortese *et al.*, 2019, 2020; Van Daele *et al.*, 2020). Ob sich die Prävalenzunterschiede zwischen den verschiedenen Studien allein durch die unterschiedlichen untersuchten Ethnizitäten erklären lassen, ist jedoch unklar, da die Studien uneinheitliche Einschlusskriterien, unterschiedliche Vorscreenings sowie teilweise geringe Fallzahlen aufweisen.

Sowohl in dieser Arbeit als auch in weiteren aktuellen Publikationen konnte somit bei einem hohen Anteil der Patientinnen und Patienten mit einer vollständigen CANVAS-Manifestation die neuartig beschriebene, biallelische *Repeat*-Expansion im *RFC1*-Gen nachgewiesen werden. Ein Zusammenhang zwischen der *RFC1*-*Repeat*-Expansionen und der Entstehung eines CANVAS konnte demnach auch in dieser Arbeit bestätigt werden. Bei Vorhandensein der vollständigen klinischen CANVAS-Trias sollte folglich eine genetische Abklärung der Patientinnen und Patienten erwogen werden.

Die Tatsache, dass jedoch nicht alle klinisch mit einem CANVAS diagnostizierten Individuen die Mutation aufweisen, lässt eine genetische Heterogenität des Syndroms vermuten. So konnte bereits vor Erstbeschreibung der biallelischen *RFC1*-*Repeat*-Expansion (Cortese *et al.*, 2019) bei einer britischen CANVAS-Familie mittels Exom-Sequenzierung eine *Missense*-Punktmutation (c.10G > A, p.A4T) im *E74-like factor2*-(*ELF2*)-Gen identifiziert werden (Ahmad *et al.*, 2018). Die Bedeutung dieser Mutation für die Erkrankung ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt und eine Testung der Familie auf das Vorhandensein massiver biallelischer *Repeat*-Expansionen im *RFC1*-Gen wäre anzustreben (Gisatulin *et al.*, 2020).

Massive biallelische *Repeat*-Expansionen im *RFC1*-Gen konnten sowohl in dieser Arbeit als auch in weiteren aktuellen Studien nicht nur bei einem erheblichen Teil der Individuen mit einem vollständigen CANVAS, sondern auch bei bis zu ~30% der Patientinnen und Patienten mit einer spät beginnenden zerebellären Ataxie nachgewiesen werden (Cortese *et al.*, 2019). Der aus der Mutation resultierende Phänotyp scheint somit eine gewisse Heterogenität aufzuweisen. So konnte bei Trägerinnen und Trägern der *RFC1*-*Repeat*-Expansion neben dem klinisch manifesten CANVAS (bei 63%) auch weitere klinische Ausprägungen, wie beispielsweise eine isolierte sensible Neuropathie beobachtet werden, weswegen in der aktuellen Literatur vermehrt von *RFC1*-Spektrumerkrankungen gesprochen wird (Cortese *et al.*, 2020; Träschütz *et al.*, 2021). Selbst bei Ataxiepatientinnen und -patienten, die nicht die Kriterien für ein CANVAS erfüllen, kann folglich eine genetische Testung auf biallelische Expansionen im *RFC1*-Gen erwogen werden.

Um das intronische *RFC1*-*Repeat* bei den mittels Duplex-PCR identifizierten Individuen mit massiven biallelischen *Repeat*-Expansionen bezüglich dessen Sequenz und *Repeat*-Länge zu charakterisieren, wurde in dieser Arbeit ein kombiniertes Vorgehen aus einer *Repeat*-*Primed*-PCR, Sanger-Sequenzierung und *Southern*-Blot-Analyse angewandt (siehe Abb. 2).

Hierbei konnte bei allen Individuen mit massiven biallelischen *RFC1*-Expansionen (AAGGG)_{exp}-Allele sowie bei einem Individuum zusätzlich ein (AAAGG)_{exp}-Allel nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 3.1.2). Mittels *Southern*-Blot-Analyse gelang es für die massiv expandierten Allele *Repeat*-Längen von ~800 bis 1000 *Repeats* zu ermitteln (siehe Abschnitt 3.1.3.1). In der aktuellen Literatur finden sich ähnliche Angaben bezüglich der Sequenz und Länge des *RFC1*-*Repeats* bei Individuen mit massiven biallelischen Expansionen. So konnten bei der Mehrzahl der berichteten Mutationsträger/-innen biallelische (AAGGG)-*Repeat*-Expansionen mit einer Länge von ~1000 *Repeats* (400 bis 2750 *Repeats*) nachgewiesen werden (Cortese *et al.*, 2019, 2020; Rafehi *et al.*, 2019; Aboud Syriani *et al.*, 2020; Van Daele *et al.*, 2020; Kontogeorgiou *et al.*, 2021; Çakar *et al.*, 2021). In der Literatur werden nur vereinzelt Träger/-innen massiver biallelischer Expansionen berichtet, die einen heterozygoten (AAGGG)_{exp}/(AAAGG)_{exp}-Trägerstatus aufwiesen, weswegen die Pathogenität der (AAAGG)_{exp}-Allele noch unklar ist (Rafehi *et al.*, 2019; Kontogeorgiou *et al.*, 2021). In Studien mit verschiedenen asiatischen/indopazifischen Patientenkohorten wurden weitere wahrscheinlich pathologische *RFC1*-*Repeat*-Expansionen nachgewiesen, welche die (AAAGG)₁₀₋₂₅(AAGGG)_{exp}(AAAGG)₄₋₆- und (ACAGG)-*Repeat*-Konfigurationen aufweisen (Beecroft *et al.*, 2020; Scriba *et al.*, 2020; Tsuchiya *et al.*, 2020). Bei den in dieser Arbeit untersuchten deutschen Individuen mit biallelischen Expansionen im *RFC1*-Gen konnten diese *Repeat*-Sequenzen nicht nachgewiesen werden. Dies unterstützt die in den genannten Publikationen aufgestellte Hypothese, dass es sich bei diesen *Repeat*-Konfigurationen wahrscheinlich um populationsspezifische Mutationen handle.

Bei mittels Duplex-PCR-Screening identifizierten Patientinnen und Patienten ohne massive biallelische *RFC1*-*Repeat*-Expansionen (siehe Abschnitt 3.1.1) konnten mittels *Repeat-Primed*-PCR und Sanger-Sequenzierung neben kurzen (AAAAG)-„Wildtyp“-Allelen (8 – 12 *Repeats*) auch leicht expandierte (AAAAG)-Allele (30 – 150 *Repeats*) detektiert werden. Diese wiesen bei manchen Individuen unterschiedlich lange Unterbrechungen durch *Repeats* der (AAAGG)_n-, (AGAAG)_n- oder (AAGAG)_n-Sequenz auf. In zwei Fällen ließen sich des Weiteren auch leicht expandierte (AAAGG)-*Repeats* nachweisen (siehe Abschnitt 3.1.2.2). Bei den in dieser Arbeit untersuchten Patientinnen und Patienten ohne massive biallelische *RFC1*-Expansionen konnte somit eine hohe Variabilität der *Repeat*-Sequenz beobachtet werden, welche sich auch in den Ergebnissen weiterer aktueller Studien wiederfindet. So

werden neben dem (AAAAG)₁₁-Referenzallel auch *Repeats* der (AAAAG)_{exp.-}, (AAAGG)_{exp.-}, (AAGAG)_{exp.-} und (AGAGG)_{exp.-}-Sequenz beschrieben (Akçimen *et al.*, 2019; Cortese *et al.*, 2019; Fan *et al.*, 2020; Van Daele *et al.*, 2020). Diese *Repeat*-Konfigurationen werden in den genannten Studien sowohl bei Patientinnen und -patienten mit Ataxien als auch bei gesunden Kontrollen berichtet und weisen im Durchschnitt kürzere *Repeat*-Längen auf als die pathologischen (AAGGG)-Expansionen. Aus diesen Gründen wird von den Autorinnen und Autoren dieser Arbeiten vermutet, dass es sich hierbei um nicht-pathogene „Norm“-Varianten des Wildtyp-*Repeats* handle. Die in dieser Arbeit beobachteten Unterbrechungen von (AAAAG)_{exp.-}-Allelen durch andere *Repeat*-Sequenzen wurden noch nicht in anderen Studien beschrieben. Da diese Allele nur leichte *Repeat*-Expansionen (< 150 *Repeats*) aufwiesen und der untersuchte *RFC1-Repeat*-Lokus von einer hohen Sequenz-Heterogenität gekennzeichnet ist, stellen wahrscheinlich auch diese *Repeat*-Konfigurationen nicht-pathologische Normvarianten dar. Aufschluss hierüber könnten Segregationsanalysen in verfügbaren Familienangehörigen geben. Sobald der Krankheitsmechanismus der *RFC1-Repeat*-Expansion verstanden ist, könnten überdies weitere funktionelle Untersuchungen helfen die Bedeutung dieser *Repeat*-Unterbrechungen zu beurteilen.

Zur Charakterisierung der *Repeat*-Länge von nicht-massiv expandierten Allelen bei Patientinnen und Patienten mit Ataxien sowie Kontrollen erfolgte im Rahmen dieser Arbeit eine Fragmentlängenanalyse, wobei für beide Gruppen vergleichbare *Repeat*-Längenverteilungen ermittelt werden konnten (siehe Abschnitt 3.1.3.2). Insgesamt 44% (66 von 150) der untersuchten Patientenallele sowie 51,7% (215 von 416) der Kontrollallele wiesen *Repeat*-Längen zwischen 7 und 12 *Repeats* auf, welche in dieser Arbeit als Wildtyp-Allele zusammengefasst wurden. Leichte *Repeat*-Expansionen (33 – 137 *Repeats*) konnten in 46% (69 von 150) der Patienten- und in 37,7% (157 von 416) der Kontrollallele beobachtet werden. In der Literatur werden für die Frequenz des Wildtyp-Allels sowohl bei Ataxiepatientinnen und -patienten (~63% bis ~75%) als auch bei Kontrollen (~70% bis ~85%) deutlich höhere Werte angegeben als in dieser Arbeit (Akçimen *et al.*, 2019; Cortese *et al.*, 2019; Fan *et al.*, 2020; Wan *et al.*, 2020). Wodurch diese Diskrepanz zu Stande kommt und welche Bedeutung diese Beobachtung hat, ist jedoch unklar. Möglicherweise sind die unterschiedlichen Ethnizitäten der in den Studien untersuchten Kohorten ursächlich für die beobachteten abweichenden Häufigkeiten der Allelausprägungen.

Zudem werden in den genannten Studien lediglich dem Referenzallel entsprechende Wildtyp-Allele mit einer *Repeat*-Länge von 11 *Repeats* beschrieben, wohingegen die in dieser Arbeit beobachtete Variabilität der kurzen Wildtyp-Allele (7 – 12 *Repeats*) noch nicht in der Literatur berichtet wurde. Diese Beobachtung belegt weiterhin die bereits beschriebene, hohe Längenvariabilität des untersuchten *RFC1-Repeats* in der Normalbevölkerung (Akçimen *et al.*, 2019; Cortese *et al.*, 2019; Fan *et al.*, 2020; Gisatulin *et al.*, 2020). Expandierte Allele konnten in dieser Arbeit tendenziell etwas häufiger in der Patientengruppe beobachtet werden als bei den Kontrollen. Es ließ sich jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Allelfrequenzen in den beiden Gruppen nachweisen, weswegen weitere Untersuchungen in größeren Gruppen notwendig sind.

Bei der Genotypisierung der in diese Arbeit eingeschlossenen Patientinnen und Patienten sowie Kontrollen gelang es nicht für alle Individuen die *Repeat*-Sequenz oder -länge beider untersuchten Allele zu bestimmen. Vor allem für Patientinnen und Patienten mit *RFC1-Repeat*-Expansionen konnte in manchen Fällen mittels Sanger-Sequenzierung keine eindeutig auswertbare Sequenz ermittelt werden (siehe Abschnitt 3.1.2.2). Hierbei folgte bei manchen Proben auf einen auswertbaren Sequenzabschnitt aus wenigen *Repeats* eine Zunahme des Hintergrundsignals oder eine starke Abnahme der Signalintensität, sodass die *Repeat*-Sequenz nicht eindeutig zu bewerten war. So konnten bei einigen Proben mit expandierten (AAAAG)-*Repeats* zwar Unterbrechungen der *Repeat*-Sequenz beobachtet werden, die genaue *Repeat*-Sequenz jedoch nicht mit hoher Sicherheit ermittelt werden.

