

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

**Validierung von potenziellen Biomarkern für die  
neurodegenerative Erkrankung Spinozerebelläre Ataxie Typ 3  
(SCA3) und des krankheitsmodulierenden Einflusses  
intragenerischer Polymorphismen im  
Gen *ATXN3***

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

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

**vorgelegt von**

**Gansel, Melanie**

**2022**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. O. Rieß

2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. R. Schüle-Freyer

Tag der Disputation: 24.01.2022

## Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis .....	VI
II.	Abbildungsverzeichnis.....	X
III.	Tabellenverzeichnis .....	XV
1	Einleitung .....	1
1.1	Spinozerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3).....	1
1.1.1	Grundlagen der Erkrankung SCA3 .....	1
1.1.2	Epidemiologie .....	2
1.1.3	Symptomatik und AAO .....	3
1.1.4	Struktur und Funktion des nicht-expandierten ATXN3.....	9
1.1.5	Expandiertes ATXN3 und Pathogenese von SCA3 .....	15
1.1.6	Biomarker als diagnostische Methode bei SCA3.....	19
1.1.6.1	Was ist ein Biomarker? .....	19
1.1.6.2	Welche Biomarker kommen für SCA3 in Frage?.....	20
1.1.6.3	Expandiertes ATXN3 als potenzieller Statemarker.....	24
1.1.7	Mit SCA3 assoziierte Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) .....	25
1.1.7.1	Definition von SNPs .....	25
1.1.7.2	Welche SNPs wurden im Rahmen der Promotion zu SCA3 untersucht?.....	26
1.1.7.3	Potenzielle Auswirkungen der SNPs in Bezug auf SCA3 .....	28
1.2	Therapeutische Ansätze für SCA3.....	32
1.3	<i>European Spinocerebellar Ataxia Type 3/Machado-Joseph-Disease Initiative (ESMI)</i> .....	35
1.3.1	Studiendesign.....	36
2	Fragestellung und Zielsetzung .....	39
3	Material und Methoden.....	41
3.1	Material .....	41
3.1.1	Probandenrekrutierung, Probengewinnung und anamnestische Datengewinnung .....	41

3.1.2	Reagenzien/Chemikalien.....	42
3.1.3	Kits .....	43
3.1.4	Primer .....	44
3.1.5	Antikörper .....	45
3.1.6	Lösungen und Puffer .....	46
3.1.7	Geräte .....	48
3.1.8	Verbrauchsmaterialien.....	49
3.2	Methoden .....	51
3.2.1	DNA-Extraktion aus EDTA-Blut .....	51
3.2.2	DNA-Konzentrationsbestimmung und Lagerung der Proben.....	51
3.2.3	Agarosegel und Photographie des Gels .....	52
3.2.4	CAG-Fragmentlängen-Analyse .....	53
3.2.4.1	Polymerase-Kettenreaktion zur initialen DNA-Amplifikation ....	53
3.2.4.2	Finale Analyse der CAG-Fragmentlänge.....	55
3.2.5	Analyse der SNPs in <i>ATXN3</i> mittels Sanger-Sequenzierung .....	56
3.2.5.1	Polymerase-Kettenreaktion zur initialen DNA-Amplifikation ....	56
3.2.5.2	Kettenabbruch-Synthese (Sequenzier-PCR) als Basis für die Sanger-Sequenzierung.....	60
3.2.5.3	Finale Identifikation der SNPs in <i>ATXN3</i> mittels Sanger- Sequenzierung .....	62
3.2.6	Analyse der SNPs in <i>ATXN3</i> mittels <i>High Resolution Melting Analysis</i> .....	63
3.2.7	Lyse von mononukleären Zellen des peripheren Blutes .....	66
3.2.8	Bradford-Assay zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration	66
3.2.9	<i>Time-resolved fluorescence energy transfer</i> (TR-FRET) zur Bestimmung des <i>ATXN3</i> -Proteinlevels .....	70
3.2.10	Statistische Analysen.....	77
4	Ergebnisse .....	79
4.1	Kohortenanalyse und statistische Korrelationen der mittels TR-FRET gemessenen <i>ATXN3</i> -Proteinlevel in PBMCs .....	81
4.1.1	Kohortenanalyse.....	81

4.1.2	Statistische Analyse der CAG-Länge und klinischer Parameter.....	94
4.1.3	Statistische Analyse der ATXN3-Proteinlevel und genetischer und klinischer Parameter.....	100
4.2	Longitudinale Analyse der ATXN3-Proteinlevel zwischen Erst- und Zweituntersuchung im Rahmen von ESMI.....	117
4.2.1	Kohortenanalyse.....	117
4.2.2	Statistische Analysen der ATXN3-Proteinlevel zwischen Erst- und Zweituntersuchungen im Rahmen von ESMI und klinischer Parameter...	118
4.3	Analysen der drei Einzelnukleotidpolymorphismen im Gen <i>ATXN3</i> .	124
4.3.1	Etablierung der <i>High Resolution Melting Analysis</i> als Methode zur Genotypisierung der Einzelnukleotidpolymorphismen im Gen <i>ATXN3</i> ...	125
4.3.2	Kohortenanalyse.....	133
4.3.3	Statistische Analyse des Genotyps und klinischer Parameter.....	139
4.3.4	Statistische Analyse der Genotypen und des ATXN3-Proteinlevels.....	145
4.3.5	Statistische Analysen des kombinierten Genotyps ATXN3 BP 987 und ATXN3 BP 1118.....	149
5	Diskussion.....	155
5.1	Kohortenanalyse.....	155
5.2	ATXN3-Proteinlevel.....	159
5.3	Einzelnukleotidpolymorphismen im Gen <i>ATXN3</i> .....	167
5.4	Fehleranalyse und Schwächen der Promotion.....	175
5.5	Ausblick.....	179
6	Zusammenfassung.....	185
7	Literaturverzeichnis.....	187
8	Erklärung zum Eigenanteil.....	195
9	Präsentationen, Poster und Publikationen.....	197
10	Danksagung.....	198

## I. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AS	Aminosäure
AAO	<i>Age at onset</i> , Alter bei Krankheitsbeginn
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
AK	Antikörper
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
ATXN2	Ataxin-2
ATXN3	Ataxin-3
AUC	<i>Area under the curve</i> , Fläche unter der Kurve
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i> , Bicinchoninsäure
BSA	<i>Bovine Serum Albumin Fraction V</i> , Bovines Serumalbumin
bp	<i>base pairs</i> , Basenpaare
C	Cytosin
CAG	Basensequenz für die Aminosäure Glutamin
CHIP	C-Terminus des Hsc70-interagierenden Proteins
CSDP	<i>Cross-sectional annual disease progression</i>
DD	<i>Disease duration</i> , Krankheitsdauer
DUB	<i>Deubiquitinating enzyme</i> , Deubiquitinierungs-Enzym
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
dNTPs	Desoxyribonukleosid-Triphosphate
ddNTPs	Didesoxyribonukleosid-Triphosphate
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , DNS, Desoxyribonukleinsäure
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DUB	Deubiquitinierung
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDTA-Na <sub>2</sub>	Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Dinatriumsalzlösung
ERAD	<i>endoplasmic reticulum-associated degradation</i>

ESMI	<i>European Spinocerebellar Ataxia Type3/Machado-Joseph-Disease Initiative</i>
Ex	Exon
exp	expandiert
F <sup>-</sup>	Fluorid
G	Guanin
gb79	Glycoprotein 78
Gly	Glycin
HD	<i>Huntington's disease</i> , Chorea Huntington
HHR23	<i>UV excision repair protein RAD23 homolog</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Dihydrogenphosphat
Hrd1	<i>HMG-CoA reductase degradation protein 1</i>
HRMA	<i>High Resolution Melting Analysis</i>
Ile	Isoleucin
INAS	<i>Inventory of Non-Ataxia Symptoms</i>
JD	<i>Josephin domain</i>
K	Lysin
Leu	Leucin
lncRNA	<i>long non-coding RNA</i>
M	Molar
MAF	<i>minor allele frequency</i>
MAP2	<i>microtubule-associated protein 2</i>
Met	Methionin
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
mHTT	mutiertes Huntingtin
miRNA	<i>microRNA</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
MITOL	<i>membrane-associated ring finger (C3HC4) 5</i>
MJD	<i>Machado-Joseph Disease</i>
MTOC	Mikrotubuli-organisierendes Zentrum

Na	Natrium
NES	<i>Nuclear export signal</i>
NfL	<i>Neurofilament light chain</i> , Neurofilament-Leichtketten
NLS	<i>Nuclear localization signal</i>
PARK2	Parkin
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i> , mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
pNfH	<i>phosphorylated Neurofilament heavy chain</i> , phosphorylierte schwere Kette des Neurofilaments
polyQ	Polyglutamin
Q	Glutamin
$r_p$	Korrelationskoeffizient nach Pearson
$r_s$	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman
rcf	<i>relative centrifugal force</i> , Relative Zentrifugalbeschleunigung
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , RNS, Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i> , Operationscharakteristik eines Beobachters
S	Serin
SARA	<i>Scale of the Assessment of Rating of Ataxia</i>
SCA2	<i>Spinocerebellar Ataxia Type 2</i> , Spinozerebelläre Ataxie Typ 2
SCA3	<i>Spinocerebellar Ataxia Type 3</i> , Spinozerebelläre Ataxie Typ 3
Ser	Serin
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>
SMC	<i>Single-molecule counting Immunoassay</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> , Einzelnukleotid-Polymorphismus
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Taq	thermostabile DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus</i>



	<i>aquaticus</i>
Tb	Terbiumkryptat
TBE	TRIS-Borat-EDTA
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TR-FRET	<i>Time-resolved fluorescence energy transfer</i>
Trp	Tryptophan
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr	Tyrosin
Ub	Ubiquitin
Ubl <sub>d</sub>	<i>Ubiquitin-like domain</i>
UIM	Ubiquitin-interagierende Domäne
UTR	<i>untranslated region</i> , untranslatierter Bereich
Val	Valin
VCP	<i>valosin-containing protein</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

## II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Auswirkung des Phänotyps je nach CAG-Länge im Gen <i>ATXN3</i> .. 4	
Abbildung 2: Funktionen des physiologischen, nicht-expandierten <i>ATXN3</i> ..... 10	
Abbildung 3: Schematischer Aufbau von <i>full-length</i> <i>ATXN3</i> mit N-terminaler Josephin Domäne (JD) und C-terminalen Proteinschwanz mit zwei bis drei Ubiquitin-interagierende Domänen (UIM) und dem Polyglutamin-Trakt variabler Länge (adaptiert von Matos et al. (2011)). ..... 10	
Abbildung 4: Schematischer Aufbau der drei bekannten <i>full-length</i> Isoformen von <i>ATXN3</i> (adaptiert nach Weishäupl, et al. (2019)). ..... 12	
Abbildung 5: Vereinfachtes Schema des Einflusses von expandiertem <i>ATXN3</i> auf Protein-Ebene. .... 17	
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Lage der drei analysierten Einzelnukleotidolymorphismen (SNPs) auf den <i>full-length</i> Isoformen <i>ATXN3c</i> mit 3 UIMs und <i>ATXN3a</i> mit 2 UIMs..... 28	
Abbildung 7: Fotografie der Gelelektrophorese der PCR zur Amplifikation der <i>ATXN3</i> -Zielsequenz vor der CAG-Fragmentlängen-Bestimmung im <i>CEQ<sup>TM</sup>8000 Genetic Analysis System</i> unter UV-Licht. .... 54	
Abbildung 8: Fotografie der Gelelektrophorese unter UV-Licht nach Amplifikation der DNA mit der Zielsequenz <i>ATXN3</i> inklusive des Einzelnukleotidpolymorphismus <i>ATXN3</i> BP 669. .... 57	
Abbildung 9: Fotografie der Gelelektrophorese unter UV-Licht nach initialer DNA-Amplifikation der Zielsequenz im Gen <i>ATXN3</i> inklusive der Einzelnukleotidpolymorphismen <i>ATXN3</i> BP 987 und <i>ATXN3</i> BP 1118 vor der Sanger-Sequenzierung. .... 59	
Abbildung 10: Schema der Fluoreszenzverläufe von Donor (Tb) und Akzeptor (D2) im <i>Time-resolved fluorescence resonance energy transfer</i> (TR-FRET) zur quantitativen Messung von löslichem, expandiertem <i>ATXN3</i> mit Hilfe einer Kombination aus zwei fluoreszenzmarkierten Antikörpern (adaptiert nach Cui et al. (2013)). ..... 71	
Abbildung 11: Schema der Epitope von <i>ATXN3</i> und der Funktionsweise der im <i>Time-resolved fluorescence resonance energy transfer</i> (TR-FRET)	

verwendeten Antikörperkombinationen zur Messung von löslichem, expandiertem ATXN3 (adaptiert nach Nguyen et al. (2013)).....	73
Abbildung 12: Darstellung der Arbeitsschritte dieser Promotion als Flussdiagramm.....	80
Abbildung 13: Anteil der Kontrollprobanden, präsymptomatischen Mutationsträger und SCA3-Patienten aufgeschlüsselt nach Geschlecht.....	83
Abbildung 14: Statistische Analyse von Alter, CAG-Länge, SARA und INAS zwischen Kontrollprobanden, präsymptomatischen und symptomatischen Mutationsträgern. ....	84
Abbildung 15: Alter bei Krankheitsbeginn für beide Geschlechter.....	85
Abbildung 16: Korrelation von DD und SARA.....	86
Abbildung 17: Einfluss des Geschlechts auf die ATXN3-Proteinlevel für den MW1-D2 und 1C2-D2 Assay. ....	89
Abbildung 18: Einfluss des Alters auf die ATXN3-Proteinlevel für den MW1-D2 und 1C2-D2 Assay. ....	91
Abbildung 19: Einfluss des Zentrums auf die ATXN3-Proteinlevel für den MW1-D2 und 1C2-D2 Assay.....	93
Abbildung 20: Statistische Analyse von CAG-Länge des expandierten Allels und AAO.....	96
Abbildung 21: Statistische Analyse von CAG-Länge des expandierten Allels und SARA bei Erstuntersuchung im Rahmen von ESMI. ....	97
Abbildung 22: Statistische Analyse von CAG-Länge des expandierten Allels und INAS bei Erstuntersuchung im Rahmen von ESMI. ....	98
Abbildung 23: Statistische Analyse von CAG-Länge des expandierten Allels und CSDP bei Erstuntersuchung im Rahmen von ESMI.....	99
Abbildung 24: Statistische Analyse der Verteilung der ATXN3-Proteinlevel über die Kontrollen und Mutationsträger.....	101
Abbildung 25: ROC-Kurve für den MW1-D2 und 1C2-D2 Assay mit Gegenüberstellung von Kontrollen und SCA3-Mutationsträgern unabhängig vom Symptomstatus.....	102
Abbildung 26: Statistische Analyse der CAG-Länge von Kontrollen und Mutationsträgern und der ATXN3-Proteinlevel.....	104