In der Literatur finden sich zahlreiche Berichte über Schwierigkeiten bei der PCR-Amplifikation und Sanger-Sequenzierung langer repetitiver DNA-Abschnitte (Zhao *et al.*, 2000; Kieleczawa, 2006; Hommelsheim *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2017). So kann es bei der Vervielfältigung langer repetitiver DNA-Sequenzen vermehrt zu Fehlern der DNA-Polymerase (Polymerase-Slippage) oder zur Ausbildung von DNA-Sekundärstrukturen kommen, welche die Sanger-Sequenzierung erschweren können (Clarke *et al.*, 2001; Chintalaphani *et al.*, 2021). Des Weiteren kann es bei der Amplifikation einer langen *Repeat*-Sequenz zur Ablösung der Polymerase von dem DNA-Strang kommen, sodass kürzere PCR-Produkte entstehen (Hommelsheim *et al.*, 2014). Diese können in weiteren Amplifikationsschritten wiederum als *Primer* fungieren, sodass mehrere unterschiedlich lange PCR-Fragmente resultieren, welche potenziell sich überlagernde, nicht auswertbare Sequenzen generieren könnten (Hommelsheim *et al.*, 2014).

In manchen Fällen konnte sowohl bei der Sanger-Sequenzierung als auch bei der Fragmentlängenanalyse lediglich ein Wildtyp-Allel beobachtet werden, obwohl mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qPCR) ein heterozygoter Trägerstatus des Wildtyp-Allels nachgewiesen wurde (siehe Abschnitt 3.1.3.2). Bei beiden Methoden werden die resultierenden *Repeat*-überspannenden PCR-Produkte mittels Kapillarelektrophorese analysiert. Die Auftrennung von DNA-Fragmenten in höheren Längenbereichen (> 800 bp) ist hierbei eingeschränkt, wodurch eine genaue Längenbestimmung bei großen PCR-Produkten nicht möglich ist (Stranneheim und Lundeborg, 2012). Ob in diesen Fällen ein heterozygoter Trägerstatus eines massiv expandierten Allels (> 400 *Repeats*) oder eines nicht pathogenen leicht expandierten *Repeats* (bis ~200 *Repeats* nach Cortese *et al.*, 2019) vorliegt, kann somit mit diesen Methoden nicht beurteilt werden. Um diese Unterscheidung treffen zu können, müsste weiterhin eine *Southern-Blot*-Analyse der jeweiligen Proben erfolgen. Diese Methode ist allerdings sehr zeitaufwendig und große Mengen hochqualitativer DNA werden benötigt (Southern, 2006; Chintalaphani *et al.*, 2021). Im Rahmen dieser Arbeit lag der Fokus auf der Etablierung eines *Southern-Blot*-Protokolls zur Testung einzelner massiv expandierter Allele.

Die verwendeten Methoden weisen somit wesentliche Limitationen bei der Analyse langer repetitiver DNA-Sequenzen auf. Vielversprechende Ansätze zur Analyse der Sequenz und Länge langer *Repeat*-Expansionen stellen neue NGS-Verfahren dar, wie die *Nanopore*-Sequenzierung (Oxford Nanopore Technology) oder die *Single-Molecule-Realtime*-Sequenzierung (Pacific-Biosystems) (Kumar *et al.*, 2019; Chintalaphani *et al.*, 2021). Diese Sequenziertechniken ermöglichen die Analyse langer DNA-Fragmente auf Einzelmolekülebene (bis zu ~1-2 Mb für die *Nanopore*-Sequenzierung) und werden auch als *Long-Read-Sequencing*- oder *Third-Generation-Sequencing*-Verfahren bezeichnet (Amarasinghe *et al.*, 2020; Chintalaphani *et al.*, 2021). Bei der *Nanopore*-Sequenzierung werden bei Durchtritt von DNA-Fragmenten durch Nanoporen einer Membran Nukleotidspezifische Spannungsänderung gemessen und auf diese Weise die DNA-Sequenz ermittelt (Deamer *et al.*, 2016; Mantere *et al.*, 2019). Ein Vorteil dieser Methode insbesondere für die Sequenzierung langer repetitiver Sequenzen ist somit, dass im Gegensatz zur Sanger-Sequenzierung keine wie oben beschriebene, fehleranfällige Polymerase-vermittelte Amplifikation von DNA notwendig ist. So ist es einer Arbeitsgruppe bereits gelungen bei einem Individuum mit CANVAS die massiven biallelischen (AAGGG)-Expansionen im

RFC1-Gen mittels *Nanopore*-Sequenzierung zu sequenzieren (Nakamura *et al.*, 2020). Es wäre somit für zukünftige Analysen von Patientinnen und Patienten mit einem CANVAS sinnvoll diese Methode zur Genotypisierung zu verwenden.

4.2 Hypothesen zur Entstehung der *RFC1*-Repeat-Expansion

Um zu überprüfen, ob die massiven biallelischen *Repeat*-Expansionen im *RFC1*-Gen auf einen gemeinsamen ursprünglichen Haplotypen (Gründer- bzw. *Founder*-Mutation) zurückgeführt werden können, erfolgte im Rahmen dieser Arbeit eine Genotypisierung der Expansionsträger/-innen anhand von vier unterschiedlichen Mikrosatelliten-Markern. Hierbei konnte keine für eine *Founder*-Mutation sprechende Übereinstimmung der ermittelten Haplotypen beobachtet werden (siehe Abschnitt 3.2). Im Gegensatz dazu gelang es Cortese und Kollegen bei fast allen untersuchten Individuen mit biallelischen (AAGGG)-Expansionen einen gemeinsamen Haplotypen (47,9 kb; chr4:39318706-39366590, hg19) zu identifizieren, welcher für das Vorliegen einer *Founder*-Mutation spricht (Cortese *et al.*, 2019). In weiteren Studien konnte ebenfalls ein gemeinsamer *Founder*-Haplotyp bei Individuen mit biallelischen *RFC1*-Expansionen nachgewiesen werden (Rafehi *et al.*, 2019; Beecroft *et al.*, 2020; Nakamura *et al.*, 2020; Scriba *et al.*, 2020; Çakar *et al.*, 2021). Basierend auf der Länge des übereinstimmenden Haplotypen konnte berechnet werden, dass die Mutation wahrscheinlich vor etwa 25 000 Jahre entstanden sein muss (Rafehi *et al.*, 2019).

Zur Haplotypanalyse wurden in den genannten Studien mittels *Whole-Exome*-Sequenzierung erhobene *Single-Nucleotide*-Polymorphismen (SNPs) als Marker verwendet, im Gegensatz zu den in dieser Arbeit verwendeten Mikrosatelliten-Markern. So konnte eine größere Anzahl an Markern für die Haplotypanalyse herangezogen werden, welche eine geringere genomische Entfernung von der untersuchten *RFC1*-Repeat-Expansion aufwiesen als die in dieser Arbeit verwendeten Marker. Der auf diese Weise ermittelte *Founder*-Haplotyp umfasst je nach Studie einen genomischen Bereich von 47,9 kb bis 0,36 Mb (Cortese *et al.*, 2019; Rafehi *et al.*, 2019), wohingegen die in dieser Promotionsarbeit verwendeten Mikrosatelliten-Marker außerhalb dieses Bereiches lagen mit einer minimalen Entfernung von dem *RFC1*-Repeat von 0,7 Mb für den D4S2382-Marker. Mittels der hier gewählten Mikrosatelliten-Marker hätte, der in den Studien identifizierte *Founder*-Haplotyp somit nicht nachgewiesen werden können, weswegen es interessant wäre bei den in diese

Arbeit eingeschlossenen Patientinnen und Patienten eine Haplotypanalyse mit näher an dem *Repeat* gelegenen Markern (SNPs oder Mikrosatelliten) durchzuführen. Mit den vorliegenden Untersuchungen konnte allerdings ein nahezurückliegender *Founder*, der zu einem großen geteilten chromosomalen Abschnitt führen würde, ausgeschlossen werden.

Im Rahmen der Genotypisierung der in diese Arbeit eingeschlossenen Individuen konnte eine hohe Längenvariabilität der nicht-massiv expandierten *RFC1-Repeats* beobachtet werden (siehe Abschnitt 3.1.3.2), weswegen eine möglicherweise instabile Vererbung derartiger Allele vermutet wurde. Von anderen *Repeat*-Expansionserkrankungen, wie beispielsweise Morbus Huntington, ist bekannt, dass es insbesondere bei der Vererbung von leicht expandierten Allelen zu einer Zunahme der *Repeat*-Länge kommen kann (Trottier *et al.*, 1994; Pearson *et al.*, 2005). Durch die Vererbung instabiler *Repeat*-Allele kann es so zu einer *de novo* Entstehung pathologisch langer *Repeat*-Expansionen kommen (Paulson, 2018). Um zu untersuchen, ob auch bei dem *RFC1-Repeat* eine instabile Vererbung beobachtet werden kann, wurden im Rahmen dieser Arbeit insgesamt 101 *Repeat*-Transmissionen in 39 untersuchten Familien ausgewertet. Hierbei wiesen jedoch 91,1% der Allele ein stabiles Vererbungsmuster auf (siehe Abschnitt 3.3).

In der Literatur finden sich aktuell keine weiteren Studien, in denen die Vererbung von nicht-massiv expandierten *RFC1-Repeats* untersucht wurde. Durch einige Arbeitsgruppen konnte jedoch ein gemeinsamer *Founder*-Haplotyp bei Individuen mit massiven biallelischen *RFC1*-Expansionen nachgewiesen werden, sodass für die meisten untersuchten Expansionsträger/-innen die Entstehung der Mutation auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückgeführt werden konnte (Cortese *et al.*, 2019; Rafehi *et al.*, 2019; Beecroft *et al.*, 2020; Nakamura *et al.*, 2020; Scriba *et al.*, 2020; Çakar *et al.*, 2021). In Anbetracht dieser Ergebnisse und der hier erhobenen stabilen Vererbung des *RFC1-Repeats*, lässt sich somit schlussfolgern, dass die massiven Pentanukleotidexpansionen wahrscheinlich eher selten *de novo* aus der Expansion nicht-massiv expandierter Allele entstehen.

Ob die massiven (AAGGG)-Expansionen jedoch eine instabile Vererbung aufweisen, konnte sowohl im Rahmen dieser Arbeit als auch in weiteren Studien aufgrund mangelnder multigenerationaler Familien mit Mutationsträgerinnen und Mutationsträgern sowie den Schwierigkeiten der exakten *Repeat*-Längenbestimmung bei massiven Expansionen nicht beurteilt werden (Cortese *et al.*, 2019; Gisatulin *et al.*, 2020). Für andere Erkrankungen ist

beschrieben, dass insbesondere sehr lange *Repeat*-Expansionen eine hohe meiotische und somatische Instabilität aufweisen (Paulson, 2018), sodass zukünftig weitere Untersuchungen zur Beurteilung der Instabilität von massiven *RFC1-Repeat*-Expansionen notwendig sind.

4.3 Molekularer Mechanismus der *RFC1-Repeat*-Expansion

Repeat-Expansionen können mittels unterschiedlicher molekularer Mechanismen zur Krankheitsentstehung führen, welche prinzipiell zu einem Funktionsverlust (*Loss-of-function*, LOF) oder einem toxischen Funktionsgewinn (*Gain-of-function*, GOF) des betroffenen Gens führen können (Malik *et al.*, 2021). *Repeat*-Expansionserkrankungen, bei denen eine LOF des Genproduktes beschrieben ist, wie beispielsweise die Friedreich-Ataxie oder die Progressive Myoklonusepilepsie Typ 1, weisen typischerweise einen autosomal-rezessiven Erbgang auf (Paulson, 2018). Verschiedene LOF-Mechanismen von *Repeat*-Expansionen sind bereits bekannt und umfassen unter anderem epigenetische Veränderungen (z. B. DNA-Hypermethylierung) oder die Ausbildung von DNA/RNA-Sekundärstrukturen (R-Loops), welche in einer verminderten Transkription des jeweiligen Gens resultieren (Depienne und Mandel, 2021).

Da das CANVAS ein autosomal-rezessives Vererbungsmuster aufweist, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine LOF des *RFC1*-Gens vermutet, weswegen bei Individuen mit massiven biallelischen *RFC1*-Expansionen mittels quantitativer Echtzeit-PCR eine Expressionsanalyse erfolgte. Auf Transkriptebene konnten hierbei jedoch keine verminderten *RFC1*- oder *WDR19*-Expressionslevel in venösem Blut nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 3.4.1). Dieses Ergebnis ist im Einklang mit den Resultaten der durch Cortese *et al.* durchgeführten Expressionsanalysen (Cortese *et al.*, 2019). Weder in Blut-Lymphoblasten noch in Fibroblasten, Neuronen des frontalen Kortex oder des Zerebellums von Individuen mit biallelischen *RFC1*-Pentanukleotidexpansionen konnten hier verminderte *RFC1*-Expressionslevel auf sowohl mRNA- als auch Proteinebene nachgewiesen werden. Ähnlich wie in dieser Arbeit, wurde weiterhin kein eindeutiger Effekt der *RFC1*-Expansion auf die Expression von sowohl benachbarten als auch entfernten Genen beobachtet (Cortese *et al.*, 2019). Nach dem aktuellen Stand der Forschung ist somit kein direkter LOF-Mechanismus der biallelischen *RFC1*-Expansionen nachzuweisen. Einschränkend ist jedoch zu bemerken, dass sowohl in dieser Promotionsarbeit als auch in der betrachteten Studie insgesamt nur wenige Expansionsträger/-innen untersucht wurden (jeweils maximal

5 Patientinnen und Patienten). Folglich ist es aufgrund der kleinen Fallzahlen möglich, dass geringe Veränderungen der Expressionslevel nicht erfasst wurden.

Neben einer verminderten Genexpression sind bei verschiedenen *Repeat*-Expansionserkrankungen auch weitere pathogene molekulare Mechanismen bekannt. So können *Repeat*-Expansionen zu einer fehlerhaften RNA-Prozessierung führen, wie beispielsweise einer Intron-Retention oder einer frühzeitigen Polyadenylierung von mRNA (Sznajder *et al.*, 2018; Malik *et al.*, 2021). Die Retention eines *Repeat*-Expansion-beinhaltenen Introns wurde bereits bei unterschiedlichen Erkrankungen, wie der Myotonen Dystrophie Typ 2 oder der Amyotrophen Lateralsklerose beschrieben und kann unter anderem zu einer toxischen RNA-Akkumulation im Zellkern führen (Niblock *et al.*, 2016; Sznajder und Swanson, 2019). Weiterhin kann es bei Transport ins Zytoplasma zur Translation der *Repeat*-Sequenz und zu einem Anfall zytotoxischer Proteine kommen (Malik *et al.*, 2021). Mittels PCR-Amplifikation eines den Übergang von Exon 2 zu Exon 3 des *RFC1*-Gens überspannenden cDNA-Abschnittes, konnte im Rahmen dieser Arbeit bei Individuen mit massiven biallelischen *RFC1*-*Repeat*-Expansionen jedoch keine Retention des betroffenen zweiten Introns nachgewiesen werden. Weiterhin ließen sich bei den hier untersuchten Individuen mittels Sanger-Sequenzierung keine Spleißalterationen, wie beispielsweise das Überspringen von Exons in den ersten neun Exons der *RFC1*-mRNA beobachten (siehe Abschnitt 3.4.2). Auch Cortese *et al.* konnten in reifer *RFC1*-mRNA weder eine Intron-Retention noch weitere Spleißveränderungen beobachten (Cortese *et al.*, 2019). Bei der Analyse unreifer *RFC1*-prä-mRNA mittels quantitativer Echtzeit-PCR konnte hingegen in unterschiedlichen Geweben (Lymphoblasten, Muskel, frontaler Kortex, Zerebellum) eine Retention des betroffenen zweiten Introns nachgewiesen werden (Cortese *et al.*, 2019). Die Bedeutung einer möglichen Intron-Retention für den molekularen Pathomechanismus des CANVAS ist somit noch unklar und erfordert weiterer Erforschung an einer größeren Anzahl von Proben.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es die mit der Entstehung des *Cerebellar Ataxia with Neuropathy and bilateral vestibular Areflexia Syndrome* (CANVAS) in Zusammenhang gebrachte biallelische (AAGGG)-*Repeat*-Expansion in dem *Replication Factor C Subunit 1* (*RFC1*)-Gen in einer Gruppe von Patientinnen und Patienten mit unterschiedlichen Ataxieformen zu validieren und molekulargenetisch zu charakterisieren. Insgesamt wurden 457 Individuen genetisch untersucht. Darunter befanden sich 26 Individuen mit einem klinisch vollständigen oder unvollständigen CANVAS, 70 Individuen mit einer idiopathischen spät beginnenden zerebellären Ataxie (ILOCA) sowie 208 Kontrollen. 153 Individuen aus 39 Familien wurden zur Untersuchung der intergenerationalen *Repeat*-Stabilität eingeschlossen.

Alle Patientinnen und Patienten wurden mittels Duplex-PCR auf das Vorliegen massiver biallelischer *RFC1-Repeat*-Expansionen getestet. Mittels *Repeat-Primed*-PCR, Sanger-Sequenzierung, Fragmentlängenanalyse sowie *Southern*-Blot erfolgte die Charakterisierung der *Repeat*-Sequenz und -Länge. Die Haplotypanalyse der Expansionsträger/-innen erfolgte anhand von Mikrosatelliten-Markern. Die Expression des *RFC1*- und des 5'-benachbarten *WDR19*-Gens wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR analysiert.

Insgesamt 88% (15/17) der Individuen mit vollständigem CANVAS, 22% (2/9) der Individuen mit unvollständigem CANVAS sowie 6% (4/70) der Individuen mit ILOCA konnten als Träger/-innen massiver biallelischer *Repeat*-Expansionen im *RFC1*-Gen identifiziert werden. Für die massiv expandierten *RFC1*-Allele konnte eine Länge von 800-1000 *Repeats* und in der Mehrzahl eine (AAGGG)_n-Sequenz nachgewiesen werden. Nicht-massiv expandierte Allele wiesen Längen von 7-137 *Repeats* sowie ein relativ stabiles Vererbungsmuster auf. Es konnte kein gemeinsamer *Founder*-Haplotyp bei Individuen mit massiven biallelischen *RFC1*-Expansionen nachgewiesen werden. Weder verminderte *RFC1*- und *WDR19*-Expressionslevel noch eine Retention des *Repeat*-beinhaltenden Introns konnte bei Mutationsträgerinnen und Mutationsträgern detektiert werden (Gisatulin *et al.*, 2020).

Zusammenfassend stellen massive biallelische *Repeat*-Expansionen im *RFC1*-Gen eine häufige genetische Ursache des CANVAS dar und können in einer bemerkenswerten Anzahl von Individuen mit unterschiedlichen spät beginnenden zerebellären Ataxieformen gefunden werden. Der Pathomechanismus über welchen die *Repeat*-Expansion die Krankheit verursacht, ist allerdings nach wie vor unklar und erfordert weitere Analysen.

6 Literaturverzeichnis

Aboud Syriani D, Wong D, Andani S, De Gusmao CM, Mao Y, Sanyoura M, Glotzer G, Lockhart PJ, Hassin-Baer S, Khurana V, Gomez CM, Perlman S, Das S, Fogel BL (2020) Prevalence of RFC1-mediated spinocerebellar ataxia in a North American ataxia cohort. *Neurol Genet* 6: 440.

Ade C, Roy-Engel AM, Deininger PL (2013) Alu elements: an intrinsic source of human genome instability. *Curr Opin Virol* 3: 639–645.

Ahmad H, Requena T, Frejo L, Cobo M, Gallego-Martinez A, Martin F, Lopez-Escamez JA, Bronstein AM (2018) Clinical and Functional Characterization of a Missense ELF2 Variant in a CANVAS Family. *Front Genet* 9: 85.

Akbar U, Ashizawa T (2015) Ataxia. *Neurol Clin* 33: 225–248.

Akçimen F, Ross JP, Bourassa CV, Liao C, Rochefort D, Gama MTD, Dicaire M-J, Barsottini OG, Brais B, Pedroso JL, Dion PA, Rouleau GA (2019) Investigation of the RFC1 Repeat Expansion in a Canadian and a Brazilian Ataxia Cohort: Identification of Novel Conformations. *Front Genet* 10: 1219.

Amarasinghe SL, Su S, Dong X, Zappia L, Ritchie ME, Gouil Q (2020) Opportunities and challenges in long-read sequencing data analysis. *Genome Biol* 21: 30.

Anheim M, Tranchant C, Koenig M (2012) The autosomal recessive cerebellar ataxias. *N Engl J Med* 366: 636–646.

Arnemann J (2019) DNA-/RNA-Konzentrationsbestimmung. In: Gressner AM, Arndt T (Hrsg.): Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik. 719–719, Springer, Berlin.

Ashizawa T, Xia G (2016) Ataxia. *Continuum (Minneap Minn)* 22: 1208–1226.

Beaudin M, Matilla-Dueñas A, Soong B-W, Pedroso JL, Barsottini OG, Mitoma H, Tsuji S, Schmahmann JD, Manto M, Rouleau GA, Klein C, Dupre N (2019) The Classification of Autosomal Recessive Cerebellar Ataxias: a Consensus Statement from the Society for Research on the Cerebellum and Ataxias Task Force. *Cerebellum* 18: 1098–1125.

Beecroft SJ, Cortese A, Sullivan R, Yau WY, Dyer Z, Wu TY, Mulroy E, Pelosi L, Rodrigues M, Taylor R, Mossman S, Leadbetter R, Cleland J, Anderson T, Ravenscroft G, Laing NG, Houlden H, Reilly MM, Roxburgh RH (2020) A Māori specific RFC1 pathogenic repeat configuration in CANVAS, likely due to a founder allele. *Brain* 143: 2673–2680.

Bürk K (2016) Ataxien. In: Hacke W (Hrsg.): Neurologie. 14. Aufl., 625–643, Springer, Berlin.

Burke D, Halmagyi GM (2018) Normal tendon reflexes despite absent sensory nerve action potentials in CANVAS: a neurophysiological study. *J Neurol Sci* 387: 75–79.

Çakar A, Şahin E, Tezel S, Candayan A, Samancı B, Battaloğlu E, Başak AN, Bilgiç B, Hanağası H, Durmuş H, Parman Y (2021) Cerebellar ataxia, neuropathy and vestibular areflexia syndrome (canvas): an important cause of late-onset ataxia with unique clinical features. *Acta Neurol Belg* [Online-Vorveröffentlichung].

Cazzato D, Bella ED, Dacci P, Mariotti C, Lauria G (2016) Cerebellar ataxia, neuropathy, and vestibular areflexia syndrome: a slowly progressive disorder with stereotypical presentation. *J Neurol* 263: 245–249.

Chhetri SK, Gow D, Shaunak S, Varma A (2014) Clinical assessment of the sensory ataxias; diagnostic algorithm with illustrative cases. *Pract Neurol* 14: 242–251.

Chintalaphani SR, Pineda SS, Deveson IW, Kumar KR (2021) An update on the neurological short tandem repeat expansion disorders and the emergence of long-read sequencing diagnostics. *Acta Neuropathol Commun* 9: 98.

Clarke LA, Rebelo CS, Gonçalves J, Boavida MG, Jordan P (2001) PCR amplification introduces errors into mononucleotide and dinucleotide repeat sequences. *Mol Pathol* 54: 351–353.