Abbildung 27: Statistische Analyse der CAG-Länge präsymptomatischer Mutationsträger und der ATXN3-Proteinlevel.....	105
Abbildung 28: Statistische Analyse des AAOs von SCA3-Mutationsträgern und der ATXN3-Proteinlevel.....	106
Abbildung 29: Statistische Analyse der DD von SCA3-Mutationsträgern und der ATXN3-Proteinlevel.....	107
Abbildung 30: Statistische Analyse des SARA und der ATXN3-Proteinlevel.	109
Abbildung 31: Statistische Analyse des SARA und der ATXN3-Proteinlevel ohne die schwerstbetroffenen Mutationsträger mit SARA > 24 Punkte.....	110
Abbildung 32: Statistische Analyse des INAS und der ATXN3-Proteinlevel...	111
Abbildung 33: Statistische Analyse des INAS und der ATXN3-Proteinlevel ohne die schwerstbetroffenen Mutationsträger mit INAS 9-16 Punkte.....	113
Abbildung 34: Statistische Analyse der CSDP von symptomatischen SCA3-Patienten und der ATXN3-Proteinlevel.....	114
Abbildung 35: Statistische Korrelation der Nüchternzeit vor Blutentnahme und der ATXN3-Proteinlevel symptomatischer SCA3-Patienten.....	115
Abbildung 36: Übersicht der Einjahresänderung der klinischen Parameter SARA und INAS und des ATXN3-Proteinlevels zwischen Erst- und Zweituntersuchung in ESMI im MW1-D2 und 1C2-D2 Assay für Kontrollen, präsymptomatische Mutationsträger und symptomatische Mutationsträger mit steigendem SARA und sinkendem SARA.....	121
Abbildung 37: Statistische Analyse der Änderung von SARA und der ATXN3-Proteinlevel symptomatischer Mutationsträger.....	122
Abbildung 38: Statistische Analyse der Änderung von INAS und der ATXN3-Proteinlevel symptomatischer Mutationsträger.....	123
Abbildung 39: Statistische Analyse der Änderung von DD und der ATXN3-Proteinlevel symptomatischer Mutationsträger.....	123
Abbildung 40: Etablierung der MgCl <sub>2</sub> -Konzentration im Reaktionsansatz für die <i>High Resolution Melting Analysis</i> .....	127
Abbildung 41: Schmelzkurven und -maxima des Einzelnukleotidpolymorphismus SNP ATXN3 BP 669 in der <i>High Resolution Melting Analysis</i> .....	129

Abbildung 42: Schmelzkurven und -maxima des Einzelnukleotidpolymorphismus SNP ATXN3 BP 987 in der <i>High Resolution Melting Analysis</i> . .....	131
Abbildung 43: Allelspezifische Schmelzkurven und -maxima des Einzelnukleotidpolymorphismus SNP ATXN3 BP 1118 in der <i>High Resolution Melting Analysis</i> nach initialer PCR und Gelextraktion des allelspezifischen Genprodukts aus einem Agarosegel. ....	132
Abbildung 44: Relative Häufigkeitsverteilung und statistische Analyse des SNPs ATXN3 BP 669. ....	135
Abbildung 45: Relative Häufigkeitsverteilung und statistische Analyse des SNPs ATXN3 BP 987. ....	136
Abbildung 46: Relative Häufigkeitsverteilung und statistische Analyse des SNPs ATXN3 BP 1118. ....	137
Abbildung 47: Statistische Analyse des SNPs ATXN3 BP 669 mit klinischen Parametern. ....	140
Abbildung 48: Statistische Analyse des SNPs ATXN3 BP 987 mit klinischen Parametern. ....	142
Abbildung 49: Statistische Analyse des SNPs ATXN3 BP 1118 mit klinischen Parametern. ....	144
Abbildung 50: Statistische Analyse des SNPs ATNX3 BP 669 und der ATXN3- Proteinlevel von Mutationsträgern und Kontrollprobanden im MW1-D2 und 1C2- D2 Assay. ....	146
Abbildung 51: Statistische Analyse des SNPs ATNX3 BP 987 und der ATXN3- Proteinlevel von Mutationsträgern und Kontrollprobanden im MW1-D2 und 1C2- D2 Assay. ....	147
Abbildung 52: Statistische Analyse des SNPs ATNX3 BP 1118 und der ATXN3- Proteinlevels von Mutationsträgern und Kontrollprobanden im MW1-D2 und 1C2-D2 Assay. ....	148
Abbildung 53: Häufigkeitsverteilung des kombinierten Genotyps der SNPs ATXN3 BP 987 und ATXN3 BP 1118 für Kontrollprobanden und SCA3- Mutationsträger und statistische Korrelation der Genotypen mit der CAG-Länge für beide Allele der SCA3-Mutationsträger. ....	151

Abbildung 54: Statistische Korrelation des kombinierten Genotyps der SNPs ATXN3 BP 987 und ATXN3 BP 1118 mit AAO, CSDP, SARA und INAS für die expandierten Allele der SCA3-Mutationsträger. ....	152
Abbildung 55: Zusammenfassung der Biomarkerstudien in der ESMI-Kohorte für CAG-Länge und SARA.....	159
Abbildung 56: Zusammenfassung der Biomarkerstudien in der ESMI-Kohorte für expandiertes ATXN3. ....	166
Abbildung 57: Zusammenfassung der Biomarkerstudien in der ESMI-Kohorte für die Genotypen der Einzelnukleotidpolymorphismen. ....	174
Abbildung 58: Alternative Biomaterialien und Methoden der Probenverarbeitung.....	183

### III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Drei untersuchte, häufige SNPs im Gen <i>ATXN3</i> von potenziellem Interesse für SCA3, ihre Referenz SNP ID Nummer und der stattfindende Basenaustausch.....	26
Tabelle 2: Mögliche intragenetische Haplotypen resultierend aus der Kombination von drei beschriebenen intragenetischen Polymorphismen im Gen <i>ATXN3</i> und ihre weltweite Häufigkeit (modifiziert nach Gaspar et al. (2001). ..	31
Tabelle 3: Verzeichnis der verwendeten Chemikalien, ihrer Hersteller mit Hauptsitz und Herkunftsland. ....	42
Tabelle 4: Verzeichnis der verwendeten Kits, ihrer Hersteller mit Hauptsitz und Herkunftsland. ....	43
Tabelle 5: Verzeichnis der verwendete Primer für die CAG-Fragmentlängen-Bestimmung, ihrer Sequenz und der Länge des entstehenden Produkts.....	44
Tabelle 6: Verzeichnis der verwendeten Primer für die Sanger-Sequenzierung, ihrer Sequenz und der Länge des entstehenden Produkts. ....	44
Tabelle 7: Verzeichnis der verwendeten Primer für die <i>High Resolution Melting Analysis</i> ihrer Sequenz und der Länge ihres Produkts.....	45
Tabelle 8: Verzeichnis der verwendeten Antikörper für den TR-FRET, ihre Eigenschaften und Hersteller mit Hauptsitz und Herkunftsland.....	45
Tabelle 9: Verzeichnis der verwendeten Geräte, ihrer Hersteller und Herkunftsland. ....	48
Tabelle 10: Verzeichnis der verwendeten Verbrauchsmaterialien, ihrer Hersteller und Herkunftsland.....	49
Tabelle 11: Einstellungen am Eppendorf BioPhotometer. ....	52
Tabelle 12: Zusammensetzung der Agarosegele nach Größe und Prozentanteil zur Kontrolle der Reaktionsqualität nach PCR. ....	53
Tabelle 13: Reaktionsansatz und Thermozykler-Bedingungen für die CAG-Fragmentlängen-Bestimmung. ....	54
Tabelle 14: Reaktionsansatz im <i>CEQ™8000 Genetic Analysis System</i> zur CAG-Fragmentlängen-Analyse. ....	55
Tabelle 15: Inhalt des Programm "Frag-2" am <i>CEQ™8000 Genetic Analysis System</i> zur CAG-Fragmentlängen-Analyse nach initialer PCR.....	55

Tabelle 16: Reaktionsansatz und Thermozykler-Bedingungen für die PCR des SNPs ATXN3 BP 669.....	57
Tabelle 17: Ursprünglicher Reaktionsansatz und Thermozykler-Bedingungen für die PCR der SNPs ATXN3 BP 987 und ATXN3 BP 1118. ....	58
Tabelle 18: Endgültiger Reaktionsansatz und Thermozykler-Bedingungen für die PCR der SNPs ATXN3 BP 987 und ATXN3 BP 1118. ....	59
Tabelle 19: Reaktionsansatz und Thermozykler-Bedingungen für die Sequenzier-PCR des SNPs ATXN3 BP 669. ....	61
Tabelle 20: Reaktionsansatz und Thermozykler-Bedingungen für die Sequenzier-PCR der SNPs ATXN3 BP 987 und ATXN3 BP 1118.....	61
Tabelle 21: Programm LFR-b im <i>CEQ<sup>TM</sup>8000 Genetic Analysis System</i> für die Sanger-Sequenzierung. ....	62
Tabelle 22: Reaktionsansatz der <i>High Resolution Melting Analysis</i> für die SNPs ATXN3 BP 669 und ATXN3 BP 1118.....	65
Tabelle 23: Einstellungen am <i>Light Cycler<sup>®</sup> 480 Real Time PCR System</i> für die <i>High Resolution Melting Analysis</i> . ....	65
Tabelle 24: <i>Light Cycler<sup>®</sup> 480 System</i> Protokoll für die <i>High Resolution Melting Analysis</i> .....	65
Tabelle 25: Farben und Absorptionsmaxima des <i>Coomassie Brilliant Blue G-250</i> Farbstoffs im Bradford-Assay (nach Bradford (1976), Chial et al. (1993)).	67
Tabelle 26: Volumina zur Herstellung einer Standard-Eichreihe mit BSA und H <sub>2</sub> O Ampuwa für einen Bradford-Assay. ....	68
Tabelle 27: Reaktionsansatz eines Bradford-Assays. ....	68
Tabelle 28: In der Software Gen5 für das Gerät SynergyHT gewählte Einstellungen der Parameter zur Durchführung eines Bradford-Assays. ....	69
Tabelle 29: Durchgeführte TR-FRET Antikörperkombinationen mit ihren Markierungen, ihrer Stock-Konzentrationen und tatsächlich im Assay eingesetzten Konzentrationen. ....	74
Tabelle 30: Grundeinstellungen im <i>Multimode Plate Reader</i> mit 337 nm <i>TRF Light Unit</i> . ....	75
Tabelle 31: Einstellungen der 337nm <i>TRF Light Unit</i> des <i>Multimode Plate Reader</i> . ....	75



Tabelle 32: Übersicht und Status der verarbeiteten DNA- und PBMC-Proben in ESMI. ....	82
Tabelle 33: Eckdaten der vollständigen Kohorte für die statistische Analyse der PBMC-Proben dargestellt als Mittelwert oder Median. ....	87
Tabelle 34: Zusammenfassung des Einflusses von Geschlecht, Alter und Zentrum auf das ATXN3-Proteinlevel. ....	94
Tabelle 35: Zusammenfassung des Einflusses der CAG-Länge auf klinische Parameter. ....	100
Tabelle 36: Ermittelte Parameter zur ROC-Kurve des MW1-D2 und 1C2-D2 Assays. ....	102
Tabelle 37: Zusammenfassung des Einflusses genetischer und klinischer Parameter auf das ATXN3-Proteinlevel. ....	115
Tabelle 38: Eckdaten für die longitudinalen, statistischen Analysen des Patientenkollektives mit abgenommener PBMC-Probe bei der Erst- und Zweituntersuchung im Rahmen von ESMI dargestellt als Mittelwert oder Median. ....	118
Tabelle 39: Übersicht zur Richtung der Änderung des ATXN3-Proteinlevels in PBMC-Proben von symptomatischen SCA3-Patienten zwischen Erst- und Zweituntersuchung in ESMI je nach klinischem Betroffenheitsgrad und Antikörper-Assay. ....	120
Tabelle 40: Zusammenfassung des Verlaufs klinischer Parameter und des ATXN3-Proteinlevels zwischen Erst- und Zweituntersuchung in ESMI. ....	124
Tabelle 41: Reaktionsansatz der <i>High Resolution Melting Analysis</i> bei einer MgCl <sub>2</sub> -Konzentration von 5 mM. ....	128
Tabelle 42: Zusammenfassung der Etablierung der <i>High Resolution Melting Analysis</i> für drei SNPs im <i>ATXN3</i> -Gen. ....	133
Tabelle 43: Übersicht der Kohorte für die statistischen Analysen der Einzelnukleotidpolymorphismen im <i>ATXN3</i> -Gen. ....	133
Tabelle 44: Zusammenfassung der Kohortenanalyse für drei SNPs im <i>ATXN3</i> -Gen. ....	138
Tabelle 45: Zusammenfassung der klinischen Parameter für drei SNPs im <i>ATXN3</i> -Gen. ....	145

Tabelle 46: Zusammenfassung des Einflusses der drei SNPs im <i>ATXN3</i> -Gen auf das <i>ATXN3</i> -Proteinlevel. ....	149
Tabelle 47: Zusammenfassung der Genotyp-Häufigkeit und CAG-Länge getrennt für Allele von Kontrollprobanden und SCA3-Mutationsträgern. ....	153
Tabelle 48: Zusammenfassung des Einflusses des kombinierten Genotyps der SNPs <i>ATXN3</i> BP 987 und <i>ATXN3</i> BP 1118 auf klinische Parameter. ....	154

# 1 Einleitung

## 1.1 Spinozerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3)

### 1.1.1 Grundlagen der Erkrankung SCA3

Die Erkrankung Spinozerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3) ist eine progressive und letal verlaufende neurodegenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems (Alves, et al., 2008; Matos, et al., 2011). Sie ist auch unter dem Namen *Machado-Joseph Disease* (MJD) bekannt, welcher sich vom Namen der zwei Familien portugiesischer Abstammung ableitet, bei denen die Symptome von SCA3/MJD in den 1970er Jahren erstmals beschrieben wurden (NINDS, 2010; Meira, et al., 2020). SCA3 hat ihren Ursprung in einer instabilen, expandierten Wiederholung des Nukleotid-Triplets CAG im Exon 10 der kodierenden Region des Gens *Ataxin-3* (*ATXN3*) (Matos, et al., 2011; Maciel, et al., 1999), welches sich auf dem langen q-Arm des Chromosoms 14 des menschlichen Genoms (Genort: 14q32.12) befindet (Kawaguchi, et al., 1994). Auf Proteinebene führt die krankheitverursachende Mutation in *ATXN3* im gleichnamigen, ubiquitär exprimierten Protein *ATXN3* über einen vermehrten Einbau der Aminosäure Glutamin (Q) in seinen polyQ-Trakt zu einem abnormal elongierten Protein und löst in der Folge die spezifischen Symptome der Erkrankung aus (NCBI *ATXN3*, 2018). SCA3 ist damit eine von insgesamt neun Polyglutamin-Erkrankungen, denen instabile CAG-Triplett-Expansionen in jeweils unterschiedlichen Genen zu Grunde liegen. Zu den Polyglutaminerkrankungen gehören neben SCA3 auch Chorea Huntington (HD, Gen *Huntingtin*), die Dentatorubro-Pallidoluysische Atrophie (DRPLA, Gen *Atrophin 1*), die Spinobulbäre Muskelatrophie Typ Kennedy (SMA, Gen *Androgen Receptor*), die Spinozerebelläre Ataxie Typ 1 (SCA1, Gen *Ataxin-1*), die Spinozerebelläre Ataxie Typ 2 (SCA2, Gen *Ataxin-2*), die Spinozerebelläre Ataxie Typ 6 (SCA6, Gen *Calcium Voltage-Gated Channel Subunit Alpha1 A*), die Spinozerebelläre Ataxie Typ 7 (SCA7, Gen *Ataxin-7*) und die Spinozerebelläre Ataxie Typ 17 (SCA17, Gen *TATA-Box Binding Protein*). Ihnen allen ist ein für jede Erkrankung selektiver Neuronenverlust gemein, der kausal vom jeweiligen expandierten, krankheitsverursachenden Protein mitverursacht wird (Matos, et al., 2011). Unter heute 47 bekannten SCA-Subtypen ist SCA3 sowohl die welt-

weit häufigste Form der Spinozerebellären Ataxie als auch die weltweit häufigste autosomal-dominant vererbte Ataxie (Full Proposal Application Form ESML, n.d.; Klockgether, et al., 2019).

Die Weitergabe des expandierten Gens in die folgenden Generationen folgt bei SCA3 einem autosomal-dominanten Erbgang (Matos, et al., 2011; de Mattos, et al., 2018). Die Vererbung unterliegt dazu dem Phänomen der Antizipation. Dieses wird im Zusammenhang mit Trinukleotid-Erkrankungen häufig beobachtet und ist in Familien intergenerational mit immer früherer Krankheitsmanifestation und -schwere assoziiert. Faktoren, die sich im Allgemeinen auf die intergenerationale Instabilität mit Variationen der CAG-Länge auswirken können, sind die Art und die ursprüngliche Größe der repetitiven Sequenz, das Vorhandensein oder Fehlen von Unterbrechungen der repetitiven Sequenz, die Länge des expandierten CAG-Trakts im übertragenden Elternteil, sowie das Geschlecht des Nachkommens und des übertragenden Elternteils (Maciel, et al., 1999).

### **1.1.2 Epidemiologie**

Nach Ergebnissen einer weltweiten Haplotyp-Studie von Gaspar et al. (2001) mit Hilfe von fünf unterschiedlichen den *ATXN3*-Genlokus Mikrosatellitenmarkern und drei intragenetischen Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) wurde eine einzelne krankheitsverursachende *ATXN3*-Mutation in mehrere Populationen eingebracht, in denen diese Mutation jeweils anderen lokalen Gründereffekten unterlag. Durch intragenetische Haplotypen im Genom der SCA3-Patienten, die spezifischen Herkunftsländern zuschreibbar sind, lässt sich begründen, dass die Mutation vermutlich sehr alt ist. Die Ursprünge der zwei häufigsten intragenetischen Haplotypen sind auf die Inseln Flores und São Miguel der Azoren zurückzuführen (Gaspar, et al., 2001; Meira, et al., 2020). Beide intragenetischen Haplotypen resultieren aber wahrscheinlich aus unterschiedlichen Mutationsereignissen. Forschende vermuten heute, dass das ursprüngliche Mutationsereignis auf dem Festland Portugals stattfand und sich im Zuge der Besiedelung der Azoren im 15. oder 16. Jahrhundert auf die Inselgruppe ausbreitete. Von den Azoren wird eine Verbreitung in den USA und Canada am Ende des letzten Jahrhunderts proponiert. Portugiesische Entdeckungsfahrten, beginnend im 15. Jahrhundert, sollen die Mutation in weiter entfernte Länder

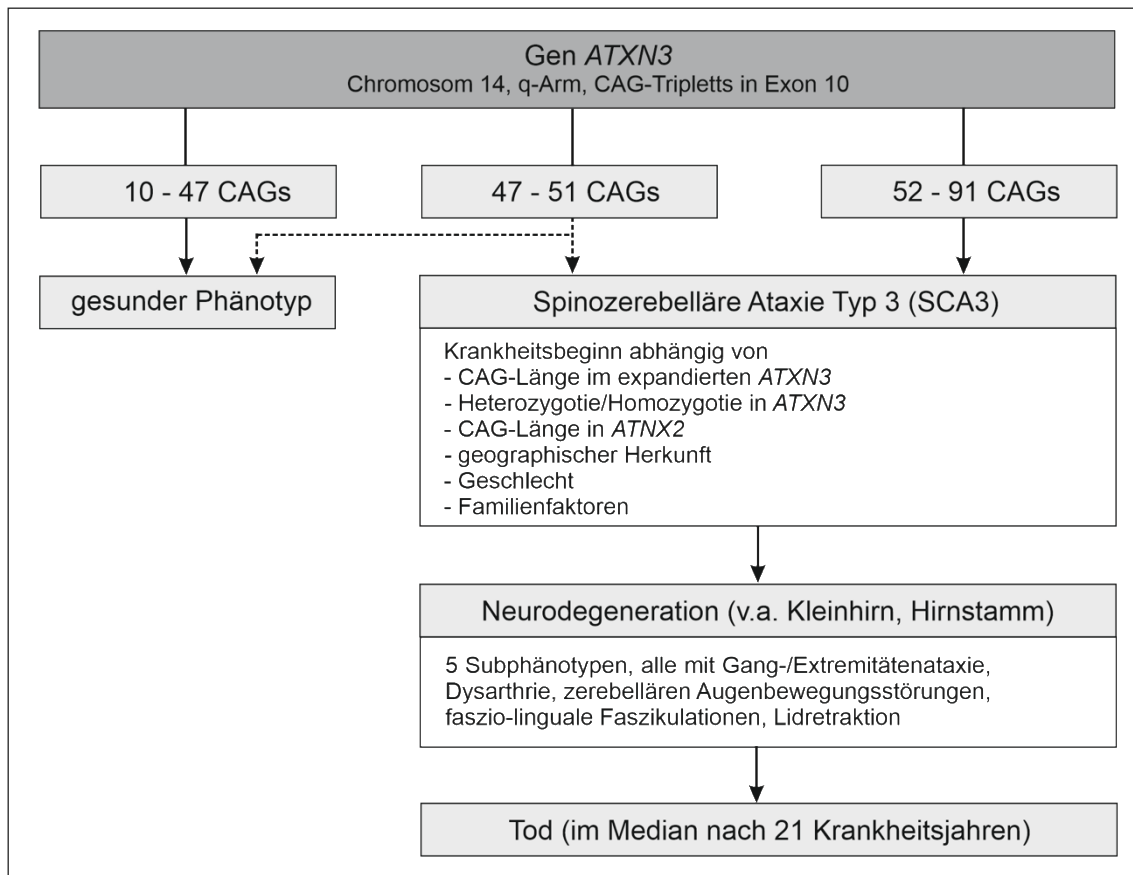
verbreitet haben (Gaspar, et al., 2001). Meira et al. (2020) berichten darüber hinaus von weiteren potenziellen Beschreibungen der MJD in der Literatur des 19. Jahrhunderts. Passend zu diesen Ergebnissen findet man heute die höchsten Prävalenzen der Krankheit unter Mutationsträgern mit portugiesischer Abstammung und in Ländern entlang alter portugiesischer Handelsstraßen wie Japan, Brasilien und den Vereinigten Staaten (NINDS, 2010; Rieß & Schöls, 1996). In ganz Portugal wurde eine Prävalenz von 1,5 bis 3,1 pro 100.000 Einwohner bestimmt. Auf der Inselgruppe der Azoren ist einer von 2544 Bewohnern betroffen. Alleine auf der Azoreninsel Flores erkrankt je nach epidemiologischer Studie sogar jeder 123. bis 158. Einwohner (NINDS, 2010; Coutinho, et al., 2013; Rapaso & Lima, 2018; Klockgether, et al., 2019)

### **1.1.3 Symptomatik und AAO**

Die für SCA3 verantwortliche Genmutation im Gen *ATXN3* ist hochpenetrant, denn bei ca. 98 % Genmutationsträgern erreicht die Krankheit im Verlauf des Lebens das symptomatische Stadium. Die Erkrankung präsentiert sich klinisch dabei sehr pleomorph mit Unterschieden sowohl in den Symptomen als auch im Alter bei Krankheitsbeginn (AAO) (Rapaso & Lima, 2018). Tatsächlich sind die Symptome so heterogen, dass MJD in portugiesischen und japanischen Familien und SCA3 in französischen und deutschen Familien in früheren Jahren für zwei unterschiedliche Erkrankungen gehalten wurden. Erst durch klinische und genetische Analysen, die denselben Genlocus für das jeweils krankheitsverursachende Gen identifizierten, kam es zur Zusammenführung von MJD und SCA3, sodass beide Begriffe heute als Synonym verwendet werden (Schöls, et al., 1995; Twist, et al., 1995).

Symptomatisch wird die Erkrankung ab einem Schwellenwert von ca. 52 CAG-Triplets auf mindestens einem expandierten Allel (D'Abreu, et al., 2010; Coarelli, et al., 2018). Die innerhalb der europäischen Bevölkerung größte bis heute auf einem expandierten Allel nachgewiesene Anzahl an CAG-Triplets liegt bei 87 CAGs (Matos, et al., 2011; Klockgether, et al., 2019), in einer brasilianischen Kohorte jedoch bei 91 CAG-Triplets (Rodríguez-Labrada, et al., 2019). Auf der anderen Seite wird eine Anzahl an CAG-Triplets zwischen 10

und 47 als normales bzw. nicht-expandiertes Allel bezeichnet. Die Spannweite zwischen 47 bis 51 CAG-Tripletts stellt einen Übergangsbereich dar, in dem ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von spezifischen Symptomen besteht, diese treten jedoch nur mit unvollständiger Penetranz auf (D'Abreu, et al., 2010; Matos, et al., 2011). Der Einfluss der jeweiligen Anzahl der CAG-Tripletts ist in Abbildung 1 nochmals zusammengetragen.



**Abbildung 1: Auswirkung des Phänotyps je nach CAG-Länge im Gen ATXN3.** Eine Expansion von 10-47 CAGs zählt als nicht-expandiertes Allel und führt zu keinem klinischen Phänotyp. Ab ca. 47 CAGs wird von einer CAG-Expansion ausgegangen, wobei bis ca. 51 CAGs Symptome im Laufe des Lebens auftreten können, aber nicht müssen. Ab ca. 52 CAG-Tripletts erkrankt der Patient im Laufe seines Lebens sicher an der Spinozerebellären Ataxie Typ 3 (SCA3), wobei der Krankheitsbeginn von verschiedenen Faktoren abhängig ist. Die Krankheit führt über Neurodegeneration letztendlich zum vorzeitigen Tod. CAG = Basensequenz für die Aminosäure Glutamin, Q = Glutamin.

Die Bezeichnung „Spinozerebelläre Ataxie“ lässt bereits vermuten, dass Pathologien im Rückenmark und das Kleinhirn eine zentrale Rolle bei Erkrankung spielen (Klockgether, et al., 2019). Da die Mutation sich klinisch so variabel manifestiert, teilt eine Klassifikation von Roger Rosenberg die SCA3-Patienten in drei Subphänotypen ein. Die drei Typen 1, 2 und 3 unterscheiden sich in AAO

und den Symptomen, wobei allen faszio-linguale Faszikulationen, eine Lidretaktion und Kleinhirnzeichen gemein sind. Zu letzterem zählen Gang- und Extremitätenataxie, Dysarthrie und zerebelläre Augenbewegungsstörungen (Rieß & Schöls, 1996). Patienten vom Typ 1 haben den frühesten Krankheitsbeginn (im Mittel 24,3 Jahre) mit schnell progredientem und schwerem Krankheitsverlauf. Zu den oben genannten Symptomen kommen zusätzlich pyramidale Zeichen, wie Rigor, Dystonie und Spastik, und extrapyramidale Zeichen, wie pathologische Reflexe. Typ 2 beginnt zwischen dem 20. und 50. Lebensjahr (im Mittel 40,5 Jahre) und manifestiert sich zusätzlich mit Spastik und externer Ophthalmoplegie. Bei einem mittleren Erkrankungsalter von 46,8 Jahren ist Typ 3 der Subtyp mit der langsamsten Progredienz. Dieser präsentiert sich neben den Hauptsymptomen mit Muskelatrophien und -krämpfen sowie mit Polyneuropathie und Sensibilitätsstörungen (Maciel, et al., 1995; Rieß & Schöls, 1996). Nach einer Untersuchung von Rieß und Schöls (1996) zeigten deutsche SCA3-Patienten zwar die charakteristischen Grundsymptome wie in Rosenbergs Subphänotypen beschrieben, allerdings mit deutlich anderer Häufigkeit. Die häufigsten Symptome waren in Deutschland Gang- und Extremitätenataxien (100 bzw. 97 %), zerebelläre Okulomotorikstörungen (93 %), zerebelläre Dysarthrie (90 %), Schluckstörungen (63 %) und Spastik (57 %). Zusätzlich korrelierten Rieß und Schöls (1996) die Anzahl an CAG-Tripletts mit dem Erkrankungstyp nach Rosenberg, wobei längere polyQ-Trakte im Protein ATXN3 mit schwerer Erkrankung äquivalent zu Subphänotyp 1 assoziiert waren, Patienten mit kürzeren polyQ-Trakten zeigten eher Subphänotyp 3. Nachfolgend wurden zwei weitere Subphänotypen definiert: Typ 4 wird auch als Parkinson-ähnlicher Phänotyp bezeichnet. Patienten zeigen hier häufig symmetrische Symptome der Parkinson-Krankheit, jedoch ohne Tendenz zu einem bestimmten AAO und ohne Korrelation zur CAG-Länge. Eine reine progressive spastische Paraplegie zeigen Betroffene des Subphänotyps 5, wobei dieser Typ sehr selten ist (D'Abreu, et al., 2010). Im Allgemeinen treten neben den motorischen Symptomen wie sie bereits oben genannt wurden und Dysphagie auch nicht-motorische Manifestationen auf. Dazu gehören kognitive Beeinträchtigungen, exzessive Tagesmüdigkeit, das *Restless Leg Syndrome* und REM-Schlaf-

Verhaltensstörungen (D'Abreu, et al., 2010; Schöls, et al., 2015). Im Verlauf der progressiven Erkrankung SCA3 sind viele Patienten auf Gehhilfen oder Rollstühle angewiesen (Rieß, et al., 2008). Die Lebenserwartung von SCA3-Mutationsträgern ist im Vergleich zur gesunden Normalbevölkerung je nach AAO und CAG-Länge verkürzt. Nach brasilianischen Forschungen beträgt das mediane Überleben nach Krankheitsbeginn ca. 21 Lebensjahre (D'Abreu, et al., 2010).