Cortese A, Simone R, Sullivan R, Vandrovcova J, Tariq H, Yau WY, Humphrey J, Jaunmuktane Z, Sivakumar P, Polke J, Ilyas M, Tribollet E, Tomaselli PJ, Devigili G, Callegari I, Versino M, Salpietro V, Efthymiou S, Kaski D, Wood NW, Andrade NS, Buglo E, Rebelo A, Rossor AM, Bronstein A, Fratta P, Marques WJ, Züchner S, Reilly MM, Houlden H (2019) Biallelic expansion of an intronic repeat in RFC1 is a common cause of late-onset ataxia. *Nat Genet* 51: 649–658.

Cortese A, Tozza S, Yau WY, Rossi S, Beecroft SJ, Jaunmuktane Z, Dyer Z, Ravenscroft G, Lamont PJ, Mossman S, Chancellor A, Maisonnobe T, Pereon Y, Cauquil C, Colnaghi S, Mallucci G, Curro R, Tomaselli PJ, Thomas-Black G, Sullivan R, Efthymiou S, Rossor AM, Laurá M, Pipis M, Horga A, Polke J, Kaski D, Horvath R, Chinnery PF, Marques W, Tassorelli C, Devigili G, Leonardi L, Wood NW, Bronstein A, Giunti P, Züchner S, Stojkovic T, Laing N, Roxburgh RH, Houlden H, Reilly MM (2020) Cerebellar ataxia, neuropathy, vestibular areflexia syndrome due to RFC1 repeat expansion. *Brain* 143: 480–490.

Deamer D, Akeson M, Branton D (2016) Three decades of nanopore sequencing. *Nat Biotechnol* 34: 518–524.

Depienne C, Mandel J-L (2021) 30 years of repeat expansion disorders: What have we learned and what are the remaining challenges? *Am J Hum Genet* 108: 764–785.

Di Donato S, Gellera C, Mariotti C (2001) The complex clinical and genetic classification of inherited ataxias. II. Autosomal recessive ataxias. *Neurol Sci* 22: 219–228.

Diem R, Hacke W, Schwab S, Steiner T, Strupp M (2016) Die neurologische Untersuchung und die wichtigsten Syndrome. In: Hacke W (Hrsg.): Neurologie. 14. Aufl., 3–81, Springer, Berlin.

Dominik N, Galassi Deforie V, Cortese A, Houlden H (2021) CANVAS: a late onset ataxia due to biallelic intronic AAGGG expansions. *J Neurol* 268: 1119–1126.

- Dupré M, Hermann R, Froment Tilikete C (2020) Update on Cerebellar Ataxia with Neuropathy and Bilateral Vestibular Areflexia Syndrome (CANVAS). *Cerebellum* [Online-Vorveröffentlichung].
- Fan Y, Zhang S, Yang J, Mao C-Y, Yang Z-H, Hu Z-W, Wang Y-L, Liu Y-T, Liu H, Yuan Y-P, Shi C-H, Xu Y-M (2020) No biallelic intronic AAGGG repeat expansion in RFC1 was found in patients with late-onset ataxia and MSA. *Parkinsonism Relat Disord* 73: 1–2.
- Gisatulin M, Dobricic V, Zühlke C, Hellenbroich Y, Tadic V, Münchau A, Isenhardt K, Bürk K, Bahlo M, Lockhart PJ, Lohmann K, Helmchen C, Brüggemann N (2020) Clinical spectrum of the pentanucleotide repeat expansion in the RFC1 gene in ataxia syndromes. *Neurology* 95: 2912–2923.
- Gymrek M (2017) A genomic view of short tandem repeats. *Curr Opin Genet Dev* 44: 9–16.
- Hersheson J, Haworth A, Houlden H (2012) The inherited ataxias: genetic heterogeneity, mutation databases, and future directions in research and clinical diagnostics. *Hum Mutat* 33: 1324–1332.
- Hommelsheim CM, Frantzeskakis L, Huang M, Ülker B (2014) PCR amplification of repetitive DNA: a limitation to genome editing technologies and many other applications. *Sci Rep* 4: 5052.
- Infante J, García A, Serrano-Cárdenas KM, González-Aguado R, Gazulla J, de Lucas EM, Berciano J (2018) Cerebellar ataxia, neuropathy, vestibular areflexia syndrome (CANVAS) with chronic cough and preserved muscle stretch reflexes: evidence for selective sparing of afferent Ia fibres. *J Neurol* 265: 1454–1462.
- Kieleczawa J (2006) Fundamentals of Sequencing of Difficult Templates—An Overview. *J Biomol Tech* 17: 207–217.
- Klockgether T (2010) Sporadic ataxia with adult onset: classification and diagnostic criteria. *Lancet Neurol* 9: 94–104.
- Klockgether T, Mariotti C, Paulson HL (2019) Spinocerebellar ataxia. *Nat Rev Dis Primers* 5: 24.
- Kontogeorgiou Z, Kartanou C, Tsirligkani C, Anagnostou E, Rentzos M, Stefanis L, Karadima G, Koutsis G (2021) Biallelic RFC1 pentanucleotide repeat expansions in Greek patients with late-onset ataxia. *Clin Genet* 100: 90–94.
- Kumar KR, Cowley MJ, Davis RL (2019) Next-Generation Sequencing and Emerging Technologies. *Semin Thromb Hemost* 45: 661–673.
- Kuo S-H (2019) Ataxia. *Continuum (Minneap Minn)* 25: 1036–1054.
- Liu Q, Zhang P, Wang D, Gu W, Wang K (2017) Interrogating the “unsequenceable” genomic trinucleotide repeat disorders by long-read sequencing. *Genome Med* 9: 65.
- Malik I, Kelley CP, Wang ET, Todd PK (2021) Molecular mechanisms underlying nucleotide repeat expansion disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 22: 589–607.

- Mantere T, Kersten S, Hoischen A (2019) Long-Read Sequencing Emerging in Medical Genetics. *Front Genet* 10: 426.
- Manto M, Gandini J, Feil K, Strupp M (2020) Cerebellar ataxias: an update. *Curr Opin Neurol* 33: 150–160.
- Mariotti C, Fancellu R, Di Donato S (2005) An overview of the patient with ataxia. *J Neurol* 252: 511–518.
- Marsden JF (2018) Cerebellar ataxia. *Handb Clin Neurol* 159: 261–281.
- McInerney P, Adams P, Hadi MZ (2014) Error Rate Comparison during Polymerase Chain Reaction by DNA Polymerase. *Mol Biol Int* 2014: 287430.
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335–350.
- Nakamura H, Doi H, Mitsuhashi S, Miyatake S, Katoh K, Frith MC, Asano T, Kudo Y, Ikeda T, Kubota S, Kunii M, Kitazawa Y, Tada M, Okamoto M, Joki H, Takeuchi H, Matsumoto N, Tanaka F (2020) Long-read sequencing identifies the pathogenic nucleotide repeat expansion in RFC1 in a Japanese case of CANVAS. *J Hum Genet* 65: 475–480.
- Niblock M, Smith BN, Lee Y-B, Sardone V, Topp S, Troakes C, Al-Sarraj S, Leblond CS, Dion PA, Rouleau GA, Shaw CE, Gallo J-M (2016) Retention of hexanucleotide repeat-containing intron in C9orf72 mRNA: implications for the pathogenesis of ALS/FTD. *Acta Neuropathol Commun* 4: 18.
- Paulson H (2018) Repeat expansion diseases. *Handb Clin Neurol* 147: 105–123.
- Paulson HL, Shakkottai VG, Clark HB, Orr HT (2017) Polyglutamine spinocerebellar ataxias - from genes to potential treatments. *Nat Rev Neurosci* 18: 613–626.
- Pearson CE, Nichol Edamura K, Cleary JD (2005) Repeat instability: mechanisms of dynamic mutations. *Nat Rev Genet* 6: 729–742.
- Rafehi H, Szmulewicz DJ, Bennett MF, Sobreira NLM, Pope K, Smith KR, Gillies G, Diakumis P, Dolzhenko E, Eberle MA, Barcina MG, Breen DP, Chancellor AM, Cremer PD, Delatycki MB, Fogel BL, Hackett A, Halmagyi GM, Kapetanovic S, Lang A, Mossman S, Mu W, Patrikios P, Perlman SL, Rosemergy I, Storey E, Watson SRD, Wilson MA, Zee DS, Valle D, Amor DJ, Bahlo M, Lockhart PJ (2019) Bioinformatics-Based Identification of Expanded Repeats: A Non-reference Intronic Pentamer Expansion in RFC1 Causes CANVAS. *Am J Hum Genet* 105: 151–165.
- Rainen L, Oelmueller U, Jurgensen S, Wyrich R, Ballas C, Schram J, Herdman C, Bankaitis-Davis D, Nicholls N, Trollinger D, Tryon V (2002) Stabilization of mRNA expression in whole blood samples. *Clin Chem* 48: 1883–1890.
- Rossi M, Anheim M, Durr A, Klein C, Koenig M, Synofzik M, Marras C, van de Warrenburg BP, International Parkinson and Movement Disorder Society Task Force on Classification and Nomenclature of Genetic Movement Disorders (2018) The genetic nomenclature of recessive cerebellar ataxias. *Mov Disord* 33: 1056–1076.

- Ruano L, Melo C, Silva MC, Coutinho P (2014) The global epidemiology of hereditary ataxia and spastic paraplegia: a systematic review of prevalence studies. *Neuroepidemiology* 42: 174–183.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350–1354.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463–5467.
- Scriba CK, Beecroft SJ, Clayton JS, Cortese A, Sullivan R, Yau WY, Dominik N, Rodrigues M, Walker E, Dyer Z, Wu TY, Davis MR, Chandler DC, Weisburd B, Houlden H, Reilly MM, Laing NG, Lamont PJ, Roxburgh RH, Ravenscroft G (2020) A novel RFC1 repeat motif (ACAGG) in two Asia-Pacific CANVAS families. *Brain* 143: 2904–2910.
- Southern E (2006) Southern blotting. *Nat Protoc* 1: 518–525.
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503–517.
- Stoyas CA, La Spada AR (2018) The CAG-polyglutamine repeat diseases: a clinical, molecular, genetic, and pathophysiologic nosology. *Handb Clin Neurol* 147: 143–170.
- Stranneheim H, Lundeberg J (2012) Stepping stones in DNA sequencing. *Biotechnol J* 7: 1063–1073.
- Sullivan R, Yau WY, O'Connor E, Houlden H (2019) Spinocerebellar ataxia: an update. *J Neurol* 266: 533–544.
- Synofzik M, Németh AH (2018) Recessive ataxias. *Handb Clin Neurol* 155: 73–89.
- Szmulewicz DJ, McLean CA, MacDougall HG, Roberts L, Storey E, Halmagyi GM (2014a) CANVAS an update: clinical presentation, investigation and management. *J Vestib Res* 24: 465–474.
- Szmulewicz DJ, McLean CA, Rodriguez ML, Chancellor AM, Mossman S, Lamont D, Roberts L, Storey E, Halmagyi GM (2014b) Dorsal root ganglionopathy is responsible for the sensory impairment in CANVAS. *Neurology* 82: 1410–1415.
- Szmulewicz DJ, Merchant SN, Halmagyi GM (2011a) Cerebellar ataxia with neuropathy and bilateral vestibular areflexia syndrome (CANVAS): a histopathologic case report. *Otol Neurotol* 32: e63–e65.
- Szmulewicz DJ, Roberts L, McLean CA, MacDougall HG, Halmagyi GM, Storey E (2016) Proposed diagnostic criteria for cerebellar ataxia with neuropathy and vestibular areflexia syndrome (CANVAS). *Neurol Clin Pract* 6: 61–68.
- Szmulewicz DJ, Waterston JA, Halmagyi GM, Mossman S, Chancellor AM, McLean CA, Storey E (2011b) Sensory neuropathy as part of the cerebellar ataxia neuropathy vestibular areflexia syndrome. *Neurology* 76: 1903–1910.

Szmulewicz DJ, Waterston JA, MacDougall HG, Mossman S, Chancellor AM, McLean CA, Merchant S, Patrikios P, Halmagyi GM, Storey E (2011c) Cerebellar ataxia, neuropathy, vestibular areflexia syndrome (CANVAS): a review of the clinical features and video-oculographic diagnosis. *Ann N Y Acad Sci* 1233: 139–147.