Die Symptome der Erkrankung beginnen nicht bei jedem SCA3-Patienten zum gleichen Zeitpunkt. Im Durchschnitt rechnet man mit einem AAO in der dritten oder vierten Lebensdekade (Coarelli, et al., 2018). Die Variabilität kann laut Ergebnissen einer Metaanalyse weltweit zu ca. 55,2 % allein durch die CAG-Länge in *ATXN3* erklärt werden. Im Allgemeinen lässt sich zeigen, dass die Variabilität der Anzahl der CAG-Triplets größer als die Variabilität des AAO ist was für zusätzliche Einflussfaktoren auf die Variabilität des AAO spricht. Identifiziert wurden weitere genetische und umweltbedingte Faktoren. Die gemeinsame Analyse von CAG-Länge in *ATXN3*, geographische Herkunft, Anzahl der CAG-Triplets im krankheitsverursachenden Gen *ATXN2* der Spinocerebellären Ataxie Typ 2 (SCA2), Geschlecht und Familienfaktoren erklärten zusammen bereits 73,5 % der AAO-Variabilität (de Mattos, et al., 2018).

Für die CAG-Länge und das AAO ist eine inverse Korrelation bekannt, d.h. je größer die Anzahl der CAG-Triplets, desto früher treten die Symptome der Krankheit auf (Schöls, et al., 1995; de Mattos, et al., 2018). Betrachtet man beide Allele prädisponiert Homozygotie im krankheitsverursachenden Gen ebenfalls für einen frühes AAO (Rieß, et al., 2008). Interessanterweise wird beobachtet, dass SCA3-Mutationsträger je nach geographischer Herkunft unterschiedliche durchschnittliche CAG-Triplett-Wiederholungen des expandierten Allels im Genom aufweisen. Bei geographischen Studien mit Mutationsträgern eingeteilt in drei Hauptgruppen (Personen mit portugiesischen Ursprung, nicht-portugiesische Europäer und eine heterogene Gruppe mit Ursprüngen in den restlichen Erdteilen) haben brasilianische und asiatische SCA3-Kohorten im Durchschnitt höher expandierte CAG-Trakte als nicht-portugiesische Europäer, die eindeutig die kürzesten CAG-Trakte aufwiesen. Bei Mutationsträgern unter-



schiedlicher geographischer Herkunft aber gleicher Anzahl an CAG-Triplets werden Differenzen im AAO beobachtet (Maciel, et al., 1995; de Mattos, et al., 2018). Darüber hinaus beschreiben Rodríguez-Labrada et al. (2020), dass deren brasilianische Kohorte bei durchschnittlich höherer Zahl an CAG-Triplets sogar später im Leben erkrankte als europäische Kohorten mit kürzerem CAG-Trakt. Dies lässt vermuten, dass die CAG-Länge nicht auf die AAOs aller Mutationsträger weltweit den gleichen Einfluss hat. Eine Erklärungsmöglichkeit hierfür wären bis jetzt unbekannte Faktoren, die entweder nicht-portugiesischen Europäer für einen früheren AAO prädisponieren oder bei Mutationsträgern portugiesischer Abstammung zu späterem AAO führen. Die geographische Herkunft erklärt laut Metaanalyse allumfassend zusätzlich zur CAG-Länge ca. 8,34 % der Variabilität im AAO. Während die Länge des CAG-Trakts im nicht-expandierten *ATXN3* keine signifikante Rolle für die Variabilität im AAO spielt (Maciel, et al., 1995; de Mattos, et al., 2018), zeigt sich für nicht-expandierte *ATXN2*-Allele mittlerer Länge mit 27 – 33 CAG-Triplets eine statistisch signifikante Korrelation mit früherem AAO in SCA3 und erklärt insgesamt 0,39 % der Variabilität in AAO (de Mattos, et al., 2018). Im Zusammenhang mit Studien zu anderen Erkrankungen, wird eine biologisch wichtige Rolle von nicht-expandiertem *ATXN2* und dessen Protein in neurodegenerativen Erkrankungen vermutet. Auch für SCA3 gibt es Anhaltspunkte für diese Vermutung, denn in einer vor kurzem stattgefundenen Studie, wurden in Gehirnen von SCA3-Patienten reduzierte *ATXN2*-Konzentrationen gefunden (de Mattos, et al., 2018). Ein Einzelnukleotidpolymorphismus im *ATXN2*-Gen soll laut einer Studie an chinesischen Patienten zum früheren AAO in SCA3 führen (Ding, et al., 2016). Das Geschlecht der SCA3-Patienten trägt ca. 0,3 % zur Variabilität im AAO bei. Männliche Patienten neigen dabei zu einem früheren AAO, vor allem bei Betrachtung von SCA3-Patienten mit steigender Anzahl an CAG-Triplets. Des Weiteren fällt eine geringere AAO-Variabilität innerhalb einer Familie auf als beim Betrachten des AAOs zwischen verschiedenen Familien. Hierfür könnten sowohl genetische *modifier*-Gene als auch umweltbedingte Faktoren verantwortlich sein (de Mattos, et al., 2018).

Bezüglich des Einflusses der Anzahl der CAG-Triplets auf die anschließende Krankheitsprogression gibt es in der Literatur widersprüchliche Daten, die teilweise eine schnellere Krankheitsprogression bei ATXN3-Proteinen mit größeren polyQ-Trakten postulieren (Rodríguez-Labrada, et al., 2019), aber auch andere Forschungsgruppen, die dies nicht beobachten (Jacobi, et al., 2015).

Um in klinischen Studien die Erfolge und Qualität von Medikamenten und in der Alltagspraxis die klinische Krankheitsprogression quantifizieren zu können, sind einheitliche Messsysteme nötig. Die heute wichtigste, zur Einordnung der Symptomschwere dienende Skala, ist SARA – *Scale for the Assessment and Rating of Ataxia*. Diese Skala ist eine anhand des Grades der Beeinträchtigung gemessenes, semiquantitatives Bewertungsinstrument der zerebellären Ataxie. Dazu werden acht Gesichtspunkte untersucht, welche die neurologische Manifestation und Ausprägung von ataktischen Symptomen quantifizieren. Untersucht und beurteilt werden: Gangart, Haltung, Sitzen, Sprachstörung, Finger-Folge-Versuch, Finger-Nase-Versuch, Diadochokinese, Knie-Hacke-Versuch, Funktion der Bewegung der Extremitäten. Der erreichte Punktwert auf einer Skala von 0 bis 40 Punkten wird größer, je höher der Grad der Beeinträchtigung durch die ataktischen Symptome ist. Okulomotorische Funktionen werden in der heutigen Fassung der Untersuchung nicht mehr beurteilt. SARA ist eine schnell durchführbare, annähernd lineare Skala mit hoher *Interrater*-Reliabilität und akzeptabler Test-Retest-Reliabilität, die zwar nur eine schwache Korrelation zur Krankheitsdauer zulässt, aber eine gute Einschätzung der Ataxieschwere gibt (Schmitz-Hübsch, et al., 2006). In Zusammenarbeit mit dem Zentrum für Neurologie am Universitätsklinikum Tübingen (Prof. Dr. med. Ludger Schöls, Prof. Dr. Matthis Synofzik) wurden für diese Doktorarbeit folgende Betroffenheitsgrade definiert: nicht betroffen (< 3 Punkte), leicht betroffen (3-12 Punkte), moderat betroffen (13-24 Punkte), schwer betroffen (> 24 Punkte).

INAS, kurz für *Inventory of Non-Ataxia Symptoms*, dient als Ergänzung zu SARA zur Beurteilung der nicht-ataktischen Symptome. Die Skala umfasst eine dimensionslose Wertespannweite von 0 bis 16, wobei auch hier die Werte mit zunehmender Beeinträchtigung steigen. Untersucht werden 30 Teilaspekte, die

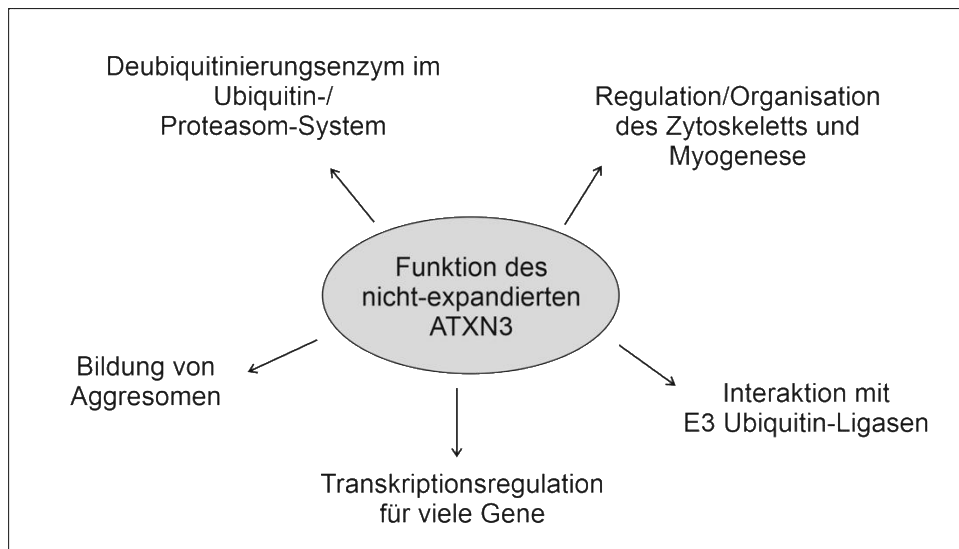
16 Symptomen zugeordnet werden können: Areflexie, Hyperreflexie, Babinski-Zeichen, Spastik, Parese, Muskelatrophie, Faszikulationen, Myoklonus, Steifigkeit, Chorea, Dystonie, Ruhetremor, sensorische Symptome, okulomotorische Zeichen des Hirnstamms (horizontale und vertikale Ophthalmoparese, verlangsamte Sakkaden), Funktionsstörungen des Harntrakts und kognitive Beeinträchtigung (Schmitz-Hübsch, et al., 2008).

Ein weiterer Score namens CSDP, kurz für *Cross-sectional annual disease progression*, errechnet sich aus dem Quotienten des SARA und der Krankheitsdauer (*disease duration*, DD) und erlaubt damit eine Aussage über den Krankheitsverlauf (Wilke, et al., 2018). Im Allgemeinen weisen niedrige CSDP-Werte auf einen langsam progredienten, milden Krankheitsverlauf hin, während hohe CSDP-Werte einen schnell progredienten, schweren Krankheitsverlauf vermuten lassen.

#### **1.1.4 Struktur und Funktion des nicht-expandierten ATXN3**

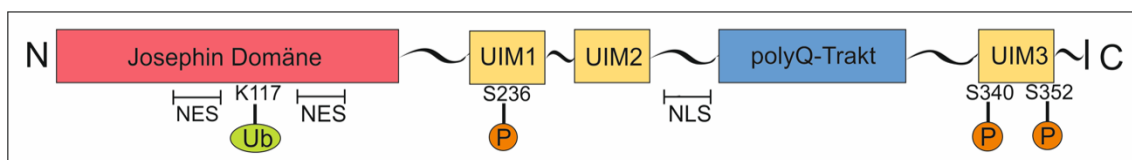
Die mRNA der Referenzisoform des ATXN3-Proteins zählt elf Exone, wobei sich die 10 CAG-Triplets dieser mRNA im Exon 10 befinden (NM\_004993.6, kein Datum). Heute sind 56 *Splicing*-Varianten der ATXN3-RNA bekannt, die auf Exon-*Skipping*, dem Einbau neuer Exone und der Verwendung alternativer *Splicing*-Stellen basieren und zu mindestens 20 verschiedenen Isoformen des ATXN3-Proteins führen (Bettencourt, et al., 2010). ATXN3 ist im Allgemeinen ein im Körper ubiquitär vorkommendes Protein, wobei in einer Studie die ATXN3-Proteinlevel in den Gehirnregionen *Pons*, *Nucleus dentatus* und Kleinhirn regional niedriger waren (Trottier, et al., 1998; Matos, et al., 2011). Zusätzlich ist für SCA3 eine somatische Instabilität in Form von somatischen Mosaiken im Gehirn beschrieben. Dabei zeigt das Genom von Zellen im zerebellären Kortex geringere Anzahl an CAG-Triplets als der frontale Kortex (Rieß, et al., 2008). Innerhalb der Gehirnzellen findet sich das Protein vor allem in den Perikaryen der Neuronen wieder, wobei ATXN3 in geringeren Konzentrationen auch in den Axonen und Zellkernen nachgewiesen wird. Es wird mit verschiedenen, in Abbildung 2 aufgeführten, Stoffwechselwegen in Verbindung gebracht

Zu den wichtigsten zählen die Protein-Homöostase, die Transkription, die Zytoskelettregulation und Myogenese (Matos, et al., 2011).



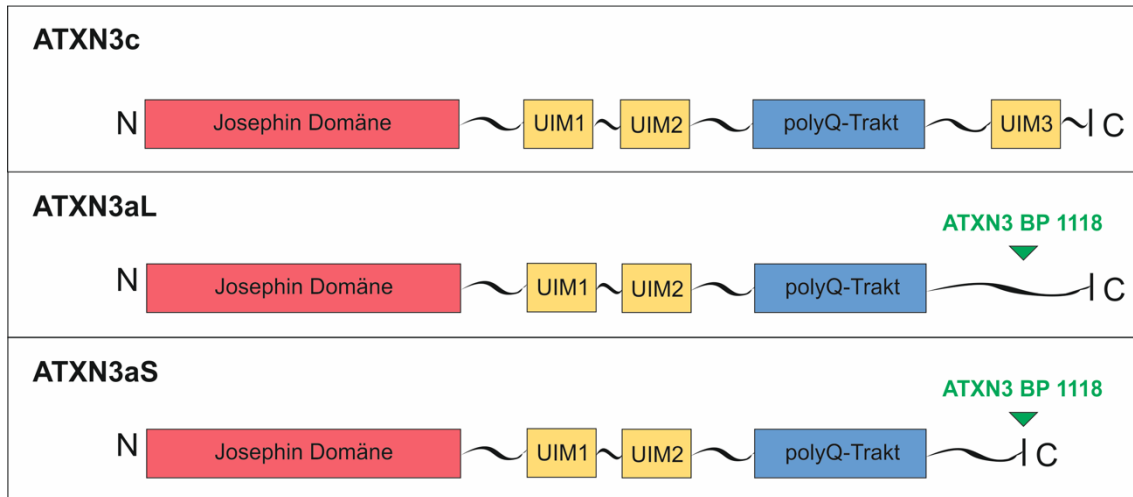
**Abbildung 2: Funktionen des physiologischen, nicht-expandierten ATXN3.** Die Hauptfunktion des Proteins ATXN3, die im Aufbau durch die Josephin Domäne repräsentiert wird, ist die Arbeit als Deubiquitinierungsenzym und Einbindung ins Ubiquitin-Proteasom-System. In diesem Zusammenhang interagiert es auch mit E3 Ubiquitin-Ligasen wie beispielsweise Parkin. Weiterhin ist es als Transportprotein an der Bildung von Aggresomen beteiligt und Transkriptionsregulation für viele Gene, wobei durch deren Einfluss vor allem Aktivatoren der Transkription gehemmt werden. Zuletzt wird die Zellmorphologie (Zytoskelett, Myogenese) von ATXN3 mitkontrolliert, denn Ausschalten des *ATXN3*-Gens führt zu morphologischen Veränderungen und fehlenden Zelladhäsionen (Matos, et al., 2011).