Sznajder ŁJ, Swanson MS (2019) Short Tandem Repeat Expansions and RNA-Mediated Pathogenesis in Myotonic Dystrophy. *Int J Mol Sci* 20: 3365.

Sznajder ŁJ, Thomas JD, Carrell EM, Reid T, McFarland KN, Cleary JD, Oliveira R, Nutter CA, Bhatt K, Sobczak K, Ashizawa T, Thornton CA, Ranum LPW, Swanson MS (2018) Intron retention induced by microsatellite expansions as a disease biomarker. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115: 4234–4239.

Traschütz A, Cortese A, Reich S, Dominik N, Faber J, Jacobi H, Hartmann AM, Rujescu D, Montaut S, Echaniz-Laguna A, Erer S, Schütz VC, Tarnutzer AA, Sturm M, Haack TB, Vaucamps-Diedhiou N, Puccio H, Schöls L, Klockgether T, van de Warrenburg BP, Paucar M, Timmann D, Hilgers R-D, Gazulla J, Strupp M, Moris G, Filla A, Houlden H, Anheim M, Infante J, Basak AN, Synofzik M, RFC1 Study Group (2021) Natural History, Phenotypic Spectrum, and Discriminative Features of Multisystemic RFC1 Disease. *Neurology* 96: 1369–1382.

Trottier Y, Biancalana V, Mandel JL (1994) Instability of CAG repeats in Huntington's disease: relation to parental transmission and age of onset. *J Med Genet* 31: 377–382.

Tsuchiya M, Nan H, Koh K, Ichinose Y, Gao L, Shimozone K, Hata T, Kim Y-J, Ohtsuka T, Cortese A, Takiyama Y (2020) RFC1 repeat expansion in Japanese patients with late-onset cerebellar ataxia. *J Hum Genet* 65: 1143–1147.

Van Daele SH, Vermeer S, Van Eesbeeck A, Lannoo L, Race V, van Damme P, Claeys K, Vandenberghe W (2020) Diagnostic yield of testing for RFC1 repeat expansions in patients with unexplained adult-onset cerebellar ataxia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 91: 1233–1234.

Wan L, Chen Z, Wan N, Liu M, Xue J, Chen H, Zhang Y, Peng Y, Tang Z, Gong Y, Yuan H, Wang S, Deng Q, Hou X, Wang C, Peng H, Shi Y, Peng L, Lei L, Duan R, Xia K, Qiu R, Shen L, Tang B, Ashizawa T, Jiang H (2020) Biallelic Intronic AAGGG Expansion of RFC1 is Related to Multiple System Atrophy. *Ann Neurol* 88: 1132–1143.

Wessel K, Weiland T (2020a) Degenerative Ataxien. In: Berlit P (Hrsg.): Klinische Neurologie. 4. Aufl., 1395–1406, Springer, Berlin.

Wessel K, Weiland T (2020b) Symptomatische Ataxien. In: Berlit P (Hrsg.): Klinische Neurologie. 4. Aufl., 1407–1411, Springer, Berlin.

Wu TY, Taylor JM, Kilfoyle DH, Smith AD, McGuinness BJ, Simpson MP, Walker EB, Bergin PS, Cleland JC, Hutchinson DO, Anderson NE, Snow BJ, Anderson TJ, Paermentier LAF, Cutfield NJ, Chancellor AM, Mossman SS, Roxburgh RH (2014) Autonomic dysfunction is a major feature of cerebellar ataxia, neuropathy, vestibular areflexia „CANVAS“ syndrome. *Brain* 137: 2649–2656.

Zhao X, Haqqi T, Yadav S (2000) Sequencing telomeric DNA template with short tandem repeats using dye terminator cycle sequencing. *J Biomol Tech* 11: 111–121.

7 Anhang

7.1 Votum der Ethikkommission

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen am Menschen lag ein positives Votum der Ethikkommission der Universität zu Lübeck für folgende Anträge vor:

„Molekulargenetische Ursachen der Ataxie“, Aktenzeichen: 07-130, Genehmigungsschreiben: 07.11.2007.

„Identifizierung neuer Gene bei Bewegungsstörungen mittels „next generation sequencing““, Aktenzeichen: 11-021, Genehmigungsschreiben: 20.05.2011.

„Systemphysiologie bei seltenen Bewegungsstörungen am Beispiel der spinocerebellären Ataxien“, Aktenzeichen: 16-068, Genehmigungsschreiben: 26.05.2016.

7.2 Klinische Informationen zu den eingeschlossenen CANVAS-Familien

In dieser Arbeit wurden zwei Familien (LUE_01 und LUE_02) mit je zwei an CANVAS erkrankten Geschwisterpaaren genetisch untersucht (siehe Abschnitt 2.1.1). In dem folgenden Abschnitt werden nähere klinische Beschreibungen dieser Familien aufgeführt. Die Erhebung der Krankengeschichten sowie die klinisch-neurologische Untersuchung der Familien erfolgte vor Beginn dieser Arbeit durch erfahrene Ärztinnen und Ärzte (Prof. Dr. med. Christoph Helmchen; Dr. med. Vera Tadic; Prof. Dr. med. Alexander Münchau; Prof. Dr. med. Norbert Brüggemann) der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck. Die im Folgenden geschilderten Anamnesen und klinischen Untersuchungsbefunde sind übersetzt nach den in der Publikation von Gisatulin *et al.* aufgeführten Kasuistiken (Gisatulin *et al.*, 2020).

7.2.1 Familie LUE_01

Die Indexpatientin (L-11178, siehe Abb. 17) der Familie LUE_01 war eine 82-jährige Patientin, welche mit einer seit 10 Jahren bestehenden, progressiven Gangunsicherheit und einer seit etwa 20 Jahren andauernden Hörminderung vorstellig wurde. Der klinisch-neurologische Befund, drei Jahre nach Einsetzen der Gangunsicherheit, ergab bei der Untersuchung der Hirnnerven omnidirektional sakkadische Augenbewegungen, einen horizontal-rotierenden Spontannystagmus, eine Dysarthrie, eine bilaterale Hypakusis und einen beidseits beeinträchtigten Vestibulo-okulären-Reflex (VOR) im Kopfpulstest. Bei der Testung der Muskeleigenreflexe fiel ein beidseits fehlender Achillessehnenreflex auf. Die Untersuchung der Sensorik ergab ein bimelleolär herabgesetztes Vibrationsempfinden (5/8), einen beeinträchtigten Lagesinn sowie eine verringerte Zwei-Punkt-Diskrimination. Die Untersuchung der Zielmotorik zeigte einen kinetischen Handtremor. Bei der Gang- und Standbeurteilung fiel eine deutliche Ataxie mit breitbasigem Gangbild und eine ausgeprägte posturale Instabilität mit einer spontanen Sturzneigung auf. Im Krankheitsverlauf verlor die Patientin die Fähigkeit zu gehen und war nur noch mit dem Rollstuhl mobil.

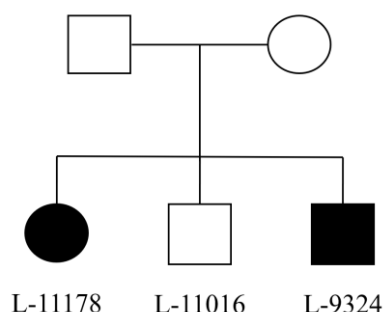


Abb. 17 Stammbaum der Familie LUE_01.

Schwarz gekennzeichnete Symbole markieren an CANVAS erkrankte Individuen. Weibliche Individuen sind als Kreise, männliche als Vierecke dargestellt. Bei genetisch untersuchten Individuen ist die laborinterne Identifikationsnummer (L-Nummer) angegeben. CANVAS – *Cerebellar Ataxia with Neuropathy and bilateral vestibular Areflexia Syndrome*; L-Nummer – Laborinterne Identifikationsnummer.

Der 74-jährige Bruder (L-9324, siehe Abb. 17) der Indexpatientin war ein ehemaliger Fahrzeugführer mit seit etwa 13 Jahren bestehendem Schwindel beim Stehen und Gehen und einer resultierenden Gangunsicherheit. Der Schwindel war begleitet von der Unfähigkeit Objekte mit den Augen zu fixieren und von Oszillopsien während der Fortbewegung und dem Ausführen schneller Kopfbewegungen. Es bestand eine zunehmende Beeinträchtigung der Feinmotorik mit einer zunehmend unleserlichen Handschrift. Der klinisch-neurologischen Befund, zwei Jahre nach Krankheitsbeginn, ergab bei der Untersuchung der

Hirnnerven sakkadische Augenbewegungen, hypometrische horizontale Sakkaden mit einer normalen Geschwindigkeit, einen horizontal-rotierenden Spontannystagmus und einen bilateral stark reduzierten VOR im Kopfpulstest. Die Überprüfung der Muskeigenreflexe zeigte einen bilateral verminderten Patellar- und Achillessehnenreflex. Bei der Untersuchung der Sensorik fiel beidseits eine strumpfartige Hypästhesie der unteren Extremität und ein bimelleolär abwesendes Vibrationsempfinden (0/8) auf. Die Überprüfung der Zielmotorik ergab bilateral einen pathologischen Finger-Finger- und Finger-Nase-Versuch mit linksseitig stärkerer Ausprägung sowie eine linksseitige Dysdiadochokinese. Die Gang- und Standuntersuchung zeigte eine moderate Ataxie mit einer Unfähigkeit den Seiltänzerengang auszuführen.

Im Krankheitsverlauf kam es zu einer Progression der Hypästhesie der unteren Extremität, sowie der Stand- und Gangataxie. Der Patient entwickelte eine Dysarthrie, einen Blickrichtungsnystagmus, eine gestörte Suppression des VOR, eine Hypalgesie, eine Thermohypästhesie der unteren Extremität und einen positiven Romberg-Versuch. Anamnestisch gab der Patient keine auf eine autonome Dysfunktion hinweisenden Symptome an, obwohl der Schellong-Test eine abnormale orthostatische Regulation anzeigte.

Die Krankengeschichte und neurologische Untersuchung eines weiteren, 80-jährigen Bruders (L-11016, siehe Abb. 17) der Index-Patienten war unauffällig. Im Rahmen dieser Arbeit konnten bei ihm keine massiven biallelischen *Repeat*-Expansionen im *RFC1*-Gen nachgewiesen werden.

7.2.2 Familie LUE_02

Der Indexpatient (L-10167, siehe Abb. 18) war ein 62-jähriger Mann mit einer seit 7 Jahren langsam fortschreitenden Gangunsicherheit. Laut Angabe des Patienten, beobachtete der Hausarzt schon im Alter von 50 Jahren eine Standunsicherheit. Bei Vorstellung gab der Patient Schwindel während schneller Körper- und Kopfbewegungen an. Der klinisch-neurologische Befund ergab bei der Untersuchung der Hirnnerven auffällige sakkadische Augenbewegungen linksseitig und einen bilateral pathologische VOR im Kopfpulstest. Im Krankheitsverlauf entwickelte der Patient zusätzlich einen Down-beat-Nystagmus.

Bei der Überprüfung der Muskeleigenreflexe zeigte sich ein linksseitig reduzierter Tricepssehnenreflex sowie ein beidseits leicht abgeschwächter Achillessehnenreflex. Die Untersuchung der Sensorik zeigte eine bimelleoläre Beeinträchtigung des Vibrationsempfindens und eine Hypästhesie des C6-Dermatoms links (wahrscheinlich als Folge einer vorherigen zervikalen Bandscheibenprotrusion). Die Beurteilung von Stand und Gang zeigte eine leicht erhöhte Variabilität der Schrittlänge und eine leichte Gleichgewichtsstörung während schnellen Drehmanövern. Beim Romberg-Stehversuch zeigte sich eine leichte Zunahme der posturalen Ataxie.

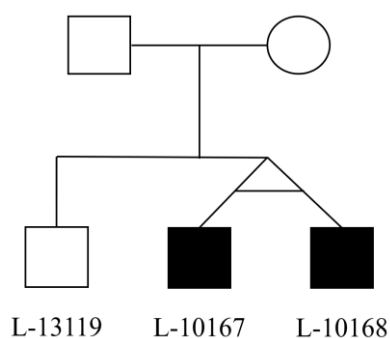


Abb. 18 Stammbaum der Familie LUE_02.