Bezüglich der Protein-Homöostase arbeitet das nicht-expandierte ATXN3 primär als Deubiquitinierungs-Enzym (DUB) und ist vermutlich in das Ubiquitin-Proteasom-System verwickelt (Matos, et al., 2011). Einen ersten *in vivo* Hinweis dafür lieferten die *ATXN3 knock-out* Mäuse von Schmitt et al. (2007), die in allen *knock-out* Geweben erhöhte Level an ubiquitinierten Proteinen aufwiesen. Diese Funktion als Deubiquitinierungs-Enzym spiegelt sich im Aufbau wider, der in Abbildung 3 schematisch dargestellt ist.



**Abbildung 3: Schematischer Aufbau von full-length ATXN3 mit N-terminaler Josephin Domäne (JD) und C-terminalen Proteinschwanz mit zwei bis drei Ubiquitin-interagierende Domänen (UIM) und dem Polyglutamin-Trakt variabler Länge (adaptiert von Matos et al. (2011)).** Innerhalb des Proteins sind *Nuclear export signals* (NES), das *Nuclear localization signal* (NLS), die Aminosäure K117 als Bindestelle für Ubiquitin (Ub) zur posttranslationalen Modifikation und die Aminosäuren S236, S340 und S352 als Positionen für posttranslationale Phosphorylierungen markiert. N = Amino-Terminus, C = Carboxy-Terminus, P = Phosphatgruppe, K = Lysin, S = Serin, Q = Glutamin.

Das Protein enthält N-terminal eine kugelförmige Domäne, genannt Josephin Domäne (JD), die Cystein-Protease Aktivität aufweist, zwei Bindungsstellen für Ubiquitin besitzt und mit ihrer enzymatischen Aktivität Bindungen zwischen Ubiquitin-Molekülen hydrolysiert (Matos, et al., 2011; Durcan & Fon, 2013). Aufgrund der Funktion dieser N-terminal positionierten und hoch konservierten JD, gehört ATXN3 zur sogenannten Josephin DUB Familie, deren vier Mitglieder allesamt Deubiquitinierungsaktivität durch eine JD aufweisen (Eletr & Wilkinson, 2014). C-terminal befindet sich ein variabel konstruierter und mechanisch flexibler Schwanz, der den polyQ-Trakt variabler Länge und je nach Isoform zwei bis drei Ubiquitin-interagierende Domänen (UIMs) enthält (Matos, et al., 2011). Heute sind drei *full-length* Isoformen bekannt. Die beiden Isoformen ATXN3c mit 3 UIMs und ATXN3a mit 2 UIMs entstehen durch alternatives *Splicing*, wobei die im gesunden humanen und murinen Gehirn vorwiegend exprimierte Isoform drei UIMs enthält (Harris, et al., 2010; Weishäupl, et al., 2019). Letztere wird durch das Vorhandensein zweier Varianten eines Einzelnukleotidpolymorphismus am C-terminalen Ende des polyQ-Trakts weiter in eine lange (ATXN3aL) und kurze (ATXN3aS) Proteinisoform (Abbildung 4) eingeteilt (Weishäupl, et al., 2019). Zwei UIMs N-terminal des polyQ-Trakts sind hoch-konserviert, zeigen  $\alpha$ -helikale Struktur und arbeiten während der Interaktion mit Ubiquitin kooperativ zusammen. Das je nach Isoform optionale, dritte UIM befindet sich C-terminal des polyQ-Trakts. Während man beim dritten UIM keine Funktion kennt, gibt es bei den ersten zwei UIMs Anhaltspunkte, dass sie zwar nicht katalytisch aktiv sind, aber polyubiquitinierte Substrate des Enzyms rekrutieren, der Josephin Domäne präsentieren und die Substrate relativ zum katalytischen Zentrum positionieren. Abgebaut werden durch ATXN3 vor allem humane Ubiquitinketten, die aus mehr als vier Monomeren bestehen und über Lysine an der Stelle 48 oder 63 in der Aminosäuresequenz eines Proteins (K48- und K63-*linked*) gebunden sind (Matos, et al., 2011). Trotz verschiedener Konstitutionen der Isoformen sind alle drei *full-length* Isoformen als DUB tätig, die sich laut Harris, et al. (2010) *in vitro* nicht in ihren Enzymaktivitäten unterscheiden. Weishäupl, et al. (2019) konnten hingegen für ATXN3c signifikant geringere DUB-Aktivität nachweisen.



**Abbildung 4: Schematischer Aufbau der drei bekannten *full-length* Isoformen von ATXN3 (adaptiert nach Weishäupl, et al. (2019)).** ATXN3c und ATXN3aL entstehen durch alternatives *Splicing* und unterscheiden sich C-terminal in der Anzahl der Ubiquitin-interagierende Domänen (UIMs). Durch die Varianten des Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) ATXN3 BP 1118, der zum Stopcodon führt, entstehen die zwei Isoformen ATXN3aL und ATXN3aS, die sich in ihrer Länge unterscheiden. BP = Basenpaar, Q = Glutamin, N = Amino-Terminus, C = Carboxy-Terminus.

Der Polyglutamin-Trakt (polyQ-Trakt) im C-terminalen Proteinschwanz besteht aus Wiederholungen der Basentriplets CAG, wobei am 5'-Ende des polyQ-Trakts nach 3 CAG-Triplets eine Unterbrechung durch die Basenabfolge CAA und AAG besteht, die für die Aminosäure Glutamin und Lysin kodieren. Bezüglich der Unterbrechungen der repetitiven Sequenz kann heute gesagt werden, dass die CAA-Unterbrechung am 5'-Ende des polyQ-Trakts wohl keinen Einfluss auf die intergenerationale Instabilität nimmt, denn sie befindet sich sowohl bei den Chromosomen der Kontrollprobanden als auch bei Patienten an der gleichen Position in der genetischen Erbinformation (Maciel, et al., 1999).

Die Regulation der Aktivität von ATXN3 erfolgt durch posttranslationale Modifikationen oder Monoubiquitinierung des Enzyms am Lysin K117 der JD, welche zu einer Steigerung der Enzymaktivität führt (Matos, et al., 2011). Da die genaue Funktion von ATXN3 immer noch unklar ist, erhofft man sich neue Erkenntnisse durch die Identifikation von Interaktionspartnern. Interaktionen mit *p97/valosin-containing protein* (VCP), *HHR23A (UV excision repair protein RAD23 homolog A)* und *HHR23B (UV excision repair protein RAD23 homolog B)* als Teil des ERAD-Systems (*endoplasmic reticulum-associated degradation*) und dem Proteasom an sich, bestärken die These über die Einbindung von ATXN3 ins Ubiquitin-Proteasom-System. ATXN3 ist weiterhin regulierend in die

Bildung von Aggresomen involviert. Dies sind Aggregate von fehlgefalteten Proteinen nahe dem Mikrotubuli-organisierenden Zentrum (MTOC), die durch Lysosomen abgebaut werden. Beobachtet wurden in diesem Zusammenhang Interaktionen von ATXN3 mit Dynein, Histon-Deacetylase 6, Tubulin, *microtubule-associated protein 2* (MAP2). Damit scheint ATXN3 Transportproteine zu stabilisieren und/oder fehlgefaltete Proteine bis zur Ankunft am MTOC zu schützen (Matos, et al., 2011). Darüber hinaus interagiert ATXN3 mit diversen E3 Ubiquitin-Ligasen: CHIP (C-Terminus des Hsc70-interagierenden Proteins), PARK2 (Parkin), E4B, Hrd1 (*HMG-CoA reductase degradation protein 1*), gp78 (Glycoprotein 78) und MITOL (*membrane-associated ring finger (C3HC4) 5*) (Matos, et al., 2011; Durcan & Fon, 2013). Diese Enzymfamilie bildet Isopeptidbindungen zwischen Ubiquitin-Molekülen und/oder Lysinen von Zielproteinen. Forscher vermuten eine gegenseitige Regulation dieser Enzymfamilie und ATXN3. Die Ubiquitinierung von ATXN3 durch E3 Ubiquitin-Ligasen verändert die Aktivität von ATXN3 und fördert den Abbau des Proteins. ATXN3 verändert im Gegenzug Polyubiquitinketten an Proteinen, die durch E3 Ubiquitin-Ligasen an Zielproteine angehängt wurden oder die Ubiquitinierung der E3 Ubiquitin-Ligasen an sich (Matos, et al., 2011).

Im Zusammenhang mit der Transkription fungiert ATXN3 als Transkriptionsregulator vieler Gene, die vor allem für die Zellstruktur und Signaltransduktion und im Ubiquitin-Proteasom-System von Bedeutung sind. Das Protein interagiert durch seine C-terminale Region mit drei Transkriptionsaktivatoren (CBP, p300, PCAF) und hemmt die durch diese Aktivatoren ausgelöste Transkription. Durch eine der UIMs kommt es zu Wechselwirkungen mit zwei Transkriptionsrepressoren (HDAC3, NCor), die für verminderte Histon-Acetylierung und damit verminderte Repression der Transkription sorgen. Die direkte Interaktion mit Histonen mittels der N-terminalen Region von ATXN3 unterdrückt ebenfalls die Histon-Acetylierung durch Blockierung der Histon-Acetylierungsstellen (Matos, et al., 2011).

ATXN3 scheint darüber hinaus wichtig zu sein für die Regulation und Organisation des Zytoskeletts und der Myogenese. Das Ausschalten von ATXN3 führt zu morphologischen Veränderungen in Zelllinien, die sich unter anderem als Des-

organisation der Bestandteile des Zytoskeletts, als auch durch fehlende Zelladhäsionen bemerkbar machen – zwei Zustände, die zu vermehrtem Zelltod führen. Auch die physiologische Differenzierung von Vorläuferzellen in ausgereifte Zellenlinien ist bei Abwesenheit von ATXN3 behindert, was vor allem an der insuffizienten Zytoskelett-Remodellierung und fehlenden Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen liegen könnte. ATXN3 sorgt physiologisch im Zuge der Myogenese für ausreichend hohe Level an benötigtem  $\alpha$ 5- und  $\alpha$ 7-Integrin (Matos, et al., 2011). Auf biologischer Ebene ist *in vivo* in verschiedenen *knock-out* Mausmodellen durch die Abwesenheit von nicht-expandiertem ATXN3 weder eine eingeschränkte Lebensfähigkeit, noch Zeugungsfähigkeit zu beobachten. Die Mäuse zeigten keine Verhaltensauffälligkeiten, Zeichen der Neurodegeneration oder motorischen Einschränkungen. In der Konsequenz geben diese *knock-out* Mäuse keinen Anlass für die Vermutung, dass die Abwesenheit von nicht-expandiertem, physiologischem ATXN3 zur Pathologie von SCA3 beiträgt (Schmitt, et al., 2007; Switonski, et al., 2011). Im Kontrast dazu gehen andere Forscher davon aus, dass physiologisches ATXN3 in heterozygoten Mutationsträgern neuroprotektive Wirkung hat, denn die doppelte Gendosis in homozygoten Mutationsträgern führt im Allgemeinen zu verfrühtem AAO und verstärkter klinischer Symptomatik (Lang, et al., 1994). Die Anwesenheit von nicht-expandiertem ATXN3 führte *in vitro* außerdem zur absoluten Reduktion von Aggregaten pathogenetischer Relevanz (Weishäupl, et al., 2019).

Die Lokalisation innerhalb der Zelle scheint wichtig für die Funktion des Proteins zu sein. In humanen Gehirnzellen findet man es vor allem in den Perikaryen wieder. ATXN3 wird aktiv über die Kernhülle transportiert. Für den Import in den Zellkern ist ein *nuclear localization signal* (NLS) N-terminal des polyQ-Trakts verantwortlich, für den Export zwei *nuclear export signals* (NES) in der JD. Die Phosphorylierung von drei Serinen (S236, S340 und S352) durch eine *casein kinase 2* (CK2) führt zu vermehrtem Transport von ATXN3 in den Zellkern und zu vermehrter Repression von ATXN3-modulierter Transkription. Auch proteotoxischer Stress führt zu vermehrter Lokalisation des Proteins im Zellkern (Matos, et al., 2011).



Abgebaut wird polyubiquitiniertes ATXN3 im Ubiquitin-Proteasom-System und durch Autophagie. E3 Ubiquitin-Ligasen fördern wie oben erwähnt die Ubiquitinierung und den Abbau von ATXN3, während die Phosphorylierung von S340 und S352 den Abbau bremst. Auch die eigene katalytische Aktivität des Proteins scheint sich auf die Lebenszeit auszuwirken. So zeigt katalytisch inaktives ATXN3 längere Halbwertszeiten und damit höhere Konzentrationen in der Zelle (Matos, et al., 2011). Die proteolytische Fragmentierung vermindert im Allgemeinen die Löslichkeit von ATXN3, unabhängig von polyQ-Trakt-Länge und Isoform (Weishäupl, et al., 2019).

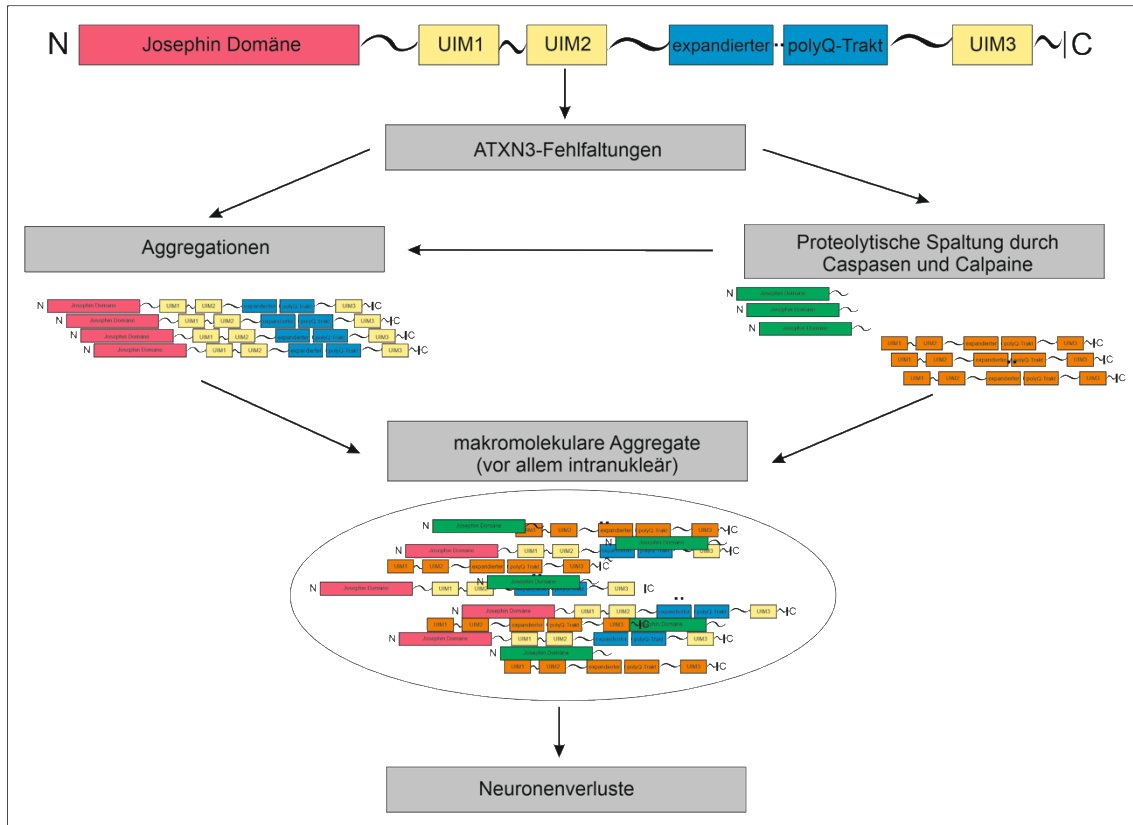
### **1.1.5 Expandiertes ATXN3 und Pathogenese von SCA3**

Die genaue Funktion des Proteins ATXN3 ist bis heute nicht bekannt. Die Pathogenese der Krankheit resultiert vermutlich aus einer Kombination aus Proteindysfunktion und Proteinaggregation (Matos, et al., 2011) und ist nach einer neuen Studie abhängig von der vorliegenden *full-length* ATXN3-Isoform (Weishäupl, et al., 2019).

Die Proteindysfunktion hat ihren Ursprung im mutierten *ATXN3-Gen* mit einem durch diese Mutation verlängerten polyQ-Trakt und Fehlfaltungen des ATXN3-Proteins. Für dessen Einfluss gibt es vielerlei Hypothesen. Dazu gehören Funktionsveränderungen und der Übergang des Proteins in einen aggregatanfälligen Zustand, der zu toxischen Oligomeren führt (Abbildung 5). Zu Funktionsveränderungen gibt es viele Studien mit unklaren und sich widersprechenden Ergebnissen. Expandiertes ATXN3 könnte Störungen im System der Proteinhomöostase auslösen, indem der Umsatz und der Abbau wichtiger Moleküle verändert wird. Stabilere Interaktionen zwischen dem expandiertem ATXN3 und Substraten könnten die Proteinaggregation begünstigen. Weiterhin wird die Entstehung von toxischen polyQ-enhaltenden Spaltungsfragmenten durch die proteolytische Spaltung durch Caspasen und Calpain Proteasen divers diskutiert (Abbildung 5) (Matos, et al., 2011). Expandiertes ATXN3 scheint außerdem die Transkription zu beeinflussen. Auf der einen Seite kommt es zur Anreicherung von Transkriptionsfaktoren in polyQ-reiche Inklusionen, auf der anderen Seite verändert sich die Interaktion zwischen Transkriptionsfaktoren

und deren Koaktivatoren (Rapaso & Lima, 2018). Für Zellen mit expandiertem ATXN3 wurde eine allgemein höhere Transkriptionsrate nachgewiesen. Ursächlich könnte eine verminderte Histonacetylierung oder ein eingeschränktes Vermögen von expandiertem ATXN3 sein, mit Transkriptionsrepressoren zu interagieren. Eine weitere Theorie vermutet vermehrten proteotoxischen Stress der Zelle durch Störungen der Qualitätskontrollsysteme wie dem Proteasom oder der Chaperone. Zellulärer Stress steigert durch vermehrte Ubiquitinierung nicht nur die Aktivität von ATXN3, sondern erhöht auch den aktiven Transportmechanismus des Proteins in den Zellkern (Matos, et al., 2011). Nukleäre Lokalisation wiederum schützt ATXN3 vor dem Abbau, erhöht vermeintlich die Toxizität des Proteins im Zellkern und ist für Manifestation von SCA3-Symptomen unbedingt erforderlich (Bichelmeier, et al., 2007; Matos, et al., 2011; Klockgether, et al., 2019). Darüber hinaus gibt es Anhaltspunkte für mitochondrielle Dysfunktionen durch expandiertes ATXN3 und seine Spaltprodukte (Matos, et al., 2011; Weishäupl, et al., 2019). In einer Studie von Harmuth et al. (2018) sorgte die Expression eines durch Calpaine erzeugten ATXN3-Spaltprodukts für mitochondrielle Fragmentierung mit Insuffizienz mitochondrialer Respiration und erhöhter Anfälligkeit der Zelle für Apoptose. Trotz weiterbestehenden großen Unklarheiten ist insgesamt durch eine Korrelation von Proteinaggregation und CAG-Länge klar, dass strukturelle Proteinveränderungen durch ein mutiertes *ATXN3* und Proteinaggregation die Grundlage der Pathogenese von SCA3 sein müssen (Klockgether, et al., 2019).

Im Rahmen der Erkrankung beobachtet man die Entstehung von makromolekularen, Amyloid-artigen Proteinaggregaten oder -inklusionen des expandierten und fehlgefalteten ATXN3 im Zellkern und des Axon-Zytoplasmas von Neuronen (Abbildung 5) (Matos, et al., 2011).



**Abbildung 5: Vereinfachtes Schema des Einflusses von expandiertem ATXN3 auf Protein-Ebene.** Der expandierte polyQ-Trakt führt zu Fehlfaltungen des ATXN3-Proteins und zeigt eine erhöhte Aggregationstendenz. Durch zusätzlichen Abbau durch Caspasen und Calpaine entstehen toxische polyQ-enhaltenden Spaltungsfragmenten des ATXN3, die ebenfalls zu makromolekularen Aggregaten vor allem im Kleinhirn und Hirnstamm beitragen. Diese führen zu Neuronenverlusten und zum progredienten Krankheitsbild der SCA3 mit ataktischen und nicht-aktaktischen Symptomen. UIM = Ubiquitin-interagierende Domänen, N = Amino-Terminus, C = Carboxy-Terminus, Q = Glutamin.

In der Literatur herrscht heute noch keine Einigkeit über den Ursprung und die Rolle der Aggregate (Klockgether, et al., 2019). Vermutet wird, dass sowohl nicht-expandiertes ATXN3 als auch expandiertes ATXN3 zu den Ursprüngen dieser Proteinaggregate beitragen, da auch nicht-expandiertes ATXN3 geringe und langsame Tendenz zu Zusammenlagerung zeigt. Verantwortlich dafür ist die JD, deren Gleichgewicht zwischen Funktionalität und Aggregationstendenz durch den C-terminalen Schwanz und außenstehende Interaktoren moduliert wird (Matos, et al., 2011). Unabhängig von ATXN3-Isoformen führt ein expandierter polyQ-Trakt zur verlängerten Halbwertszeit und vermehrten Unlöslichkeit des Proteins, was Aggregationen begünstigt (Weishäupl, et al., 2019). Die Unterschiede zwischen *full-length* ATXN3-Isoformen mit verschiedener Anzahl an UIMs im variabel zusammengesetzten C-terminalen Schwanz, haben bedeutenden Einfluss auf die Aggregation und den Abbauweg des Proteins ATXN3

(Harris, et al., 2010). *In vivo* ist ATXN3c mit drei UIMs die im zentralen Nervensystem vorherrschende Isoform, wohingegen die ATXN3a Isoformen mit zwei UIMs nur gering exprimiert werden. Bei SCA3-Patienten mit expandiertem polyQ-Trakt kommt jedoch vermehrt, aber nicht ausschließlich, die Isoform ATXN3aS vor, die durch eine Variante des SNP ATXN3 BP 1118 (siehe Abbildung 4) generiert wird. Diese Isoform zeigt *in vitro* eine signifikant erhöhte Aggregationstendenz gegenüber den anderen Isoformen (Weishäupl, et al., 2019), sodass sogar in Zellen mit nicht-expandiertem polyQ-Trakt die 2UIM-Isoformen, absolut gesehen, zu mehr Aggregaten führen (Harris, et al., 2010). Passend zur Aggregatbildung sind die Isoformen ATXN3aS und ATXN3aL auch schlechter löslich. Innerhalb der Zelle ist ATXN3aS im Kontrast zu beiden anderen Isoformen vermehrt nukleär zu finden (Weishäupl, et al., 2019). Forschungen zum Abbauweg der Isoformen ergaben widersprüchliche Ergebnisse. Laut Harris, et al. (2010) unterliegen 2UIM-Isoformen einem beschleunigten proteasomalen Abbau, wohingegen 3UIM-Isoformen vor allem mit Hilfe von Makroautophagie abgebaut werden. Die Forschungen von Weishäupl, et al. (2019) deuten im Gegensatz darauf hin, dass ATXN3c und ATXN3aL durch Autophagie abgebaut werden und der SNP in ATXN3aS einen zusätzlichen proteasomalen Abbau ermöglicht, was unabhängig von der polyQ-Trakt-Länge zur geringeren Halbwertszeit von ATXN3aS passt. Die verschiedenen *full-length* Isoformen unterscheiden sich demnach in Stabilität, Aggregationskinetik, Löslichkeit, Lokalisation in der Zelle und Degradation. Durch unterschiedliche Häufigkeitsverteilungen der Isoformen zwischen Kontrollprobanden und Mutationsträgern, insbesondere der vermehrten Expression von ATXN3aS bei SCA3-Patienten, sollte ihre Relevanz für die Pathogenese nicht unterschätzt werden.

In den Aggregaten lassen sich neben ATXN3 auch andere Proteine des Qualitätskontrollsystems einer Zelle finden: Proteasom-Bestandteile, Ubiquitin und Chaperone. Abnormale  $\beta$ -Faltblattformen des expandierten Proteins und die Bildung von Superspiralisierungen begünstigen Aggregate von expandiertem ATXN3. Durch Interaktionen mit weiteren superspiralisierten Proteinen (z.B. CHIP) werden diese ebenfalls in nukleäre Aggregate eingeschlossen und die Zellhomöostase weiter gestört. Die beschleunigte Aggregationskinetik von ex-

pandiertem ATXN3 gegenüber nicht-expandiertem ATXN3, das Zusammenbrechen von zellinternen Qualitätskontrollsystemen und geregelter Transkription und das Auftreten von abnormalen Proteininteraktionen, könnten im Zusammenspiel eine Erklärung für intrazelluläre Aggregate in Neuronen sein (Matos, et al., 2011).

Aggregate führen über bis heute ungeklärte Wege zu Neuronenverlusten in Kleinhirnseitenstrangbahnen und im *Nucleus dentatus* des Kleinhirns, in der *Substantia nigra*, im *Striatum*, im *Thalamus*, in den *Nuclei pontis*, im Rückenmark und in Teilen des *Rhombencephalons*, insbesondere *Locus coeruleus* und *Nuclei vestibulares*. Dazu kommen Verluste von neuronalen Leitungsbahnen im visuellen, auditiven, vestibulären, somatosensorischen System und im Verdauungs- und Harnausscheidungstrakt (Matos, et al., 2011). Trotz bedeutender Neurodegeneration in der *Substantia nigra*, wobei hier vor allem die Melanin enthaltenden, dopaminergen Neuronen der Neurodegeneration zum Opfer fallen, zeigt nur ein geringer Anteil der SCA3-Patienten Parkinson-ähnliche Symptome. Im Verdacht stehen hierfür zum einen kompensatorische Mechanismen der erhaltenen dopaminergen Neurone, zum anderen ein kompensatorischer Untergang der Neurone im *Nucleus subthalamicus* (Klockgether, 2015; Schöls, et al., 2015). Aufgrund des fehlenden Wissens über die genaue Funktion des Proteins, lässt sich über die Ursache und die Selektivität des Neuronenverlusts nur spekulieren. Im Allgemeinen kann Zellselektivität beispielsweise durch posttranslationale Modifikationen erklärt werden, die wiederum auch Auswirkung auf die Aktivität, Lokalisation und Stabilität eines Proteins haben. Während die frühere Vermutung war, dass die Aggregate alleine ursächlich für den Zelltod sind, deuten neuere Forschungen daraufhin, dass vielmehr zelluläre Abwehrmechanismen gegen die toxischen, expandierten Proteine für den Neuronenverlust verantwortlich sind (Matos, et al., 2011).

### **1.1.6 Biomarker als diagnostische Methode bei SCA3**

#### **1.1.6.1 Was ist ein Biomarker?**

Die *Biomarker Definitions Working Group* definiert einen Biomarker als ein Charakteristikum, das objektiv gemessen und evaluiert ein Indikator für normale

biologische Prozesse, pathologische Prozesse oder pharmakologisches Ansprechen auf therapeutische Interventionen darstellt (Biomarkers Definitions Working Group, 2001). Unterschieden werden muss zwischen den sogenannten Traitmarkern und Statemarkern (Weir, et al., 2011).

Traitmarker geben Auskunft über Anwesenheit oder Abwesenheit einer Erkrankung, z.B. in Form einer genetischen Mutation (Weir, et al., 2011). Darüber hinaus können damit *modifier*-Gene gemeint sein. Ihre Kenntnis erlaubt es, mit Medikamenten in spezielle Stoffwechselwege einzugreifen, Patienten durch ihren Genotyp den passenden Therapieweg zuzuweisen oder das AAO genauer zu prognostizieren (Rapaso & Lima, 2018).

Statemarker lassen Rückschlüsse auf die Schwere der Pathologie und damit der Erkrankung zu. Für die Forschung, Diagnostik und Prognostik an neurologischen Erkrankungen wie SCA3 oder Chorea Huntington werden sensitive Statemarker benötigt, um einzelne Krankheitsstadien einzufangen und Aussagen über das Fortschreiten einer Krankheit machen zu können. Ein idealer Statemarker ist quantifizierbar, reproduzierbar und unbeeinflusst von möglichen Komorbiditäten, die nicht im Zusammenhang mit der Krankheit von Interesse stehen. Zusätzlich zeigt er in Kontrollpopulationen kaum Variabilität (Weir, et al., 2011).

#### **1.1.6.2 Welche Biomarker kommen für SCA3 in Frage?**

Der wichtigste Traitmarker für SCA3 ist die CAG-Länge, d.h. die Anzahl der CAG-Triplets. Die primäre Identifikation von Mutationsträgern im präsymptomatischen Stadium erlaubt erst das medizinische Begleiten der Mutationsträger und wiederholte Untersuchungen während des progredienten Krankheitsverlaufs. Die Anzahl der CAG-Triplett-Wiederholungen trägt laut Forschungen mit 55,2 % zum AAO bei (de Mattos, et al., 2018). Für die restlichen Prozentpunkte kommen Umwelt- und genetische Faktoren in Betracht (vgl. 1.1.3). Aus genetischer Sichtweise wurden in der Vergangenheit einige potenzielle *modifier*-Gene von SCA3 untersucht: die Anzahl der CAG-Triplett-Wiederholungen an verschiedenen Stellen im Genom; Allel-Varianten in Genen kodierend für Interleukin-6, Apolipoprotein E, Glycosylceramidase  $\beta$ ; Genvarianten am 3'-UTR von

*ATXN3* und die Größe des nicht-expandierten *ATXN3*-Allels (Rapaso & Lima, 2018).