Schwarz gekennzeichnete Symbole markieren an CANVAS erkrankte Individuen. Weibliche Individuen sind als Kreise, männliche als Vierecke dargestellt. Mit einem Querstrich verbundene Geschwister kennzeichnen Zwillinge. Bei genetisch untersuchten Individuen ist die laborinterne Identifikationsnummer (L-Nummer) angegeben. CANVAS – *Cerebellar Ataxia with Neuropathy and bilateral vestibular Areflexia Syndrome*; L-Nummer – Laborinterne Identifikationsnummer.

Der Zwillingsbruder (L-10168, siehe Abb. 18) des Indexpatienten berichtete über eine seit 3 Jahren bestehende Gangunsicherheit sowie Schwindel insbesondere bei schnellen Drehbewegungen des Körpers und Kopfes, im Dunkel und beim Gehen auf unebenem Grund. Der klinisch-neurologische Befund ergab bei der Hirnnervenuntersuchung einen rechtsseitig pathologischen Kopffimpulstest. Die Untersuchung der Sensorik zeigte eine Hypästhesie des linken lateralen Unterschenkels. Der Romberg-Test war positiv. Drei Jahre nach Krankheitsbeginn zeigte der Patient eine leichte Progression der Gangunsicherheit, einen bilateral pathologischen Kopffimpulstest sowie einen bei Blick nach unten oder lateral zunehmenden Down-Beat-Nystagmus. Quantitative Aufnahmen des Kopffimpulstest zeigten einen stark reduzierten VOR-Gain bilateral (0.5 ± 0.06).

Die klinisch-neurologische Untersuchung und der vKIT des vier Jahre älteren Bruders (L-13119, siehe Abb. 18) waren ohne pathologischen Befund. Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten genetische Untersuchungen konnten bei ihm keine massiven biallelischen Repeat-Expansionen im Intron 2 des *RFC1*-Gen nachgewiesen werden.

7.3 Für die Untersuchung der intergenerationalen *RFC1*-Repeat-Stabilität eingeschlossene Familien

Für die Untersuchung der Stabilität des *RFC1*-Repeats bei der intergenerationalen Vererbung wurden im Rahmen dieser Arbeit insgesamt 153 Individuen aus 39 Familien ohne Ataxien genetisch untersucht (siehe Abschnitt 2.1.3). Die Stammbäume dieser Familien werden in der folgenden Abbildung (siehe Abb. 19) zusammengefasst dargestellt.

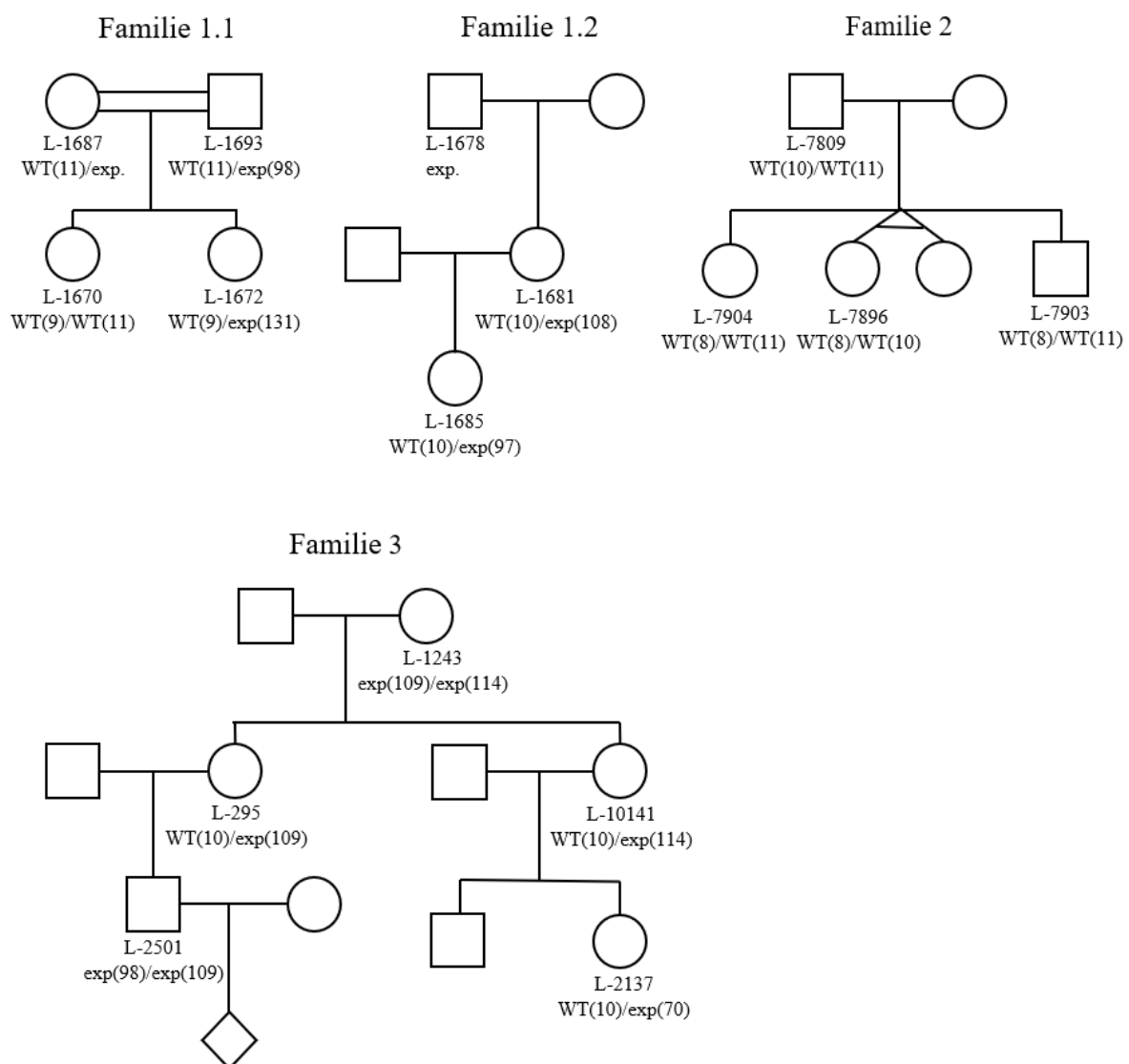
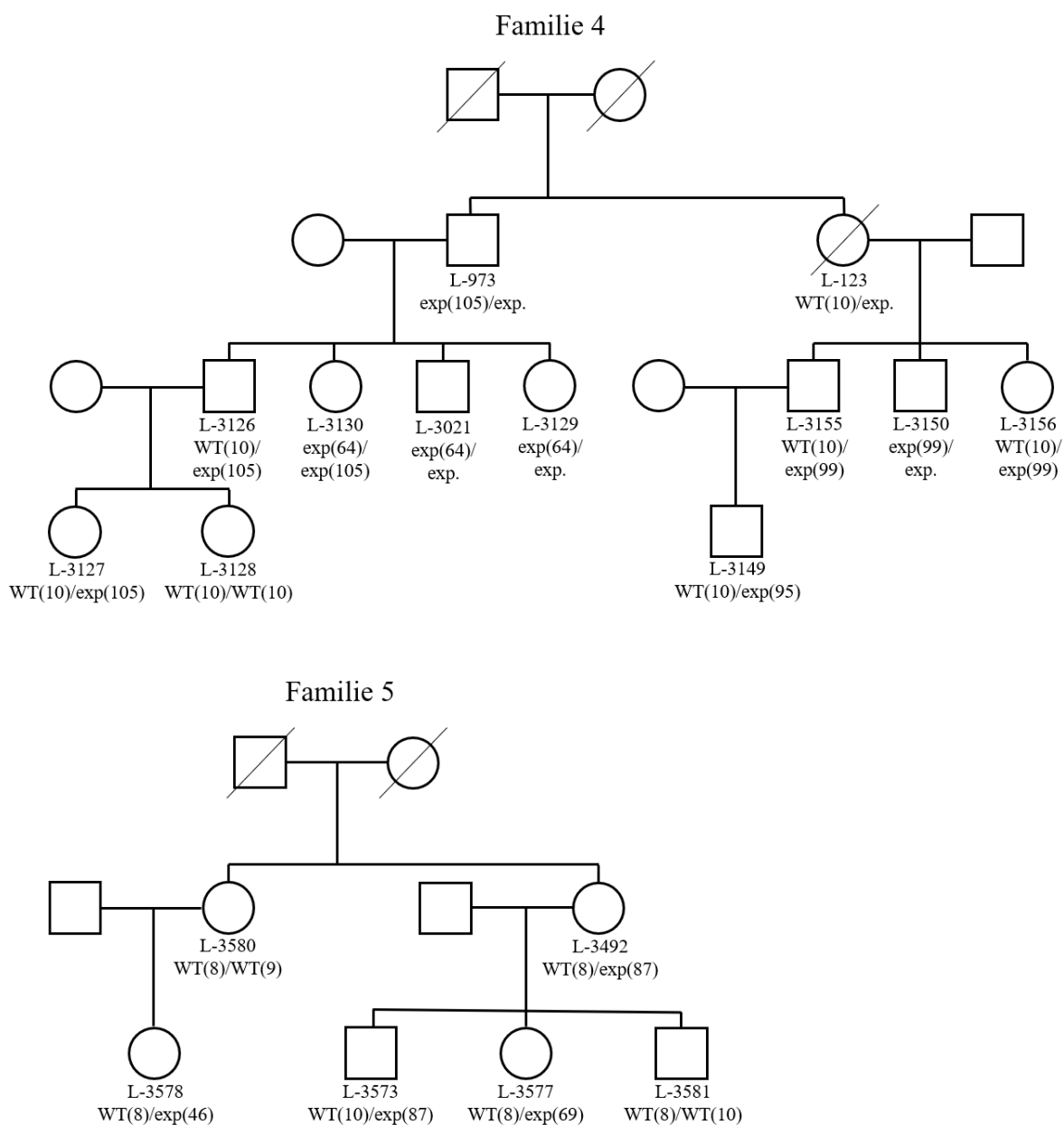
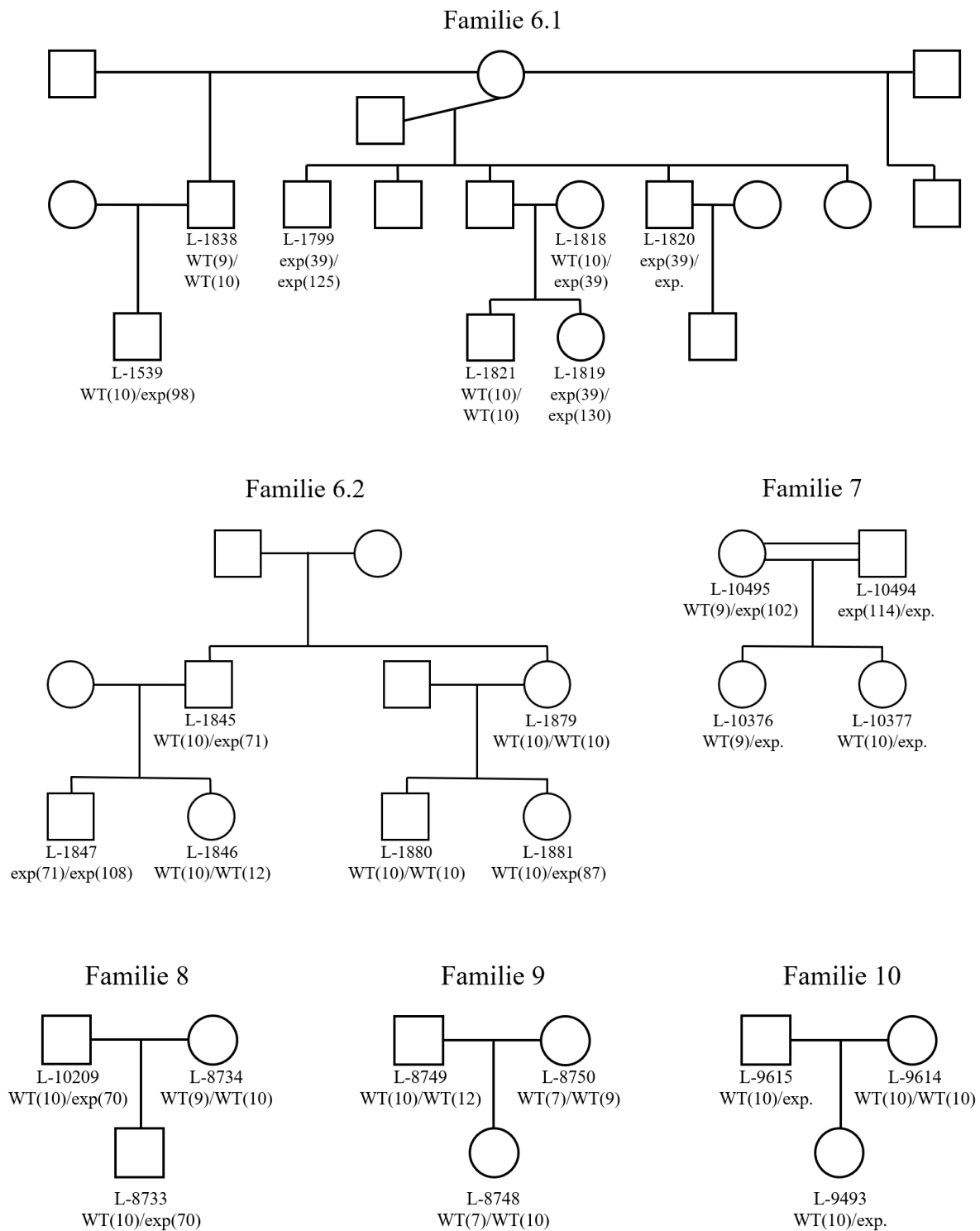