Als Statemarker stehen für SCA3 (potenzielle) Biomarker aus verschiedenen Bereichen zur Verfügung. Dazu gehören unter anderem *Neuroimaging*-Biomarker, d.h. Biomarker erhoben in neurologischen bildgebenden Verfahren, okulomotorische Marker und molekularbiologische Marker.

Heute sind *Neuroimaging*-Biomarker die aussagekräftigsten Statemarker, die bis jetzt validiert wurden. In MRT-Untersuchungen werden für verschiedenste Formen von neurologischen Erkrankungen spezifische Muster der Gehirnatrophie *in vivo* beschrieben und in postmortalen Studien bestätigt. Bei SCA3-Patienten beobachtet man Gehirnatrophien insbesondere im Bereich von Kleinhirn und Brücke und Atrophien des Rückenmarks im Bereich der Halswirbelsäule. Darüber hinaus zeigen sich Veränderungen des neurochemischen Profils, das mit Magnetresonanzspektroskopie aufgezeichnet wurde und interessanterweise statistisch signifikant mit SARA korreliert. So lassen sich ferner in SCA3-Patienten niedrigere Spiegel von N-Acetylaspartat und Glutamat in Kleinhirnwurm und Brücke als Zeichen des Neuronenverlusts nachweisen. Erhöhte Spiegel von Myo-Inositol deuten auf eine Gliose hin. Spezifisch für frühe Phasen von SCA3 ist zusätzlich die Reorganisation des motorischen Neuronennetzwerks, die als potenzieller *Neuroimaging*-Biomarker gilt und im funktionellen MRT aufgezeichnet wird (Coarelli, et al., 2018).

Veränderungen der Augenmotorik, die vor allem in frühen Phasen der Erkrankung und sogar in der präsymptomatischen Phase auftreten, werden als okulomotorische Biomarker bezeichnet. Für SCA3 werden im Vergleich zu Kontrollprobanden größere Zahlen von Blick-evozierten Nystagmusschlägen, beeinträchtigte vertikale Blickfolge-Tests, *Square-Wave Jerks* bei zentraler Fixation, langsame Sakkaden und eine größere Anzahl von falschen Anti-Sakkaden beobachtet (Coarelli, et al., 2018; Furtado, et al., 2019).

Bis zur Gegenwart sind keine molekularbiologischen Biomarker sicher identifiziert (Coarelli, et al., 2018). Ihre Identifikation hätte den Vorteil, bereits im präsymptomatischen Stadium prognostische Aussagen treffen zu können, die

Sensitivität der Messung der Krankheitsprogression enorm zu steigern und feinste Therapieerfolge als Surrogatmarker sichtbar zu machen. Diese Vorteile allein unterstreichen die Relevanz der Biomarkerforschung für die Erkrankung SCA3 (Rapaso & Lima, 2018). Im Rahmen einer neurodegenerativen Erkrankung ergibt es Sinn, krankheitsspezifische Biomarker zu finden, die den Grad der Neurodegeneration messen können. Proben aus dem Gehirn und Rückenmark können bzw. sollten am lebenden Patienten nicht untersucht werden, so dass lediglich *post mortem* Analysen möglich wären, die somit jedoch kein Potenzial als Statemarken haben. Weiterhin sind Biomarker im Liquor denkbar, in den im Zuge der Neurodegeneration Biomarker freigesetzt werden könnten. Seine Gewinnung geht allerdings mit erhöhtem Komplikationsrisiko einher. Der einfachste und komplikationsärmste Zugangsweg zu Biomarkern wären das Serum bzw. Plasma des peripheren Blutes. Hier muss allerdings für jeden Biomarker geprüft werden, ob ein Übertritt des Biomarkers von Liquor ins Blut erfolgt und die Messung somit repräsentativ ist. Da über die Rolle von ATXN3 im biologischen Organismus noch keine Klarheit herrscht, gibt es eine Fülle von Forschungsansätzen, die Moleküle aus verschiedensten Stoffwechselwegen als potenzielle Biomarker in Augenschein nehmen.

Aktuelle Forschungen beschäftigen sich beispielsweise mit Veränderungen in der Transkription. Bei Untersuchungen zu krankheitsspezifischen transkriptionellen Veränderungen im peripheren Blut wurden transkriptionelle Dysregulationen von Genen entdeckt, die in Entzündungsprozesse und Zellsignalisierungswege verwickelt sind oder für Zelloberflächenproteine kodieren. Zusammenfassend waren die Gene *FCGR3B*, *P2RY13* und *SELPLG* maßgeblich hochreguliert, wohingegen die Gene *HSPB1* und *BCL2* herunterreguliert waren (Rapaso & Lima, 2018; Furtado, et al., 2019). Weitere Studien beschäftigen sich mit der Integrität und Funktion von Mitochondrien. Eine geläufige Deletion in mitochondrialer DNA (m.8470\_13446del4977) wurde bei Mutationsträgern signifikant häufiger gefunden als bei Kontrollprobanden. Zusätzlich ließ sich eine statistisch signifikante, inverse Korrelation zwischen der Anzahl der CAG-Triplett-Wiederholungen und der Häufigkeit der oben genannten Deletion feststellen (Rapaso & Lima, 2018). Auf Störungen im Zellzyk-



lus weisen einige Beobachtungen hin, die auf potenzielle molekularbiologische Biomarker hoffen lassen. So zeigen sich erniedrigte *SIRT1* mRNA-Level in SCA3-Mäusen und Fibroblasten von SCA3-Patienten im Vergleich zu entsprechenden Kontrollprobanden. Kalorische Einschränkungen bei der Ernährung oder die Applikation des neuroprotektiven Medikaments Resveratrol erhöhten die SIRT1-Spiegel in Mäusen, verminderten die Zeichen der Neuroinflammation und Autophagie und induzierten motorische Verbesserungen. Als Zeichen der Imbalance zwischen Autophagie und Apoptose gelten erhöhte Beclin-1-Werte und ein vermindertes Proteinverhältnis von BCL2/BAX in präsymptomatischen SCA3-Patienten verglichen mit gesunden Kontrollprobanden. Durch verminderte Aktivität der zwei Enzyme Superoxid-Dismutase und Gluthation-Peroxidase bei symptomatischen SCA3-Patienten gegenüber asymptomatischen SCA3-Patienten kommt es zum erhöhten Auftreten von reaktiven Sauerstoffspezies durch insgesamt verminderte antioxidantische Kapazität von Zellen. Als Beweis für gesteigerte Inflammation stehen erhöhte Zytokinwerte (Interleukin-1B und Interleukin-6), genauso wie eine erhöhte Anzahl aktivierter Mikroglia und reaktiver Astrozyten im Gehirn (Coarelli, et al., 2018). Auch das Level des Zytokins Eotaxin, das durch Astrozyten produziert wird, scheint verändert. So bestimmte man bei präsymptomatischen Mutationsträgern wesentlich höhere Eotaxin-Spiegel als bei symptomatischen Mutationsträgern und Kontrollprobanden (Coarelli, et al., 2018; Furtado, et al., 2019). Der Eotaxin-Spiegel korreliert damit invers mit der Krankheitsprogression, jedoch nicht mit der Krankheitsdauer oder klinischen Bewertungssystemen (Furtado, et al., 2019). Die Level des Enzyms *serum neuron-specific enolase* (NSE) im Serum waren in einigen Studien bei Mutationsträgern signifikant höher als bei Kontrollprobanden. NSE gilt als Marker für neuronale Diskontinuität, sodass erhöhte Level mit neuronalem Zelltod in Verbindung gebracht werden (Furtado, et al., 2019). Kürzlich wurden darüber hinaus veränderte Expressionslevel von sogenannten *long non-coding RNAs* (lncRNAs) als Biomarker vorgeschlagen. In ihrer Rolle der Genregulation sind sie maßgeblich in Zellwachstum, -differenzierung und -funktion beteiligt und ihre Expressionslevel auch in anderen neurodegenerativen Erkrankungen verändert. Insbesondere sechs signifikant hoch- bzw. runterregulierte lncRNAs wur-

den in SCA3 entdeckt, die in die Funktion und Integrität des Nervensystems eingebunden sind. Sie gelten als potenzielle Biomarker oder sogar therapeutische Ziele für SCA3 (Li, et al., 2019). Zuletzt gelten Neurofilament-Leichtketten (NfL) als Teil des Zytoskeletts von Neuronen als potenzieller Biomarker für neurodegenerativen Erkrankungen. Erhöhte NfL-Proteinlevel im Liquor und Serum konnten bereits für verschiedene Erkrankungen wie Chorea Huntington (Byrne, et al., 2018), die Alzheimer Krankheit (Peischle, et al., 2019) und diverse spinocerebelläre Ataxien unter anderen SCA3 (Wilke, et al., 2018; Wilke, et al., 2020) nachgewiesen werden. Dabei wurde bereits in mehreren Studien verifiziert, dass die NfL-Proteinlevel in Liquor und Serum vergleichbar hoch sind und somit eine einfache periphere Messung des Biomarkers möglich ist (Li, et al., 2019; Peischle, et al., 2019). Mit NfL eng verbunden sind die phosphorylierten schweren Ketten des Neurofilaments (pNfH), deren Freisetzung ebenfalls im Rahmen von Neurodegeneration aus geschädigten Neuronen stattfindet (Wilke, et al., 2020). Sowohl NfL als auch pNfH waren in diesen Studien in SCA3-Mutationsträgern gegenüber Kontrollprobanden im Serum erhöht, insbesondere bereits einige Jahre vor dem Krankheitsbeginn (Wilke, et al., 2018; Wilke, et al., 2020) und sind somit ebenfalls als potenzielle prognostische Statemarker für SCA3 in Betracht zu ziehen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Forschung, Diagnostik und Behandlung sich bei SCA3 bis heute auf klinische Bewertungssysteme stützen, die im gewissen Ausmaß subjektiv sind und die, in kurzen Zeitabschnitten angewendet, unempfindlich für kleine Veränderungen des Patienten oder seiner Symptomatik sind. Diese Tatsache macht es nötig, neue molekularbiologische Statemarker zu finden und sie in Längsschnittstudien zu verifizieren. Ein Komplex aus molekularbiologischen, klinischen und *Neuroimaging*-Markern könnte am Ende der einzig mögliche Weg sein, die einzelnen Facetten von SCA3 in seiner Entwicklung vom präsymptomatischen ins symptomatische Stadium in seiner Gesamtheit zu erfassen und zu begleiten (Rapaso & Lima, 2018).

### **1.1.6.3 Expandiertes ATXN3 als potenzieller Statemarker**

Die Nutzung von expandiertem ATXN3 als molekularbiologischer Biomarker liegt nah, da Veränderungen der Struktur und Funktion des Proteins direkt aus

dem Mutationsereignis folgen. In der Theorie kann man sich ähnlich zu den Forschungen um NfL vorstellen, dass im Rahmen des Neuronenuntergangs die ATXN3-Konzentrationen im Liquor und schließlich im peripheren Blut steigen. Im transgenen Mausmodell wurde im Zuge der Krankheitsprogression die Tendenz zum Rückgang von löslichem, expandiertem ATXN3 (70 Q) bei der Untersuchung von Homogenaten und Lysaten des Gehirns nachgewiesen. Wo in Lysaten des gesamten Gehirns zwischen von Mäusen mit 12 und 22 Lebensmonaten mittels *Time-resolved fluorescence energy transfer* (TR-FRET) kein Unterschied von löslichem, expandiertem ATXN3 messbar war, zeigte sich vor allem für das Pathogenese-relevante Kleinhirn eine deutliche Reduktion des Proteins. Gleichzeitig wurden bei 22 Monate alten Mäusen in Neuronen des Kleinhirns anzahlmäßig mehr und signifikant größere Proteinaggregate im Vergleich zu 12 Monate alten Mäusen nachgewiesen. Wie bereits für Chorea Huntington beschrieben, deckten die Forscher eine inverse Korrelation zwischen löslichem Krankheitsprotein in selektiven Gehirnregionen und der Aggregat-Formation in Neuronen auf und suggerierten, dass das Level von löslichem ATXN3 im Gehirngewebe mit der Krankheitsprogression korreliert und damit einen potenzieller Biomarker für SCA3 darstellt (Nguyen, et al., 2013).

### **1.1.7 Mit SCA3 assoziierte Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs)**

#### **1.1.7.1 Definition von SNPs**

Einzelnukleotidpolymorphismen sind genetische Varianten der DNA, bei der sich beide Allele in lediglich einer einzelnen Nukleotidbase unterscheiden. Mit einem Anteil von 90 % sind SNPs die häufigsten Formen von genetischen Variationen im humanen Genom (Collins, et al., 1998). Man findet sie im Genom mit einer Gesamtfrequenz von 1 SNP in 1000 Nukleotidbasen (Taillon-Miller, et al., 1998). Die Auswirkungen dieser einzelnen Basensubstitutionen sind unterschiedlich: Während ca. die Hälfte der SNPs stumme Mutationen sind und zu keiner Veränderung der Aminosäureabfolge führen, sind ca. 50 % der SNPs *Missense*-Mutationen, in deren Folge eine Aminosäure durch eine andere ersetzt wird (Wang & Moulton, 2001). Vor allem in kodierenden oder regulatorischen Regionen des Genoms können SNPs funktionelle Auswirkungen auf Proteine

haben, die sich beispielsweise in Veränderungen der Proteinstabilität, -faltung und -funktion, aber auch ihrer Ligandenbindung, ihrer Katalyse, ihrer Regulation, der posttranslationalen Modifikation, der Interaktion mit Partnern und ihrem Abbau bemerkbar machen (Collins, et al., 1998; Wang & Moulton, 2001; Teng, et al., 2009). Obwohl die meisten SNPs die Genfunktion alleine nicht beeinträchtigen, geht man davon aus, dass über Kopplungsungleichgewichte über mehrere hundert Kilobasen auch stille Mutationen Marker für SNPs sind, die die Genfunktion verändern (Collins, et al., 1998). In manchen Fällen von *Missense*-Mutationen können im Rahmen von veränderter Proteinfunktion und Aggregation (mono-)genetische Krankheiten entstehen (Wang & Moulton, 2001).

### 1.1.7.2 Welche SNPs wurden im Rahmen der Promotion zu SCA3 untersucht?

In den letzten Jahrzehnten wurde viel an der Identifikation und Bedeutung von SNPs geforscht. Heute sind mehrere Millionen Einzelnukleotidpolymorphismen bekannt. Dazu zählen unter anderem vielzählige SNPs im Gen *ATXN3*, die potenziell in kausaler oder regulatorischer Verbindung mit SCA3 stehen könnten. Im Rahmen dieser Promotion wurden drei SNPs untersucht, die aufgrund ihrer Häufigkeit in der globalen Population am ehesten von Interesse für SCA3 sein könnten. Eine Übersicht liefert Tabelle 1, sowie Abbildung 6.