Abb. 19 Stammbäume der zur Analyse der *RFC1*-Repeat-Transmission eingeschlossenen Familien.

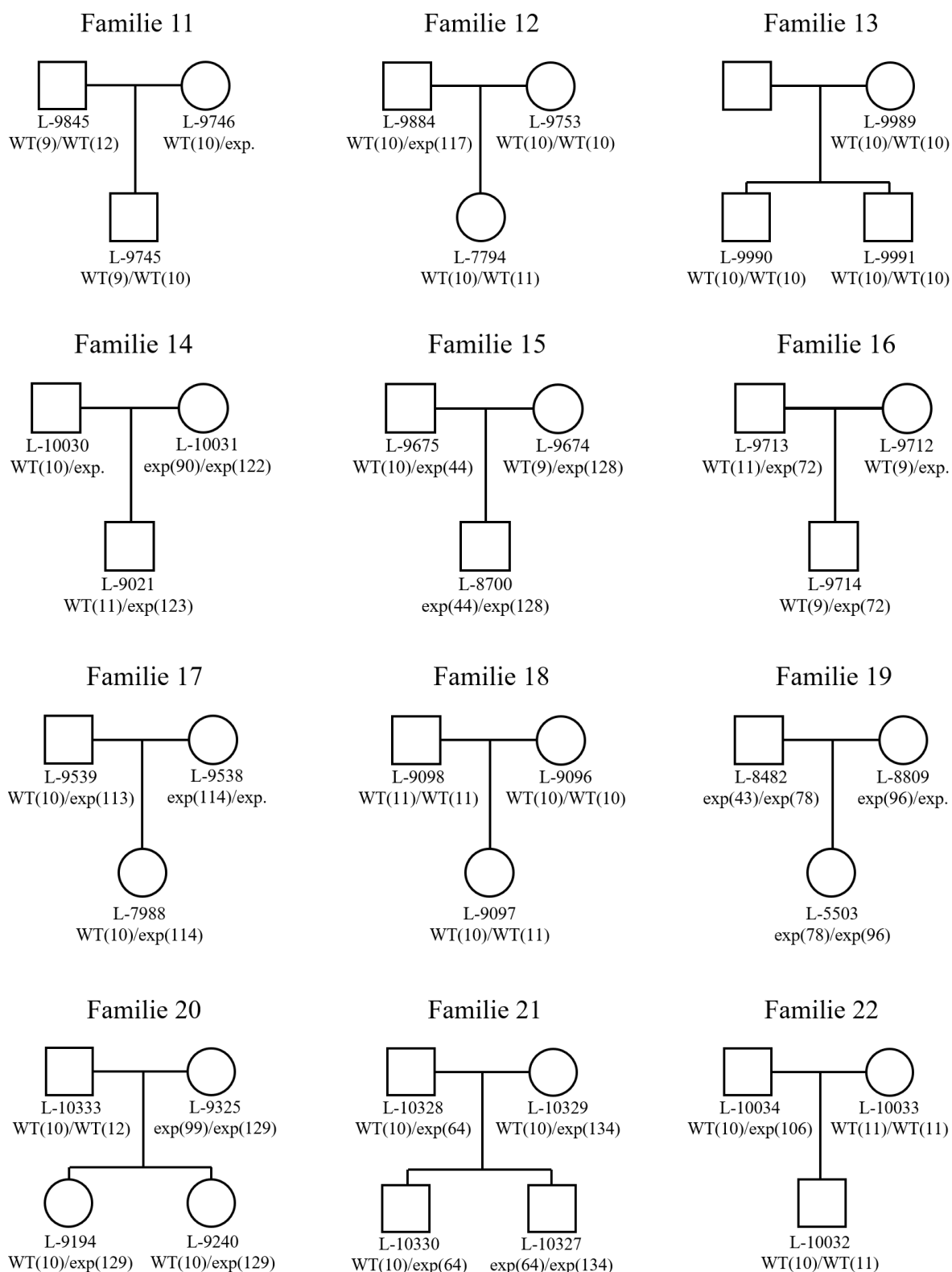
Mit Kreisen markierte Individuen sind weiblich, mit Vierecken männlich, mit Rauten von unbekanntem Geschlecht. Doppelstriche zwischen zwei Individuen zeigen eine Konsanguinität an. Mit einem Querstrich verbundene Geschwister kennzeichnen Zwillinge. Bei genetisch untersuchten Individuen ist die laborinterne Identifikationsnummer sowie der ermittelte Genotyp des Repeats im Intron 2 des *RFC1*-Gens dargestellt. Die in Klammern angegebene Nummer gibt die Anzahl der nachgewiesenen Repeats an. exp. – expandiert; L-Nummer – Laborinterne Identifikationsnummer; WT – Wildtyp.



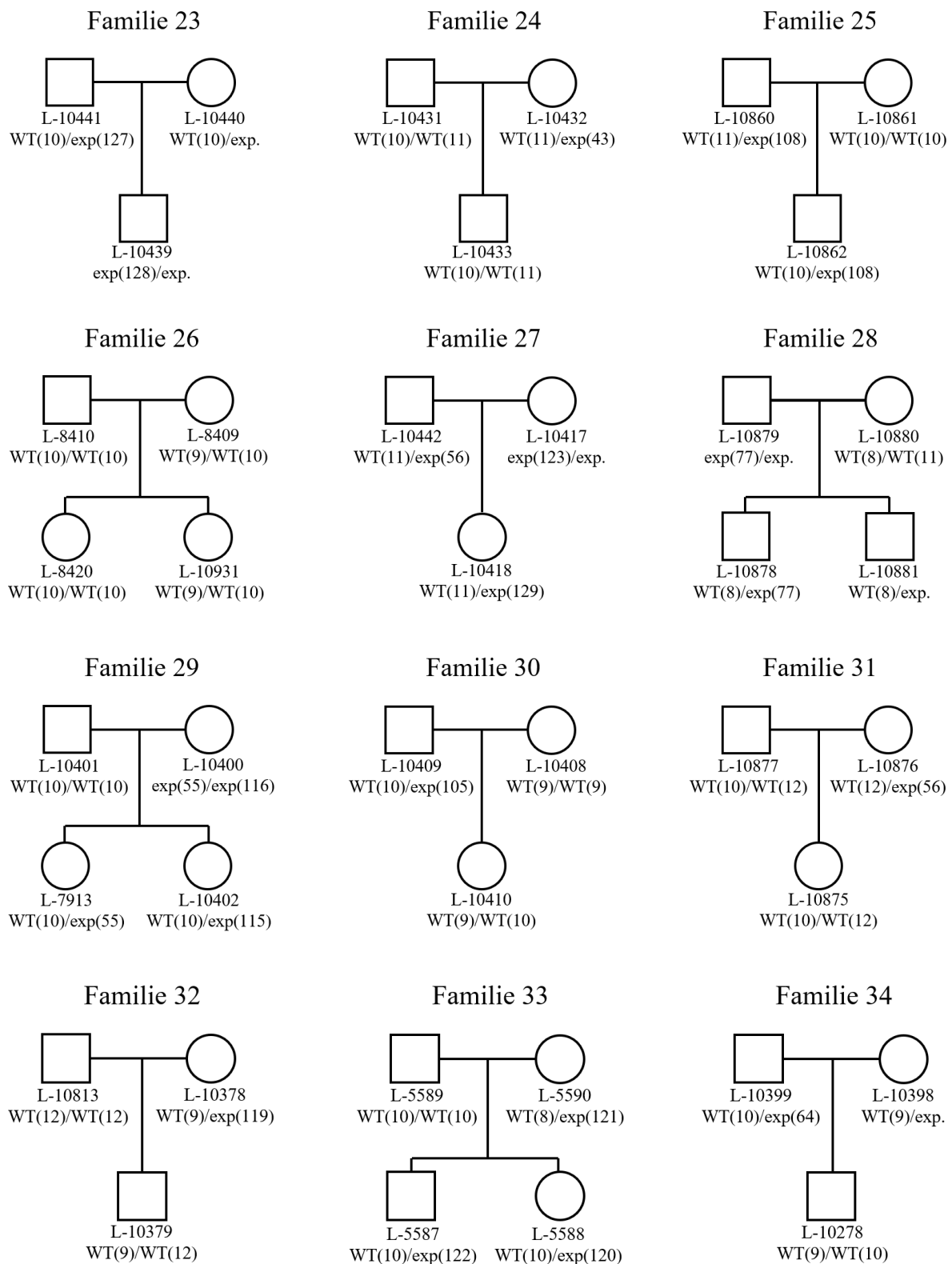
Fortsetzung Abb. 19 Stammbäume der zur Analyse der *RFC1-Repeat*-Transmission eingeschlossenen Familien. Mit Kreisen markierte Individuen sind weiblich, mit Vierecken männlich. Durchgestrichene Symbole kennzeichnen bereits verstorbene Individuen. Bei genetisch untersuchten Individuen ist die laborinterne Identifikationsnummer sowie der ermittelte Genotyp des *Repeats* im Intron 2 des *RFC1*-Gens dargestellt. Die in Klammern angegebene Nummer gibt die Anzahl der nachgewiesenen *Repeats* an. exp. – expandiert; L-Nummer – Laborinterne Identifikationsnummer; WT – Wildtyp.



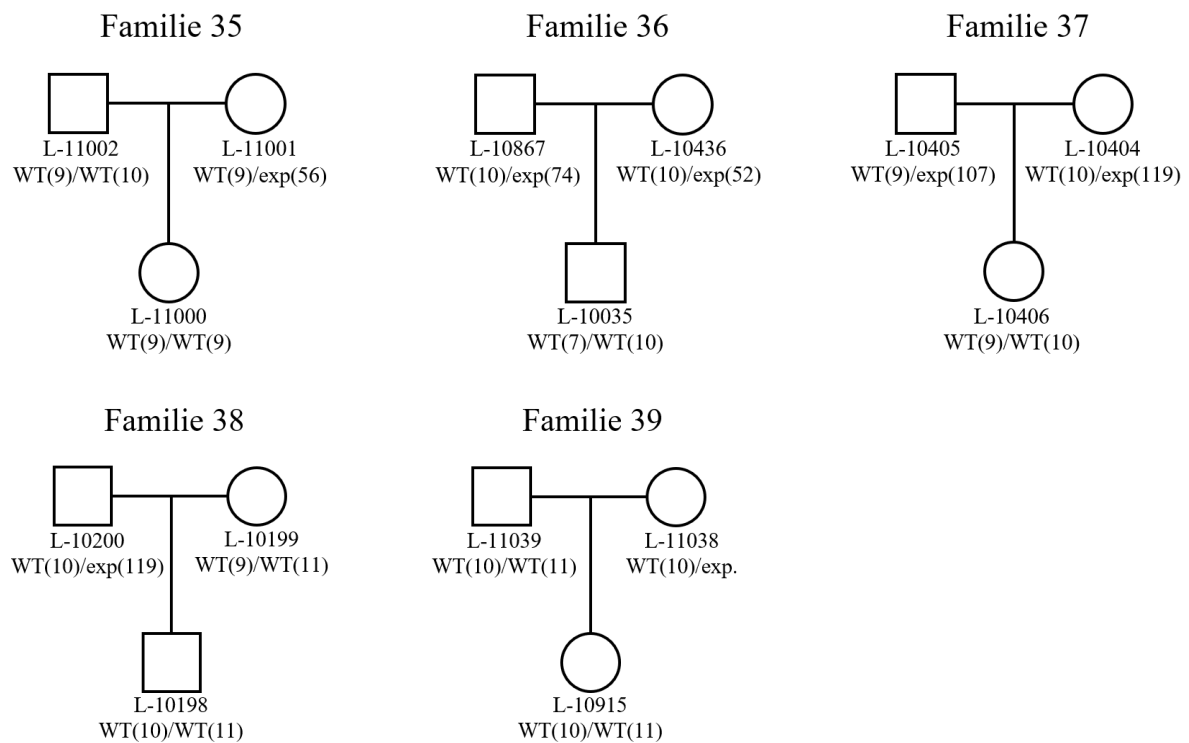
Fortsetzung Abb. 19 Stammbäume der zur Analyse der *RFC1-Repeat-Transmission* eingeschlossenen Familien. Mit Kreisen markierte Individuen sind weiblich, mit Vierecken männlich. Doppelstriche zwischen zwei Individuen zeigen eine Konsanguinität an. Bei genetisch untersuchten Individuen ist die laborinterne Identifikationsnummer sowie der ermittelte Genotyp des *Repeats* im Intron 2 des *RFC1*-Gens dargestellt. Die in Klammern angegebene Nummer gibt die Anzahl der nachgewiesenen *Repeats* an. exp. – expandiert; L-Nummer – Laborinterne Identifikationsnummer; WT – Wildtyp.



Fortsetzung Abb. 19 Stammbäume der zur Analyse der *RFC1*-Repeat-Transmission eingeschlossenen Familien. Mit Kreisen markierte Individuen sind weiblich, mit Vierecken männlich. Bei genetisch untersuchten Individuen ist die laborinterne Identifikationsnummer sowie der ermittelte Genotyp des *Repeats* im Intron 2 des *RFC1*-Gens dargestellt. Die in Klammern angegebene Nummer gibt die Anzahl der nachgewiesenen *Repeats* an. exp. – expandiert; L-Nummer – Laborinterne Identifikationsnummer; WT – Wildtyp.



Fortsetzung Abb. 19 Stammbäume der zur Analyse der *RFC1-Repeat*-Transmission eingeschlossenen Familien. Mit Kreisen markierte Individuen sind weiblich, mit Vierecken männlich. Bei genetisch untersuchten Individuen ist die laborinterne Identifikationsnummer sowie der ermittelte Genotyp des *Repeats* im Intron 2 des *RFC1*-Gens dargestellt. Die in Klammern angegebene Nummer gibt die Anzahl der nachgewiesenen *Repeats* an. exp. – expandiert; L-Nummer – Laborinterne Identifikationsnummer; WT – Wildtyp.



Fortsetzung Abb. 19 Stammbäume der zur Analyse der *RFC1*-Repeat-Transmission eingeschlossenen Familien. Mit Kreisen markierte Individuen sind weiblich, mit Vierecken männlich. Bei genetisch untersuchten Individuen ist die laborinterne Identifikationsnummer sowie der ermittelte Genotyp des *Repeats* im Intron 2 des *RFC1*-Gens dargestellt. Die in Klammern angegebene Nummer gibt die Anzahl der nachgewiesenen *Repeats* an. exp. – expandiert; L-Nummer – Laborinterne Identifikationsnummer; WT – Wildtyp.

7.4 Verwendete Primer

Die folgenden Tabellen geben einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten *Primer* für die Amplifikation genomischer DNA-Abschnitten (siehe Tab. 33) sowie von cDNA-Sequenzen (siehe Tab. 34).

Tab. 33 Verwendete genomische DNA-Primer

Methode	Gen / STR-Marker	Primer-Sequenz	Annealing-Temp. [°C]	Produktlänge [bp]**
Duplex-PCR	<i>RFC1</i> , Intron 2*	F: 5' -AGACAGGCCAATCACTTCAG-3' R: 5' -GTCCTGTCACTGGAATCTCAG-3'	63	457
	<i>PRKN</i> , Exon 2	F: 5' -ATGTTGCTATCACCATTTAAGGG-3' R: 5' -AGATTGGCAGCGCAGCGGCATG-3'	63	308
RP-PCR	<i>RFC1</i> , Intron 2	<i>Locus-spezifischer Primer (P1):</i> 5' -GTCCTGTCACTGGAATCTCAG-3'		
		<i>Repeatprimer (P2):</i> 1) 5' - CACGACGTTGTAAAACGAC GAAAAG AAAAGAAAAGAAAAGAAAAGAAAAG-3'	60	
		2) 5' - CACGACGTTGTAAAACGAC AAAAGG AAAGGAAAGGAAAGGAAAGG-3'	62	
		3) 5' - CACGACGTTGTAAAACGAC AAGGG AAGGGAAGGGAAGGG-3'	62	
		<i>M13-F-Primer (P3):</i> 5' - [FAM] - CACGACGTTGTAAAACGAC -3'		
Long-Range-PCR	<i>RFC1</i> , Intron 2*	F: 5' -AGACAGGCCAATCACTTCAG-3' R: 5' -GTCCTGTCACTGGAATCTCAG-3'	68	457
<i>RFC1</i> -Repeat-Längenbestimmung	<i>RFC1</i> , Intron 2	F: 5' - CACGACGTTGTAAAACGAC TCAAGT GATACTCCAGCTACACCGTTGC-3' R: 5' -GTGGGAGACAGGCCAATCACTTCAG-3' <i>M13-F-Primer:</i> 5' - [FAM] - CACGACGTTGTAAAACGAC -3'	63	367
Sanger-Sequenz.	<i>RFC1</i> , Intron 2*	F: 5' -AGACAGGCCAATCACTTCAG-3' R: 5' -GTCCTGTCACTGGAATCTCAG-3'	65	457
Haplotyp-analyse	D4S3001	F: 5' -CACGACGTTGTAAAACGACATGGAG GTCAGAGGTCA-3' R: 5' -CATTGCTAATGCTATCCCAG-3'	55	220
	D4S1581	F: 5' -CACGACGTTGTAAAACGACTTGCCA TGCTCCATTTT-3' R: 5' -GCACAAGTGTTGTCACATTCAAA-3'	55	214
	D4S2382	F: 5' -CACGACGTTGTAAAACGACTCTAGC CACCATTGCTTTC-3' R: 5' -GTGTGTATGGTATGCTGCCA-3'	55	244
	D4S174	F: 5' -CACGACGTTGTAAAACGACAAGAAC CATGCGATACGACT-3' R: 5' -CATTCCTAGATGGGTAAAGC-3'	55	175
	<i>Southern-Blot-Sonde</i>	F: 5' -GTTGTGTCCTAGTGCTTTGTG-3' R: 5' -AAGTTCTGGTCCCTTTTGG-3'	62	184

*Dieses *Primer*-Paar (*RFC1*, Intron 2) wurde für verschiedene Fragestellungen angewendet, wobei sich im Rahmen der Etablierung der Assays unterschiedliche optimale *Annealing*-Temperaturen ermitteln ließen.

**Angabe sind die PCR-Produktlängen entsprechend dem Referenzgenom (GRCh37/hg19).

Dick-gedruckt hervorgehoben ist die M13-Sequenz der jeweiligen Primer.

bp – Basenpaar; F – *Forward*/Vorwärts; PCR – Polymerase-Kettenreaktion; R – *Reverse*/Rückwärts; *RFC1* – *Replication Factor C Subunit 1*; RP-PCR – *Repeat-Primed-PCR*; Sequenz. – Sequenzierung; STR – *Short Tandem Repeat*; Temp. – Temperatur.

Anhang

Tab. 34 Verwendete cDNA-Primer

Methode	Gen	Primer-Sequenz	Annealing-Temp. [°C]	Produktlänge [bp]
qPCR Expressions-analyse	<i>RFC1</i> , Exon 7-9	F: 5' -AGGCAGTTGCATGAAGATGAAG-3' R: 5' -TGTCAGCTGATGACTTGGGAATG-3'	59	268
	<i>WDR19</i> , Exon 11-13	F: 5' -TTGAAGGAGAGCTACCAATCAC-3' R: 5' -AGCAGCATAGTCAGAATGAAGG-3'	59	197
	<i>β-Actin</i> , Exon 5-6	F: 5' -TGAAGTGTGACGTGGACATC-3' R: 5' -GGAGGAGCAATGATCTTGAT-3'	58	151
	<i>HGPRT</i> , Exon 3-7	F: 5' -ATCAGACTGAAGAGCTATTGTAATG ACCA-3' R: 5' -TGGCTTATATCCAACACTTCGTG-3'	58	231
	<i>YWHAZ</i> , Exon 2-4	F: 5' -GTAGGTCATCTTGGAGGGTCGT-3' R: 5' -GGTATGCTTGTTGTGACTGATCG-3'	58	285
Intron-Retention-PCR	<i>RFC1</i> , Exon 2-3	F: 5' -GACATTCGGAAATTCTTTGGAGT-3' R: 5' -GTCATCCTCTTTACGGGAGC-3'	60	156
Sequenzierung <i>RFC1</i> -cDNA	<i>RFC1</i> , Exon 1-9	F: 5' -CTGAGCCTCGATAACAGATTCC -3' R: 5' -AACTGGCCTTGGGAGAAGAG -3'	61	1020

bp – Basenpaar; cDNA – komplementäre Desoxyribonukleinsäure; F – *Forward*/Vorwärts; *HGPRT* – *Hypoxantin-Guanin-Phosphoribosyltransferase 1*; PCR – Polymerase-Kettenreaktion; qPCR – quantitative Echtzeit-PCR; R – *Reverse*/Rückwärts; *RFC1* – *Replication Factor C Subunit 1*; Temp. – Temperatur; *WDR19* – *WD repeat-containing Protein 19*; *YWHAZ* – *14-3-3 Protein zeta/delta*.

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Christine Klein für die Möglichkeit bedanken an dem Institut für Neurogenetik der Universität zu Lübeck promovieren zu dürfen. Insbesondere möchte ich Prof. Dr. rer. nat. Katja Lohmann dafür danken, dass ich meine Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe absolvieren durfte sowie für die hilfsbereite und konstruktive Unterstützung bei der Umsetzung der Arbeit. Weiterhin möchte ich Frauke Hinrichs für die nette und zuvorkommende Betreuung im Labor sowie Dr. rer. nat. Valerija Dobricic für die Unterstützung bei der Methodenetablierung danken. Überdies bedanke ich mich bei Prof. Dr. med. Norbert Brüggemann, Prof. Dr. med. Christoph Helmchen, Dr. med. Vera Tadic und Prof. Dr. med. Alexander Münchau für die Bereitstellung der klinischen Daten zu den eingeschlossenen Individuen mit CANVAS. Bei Prof. Dr. rer. nat. Christine Zühlke und PD Dr. med. Yorck Hellenbroich möchte ich mich für die Bereitstellung der DNA-Proben von Patientinnen und Patienten mit einer spätbeginnenden Ataxie bedanken. Abschließend möchte ich mich insbesondere bei Thorben Lueg für die emotionale Unterstützung während der gesamten Promotion bedanken.