**Tabelle 1: Drei untersuchte, häufige SNPs im Gen *ATXN3* von potenziellem Interesse für SCA3, ihre Referenz SNP ID Nummer und der stattfindende Basenaustausch.** G = Guanin, A = Adenin, C = Cytosin, T = Thymin, Val = Valin, Met = Methionin, Gly = Glycin, Arg = Arginin, Trp = Tryptophan, Tyr = Tyrosin, BP = Basenpaar.

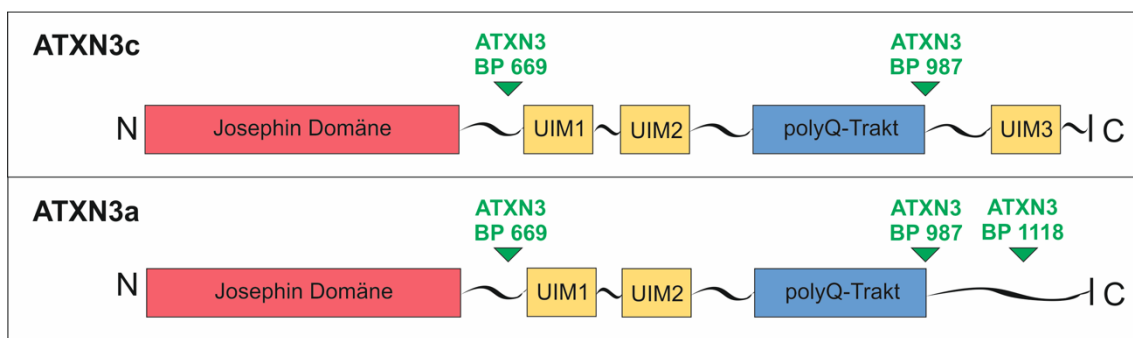
Name	Referenz SNP ID Nummer	Gen	Basenaustausch	Aminosäurenaustausch
ATXN3 BP 669	rs1048755	<i>ATXN3</i>	G → A	Val → Met
ATXN3 BP 987	rs12895357	<i>ATXN3</i>	G → C/A/T	Gly → Arg/Arg/Trp
ATXN3 BP 1118	rs7158733	<i>ATXN3</i>	C → A/T	Tyr → Stopp/Tyr

Der Einzelnukleotidpolymorphismus  $\underline{A}^{669}\text{TG}/\underline{G}^{669}\text{TG}$  (im Folgenden auch ATXN3 BP 669) befindet sich an Basenpaarposition 669 im Exon 8 des Gens *ATXN3* auf Chromosom 14 des menschlichen Genoms (chr14:92082441) und ist damit im Protein ATXN3 vor dem polyQ-Trakt lokalisiert. Der Austausch der Base G an der Stelle des SNP durch die Base A führt zur *Missense*-Variante des ATXN3 mit Wechsel der Aminosäure Valin (G) zu Methionin (A). Sowohl die Variante mit der Base G, als auch die Variante mit der Base A sind Keimbahnallele. Die Base A als seltenere Variante zeigt in der globalen Bevölkerung eine *minor allele frequency* (MAF) von 27,1 – 32,5 % (NCBI rs1048755, 2018; NM\_004993.6, kein Datum).

Als Folge des Einzelnukleotidpolymorphismus  $\underline{C}^{987}\text{GG}/\underline{G}^{987}\text{GG}$  (im Folgenden auch ATXN3 BP 987) im Gens *ATXN3* auf Chromosom 14 des menschlichen Genoms (chr14:92071010) entsteht eine *Missense*-Variante des ATXN3. Der SNP befindet sich genauer im Exon 10 und vier Basenpaare hinter dem 3'-Ende des zehn CAG umfassenden CAG-Trakts der Referenzisoform. Dies impliziert, dass die genaue Position des SNPs für jedes Individuum von der Länge des zugrundeliegenden des CAG-Trakts abhängig ist. Durch das Ersetzen der Base G in der DNA durch ein C, A oder T, kommt es zum Austausch der zweiten Aminosäure am 3'-Ende des längenvariablen polyQ-Trakts des ATXN3 von Glycin (G) zu Arginin (C, A) oder Tryptophan (T). Sowohl die Variante mit der Base G als auch die Variante mit der Base C sind Keimbahnallele, wobei die Base C mit einer geringeren Häufigkeit (MAF) von ca. 16,2 – 27,6 % in der globalen Bevölkerung vorkommt (NCBI rs12895357, 2018; NM\_004993.6, kein Datum).

Zu einem Austausch der Base C zu A oder T kommt es beim Einzelnukleotidpolymorphismus  $\text{TAA}^{1118}/\text{TAC}^{1118}$  (im Folgenden auch ATXN3 BP 1118) im Exon 10 des Gens *ATXN3* auf Chromosom 14 des menschlichen Genoms (chr14:92070879). Innerhalb des Proteins ist die genaue Position des SNPs von der Anzahl der vorwiegenden CAG-Triplets jedes Individuums abhängig, wobei der SNP 132 Basenpaare hinter dem 3'-Ende des polyQ-Trakts zu

finden ist, der in der Referenzisoform zehn CAG-Triplets umfasst. Während die Variante mit der Base A zum Stoppcodon führt, bleibt bei der Variante mit der Base T die Aminosäure Tyrosin äquivalent zur häufigsten Variante mit der Base C erhalten. Allele mit der Base A zeigen in der globalen Bevölkerung eine MAF von 26,9 – 33,9 %. Variante T ist mit 0,001 % hingegen sehr selten (NCBI rs7158733, 2018; NM\_004993.6, kein Datum). Dieser SNP ist mit seinen Varianten an der Entstehung des Unterschieds zwischen den *full-length* Isoformen ATXN3aS und ATXN3aL beteiligt (Weishäupl, et al., 2019) (Abbildung 4, Abbildung 6).



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der Lage der drei analysierten Einzelnukleotidolymorphismen (SNPs) auf den *full-length* Isoformen ATXN3c mit 3 UIMs und ATXN3a mit 2 UIMs.** Der SNP ATXN3 BP 669 befindet sich im Exon 8 des Proteins. Der Austausch der Base G zu A führt zur *Missense*-Mutation und zum Austausch der AS Valin zu Methionin. Beim SNP ATXN3 BP 987 resultiert ein Austausch der Base G zu C in der *Missense*-Variante des Proteins mit Austausch der AS von Glycin zu Arginin. Das Vorkommen des SNPs ATXN3 BP 1118 ist auf die *full-length* Isoform ATXN3a beschränkt. Der Austausch der Base C zu A führt durch ein Stoppcodon zur Verkürzung des Proteins (ATXN3aS). UIM = Ubiquitin-interagierende Domäne, N = Amino-Terminus, C = Carboxy-Terminus, Q = Glutamin, BP = Basenpaar, AS = Aminosäure.

### 1.1.7.3 Potenzielle Auswirkungen der SNPs in Bezug auf SCA3

Wie bereits erwähnt (1.1.1) gibt es mehrere Faktoren, die zum Phänomen der Antizipation bei Trinukleotid-Erkrankungen beitragen. Als ein maßgeblicher Faktor mit potenziellen Auswirkungen auf die intergenerationale Instabilität des CAG-Trakts wurden drei intragenerationale Polymorphismen im krankheitsverursachenden Gen *ATXN3* identifiziert:  $\underline{A}^{669}\text{TG}/\underline{G}^{669}\text{TG}$ ,  $\underline{C}^{987}\text{GG}/\underline{G}^{987}\text{GG}$  und  $\text{TAA}^{1118}/\text{TAC}^{1118}$  (Maciel, et al., 1999).

Bezüglich des Polymorphismus  $\underline{C}^{987}\text{GG}/\underline{G}^{987}\text{GG}$  untersuchten Maciel et al. (1999) zunächst die Chromosomen von gesunden Kontrollprobanden mit zwei nicht-expandierten Allelen, die sie nach CAG-Länge in drei verschiedene Gruppen einteilten (15-21, 22-27, und 27-36 CAG-Triplets). Die Forscher stellten

fest, dass die Verteilung in der Häufigkeit der Allel-Varianten mit der Base C und G zwischen den Gruppen statistisch signifikant war. Im Detail zeigte sich, dass die Variante mit der Base C eine erhöhte relative Frequenz in der Gruppe mit den Chromosomen mit größerer CAG-Länge aufwies. Daraus ließ sich aber keine exklusive Assoziation einer Allel-Variante mit einer größeren Anzahl an CAG-Tripletts ableiten. Darüber hinaus führten Maciel et al. (1999) Studien zum Zusammenhang zwischen dem Haplotyp des SNPs und der intergenerationalen Instabilität bei (prä-)symptomatischen SCA3-Patienten durch. Sie untersuchten dabei sowohl das Allel in *cis*, d.h. das Allel des expandierten CAG-Trakts, und in *trans*, d.h. das Allel des nicht-expandierten CAG-Trakts. Dabei hatte das Allel in *trans* statistisch signifikante Auswirkungen auf die intergenerationale Instabilität, denn die nicht-expandierte Allel-Variante mit der Base G ging mit erhöhter intergenerationaler Variation der expandierten CAG-Länge einher. Für das Allel in *cis* konnte allein betrachtet sowohl für die Variante mit der Base C als auch mit der Base G kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der absoluten Variation der CAG-Länge bei der Übertragung auf die nachfolgende Generation festgestellt werden. Lediglich die Kombination aus der Allel-Variante in *cis* mit der Base C und der Allel-Variante in *trans* mit der Base G zeigte beim untersuchten Effekt auf die intergenerationale Instabilität eine *borderline*-Signifikanz. Diese Beobachtung spricht für eine relevante Interaktion zwischen dem nicht-expandiertem und expandiertem Allel (Maciel, et al., 1999).

Für den Stoppcodon-Polymorphismus  $\underline{TAA}^{1118}/\underline{TAC}^{1118}$  gelten für die Untersuchungen bezüglich des Haplotyps und der CAG-Länge der Chromosomen von gesunden Kontrollprobanden die gleichen Ergebnisse wie für den zuvor beschriebenen Polymorphismus  $\underline{C}^{987}GG/\underline{G}^{987}GG$ . Zwar war die Allel-Variante mit der Base A eher unter den Chromosomen mit größerer Anzahl an CAG-Tripletts zu finden, so ließ sich aber auch hier keine exklusive Assoziation einer Allel-Variante mit einer größeren CAG-Länge ableiten. Bei den Untersuchungen der Chromosomen der Mutationsträger ergab sich im Fall der Variante mit der Base C auf dem Allel in *trans* die Beobachtung einer statistisch signifikant erhöhten intergenerationalen Instabilität des expandierten CAG-Trakts. Im Gegensatz zum Polymorphismus  $\underline{C}^{987}GG/\underline{G}^{987}GG$  ist für den Stoppcodon-Polymorphismus

aber kein statistisch signifikanter Effekt des Allels in *cis* auf die intergenerationale Instabilität nachzuweisen. Dies gilt sowohl für die alleinige Betrachtung des Allels in *cis*, als auch für die kombinierte Betrachtung mit dem Allel in *trans* (Maciel, et al., 1999).

Die Untersuchungen des SNPs  $\underline{A}^{669}\text{TG}/\underline{G}^{669}\text{TG}$  deckten bei beiden Polymorphismus-Varianten auf dem Allel in *cis* keinen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen Allel-Variante und absoluter Variation der CAG-Länge auf. Neben den Allel-Varianten in *cis*, hatten auch die Varianten in *trans* keinen Einfluss auf die intergenerationale Instabilität der CAG-Expansion. Dies galt ebenso für eine kombinierte Betrachtung beider Allele (Maciel, et al., 1999).

Vor dem allgemeinen Hintergrund der Existenz von Kopplungsungleichgewichten im menschlichen Genom und nachgewiesenem Einfluss von intragenetischen Polymorphismen auf die intergenerationale Instabilität des CAG-Trakts, kann man sich als Kombination der drei Polymorphismen theoretisch acht verschiedene Haplotypen denken (Gaspar, et al., 2001) (Tabelle 2). Bei einer weltweiten Haplotyp-Studie von Gaspar et al. (2001) wurden alle acht Haplotypen mit unterschiedlicher Häufigkeit im Genom der Kontrollprobanden der Studie nachgewiesen. Im Genom der SCA3-Patienten lagen jedoch nur vier der acht Haplotypen vor: A-C-A, A-G-A, G-G-A, G-G-C. Mit 72 % ist der Haplotyp A-C-A bei der Mehrheit der SCA3-Patienten der häufigste Haplotyp, während er bei den Kontrollprobanden mit 2 % den am seltensten vertretenen Haplotyp darstellt. Der zweithäufigste Haplotyp in SCA3-Patienten (G-G-C) ist auch bei den Kontrollprobanden oft vertreten und stellt hier sogar den häufigsten Haplotyp dar (Gaspar, et al., 2001). Auch Maciel et al. (1999) untersuchten diese kombinierten Haplotypen aus den drei intragenetischen Polymorphismen und stellten fest, dass in ihrer untersuchten Population portugiesischer Herkunft der A-C-A-Haplotyp selbst in normalen Chromosomen von Kontrollprobanden mit größeren CAG-Längen (27 – 36 CAG-Wiederholungen) assoziiert war. Diese Beobachtung war aber weder exklusiv für große CAG-Längen, noch war sie statistisch signifikant. Um den Gedanken der Relevanz der Betrachtung eines kombinierten Haplotyps zwischen den intragenetischen Polymorphismen weiter



aufzugreifen, wurden durch Maciel et al. (1999) auch Kopplungsungleichgewichte untersucht. Zwischen der Allel-Variante mit der Base C des Polymorphismen  $\underline{C}^{987}GG/\underline{G}^{987}GG$  und der Allel-Variante mit der Base A des Stoppcodon-Polymorphismus  $TAA^{1118}/TAC^{1118}$  konnte statistisch signifikant ein solches Kopplungsungleichgewicht nachgewiesen werden. Der intragenetische Haplotyp G-C dieses Kopplungsungleichgewichts auf den Allelen in *trans*, war bei mütterlichen Transmissionen statistisch signifikant mit einer vermehrten Variation in der CAG-Expansionslänge verbunden (Maciel, et al., 1999). Eine andere Studie postulierte dazu widersprüchliche Angaben und schlug eine statistisch signifikante, positive Korrelation von Alter des Vaters und des Expansionsumfangs des CAG-Traktes vor. Außerdem gaben sie an, der Haplotyp A-C-A sein mit einer erhöhten Expansionstendenz des CAG-Traktes, der Genotyp G-G-C hingegen mit einer erhöhten Kontraktionstendenz des CAG-Traktes verbunden (Martins, et al., 2008). Für die möglichen Haplotyp-Kombinationen mit dem Polymorphismus  $\underline{A}^{669}TG/\underline{G}^{669}TG$  wurden weder Kopplungsungleichgewichte noch ein Einfluss auf die intergenerationale Instabilität gefunden (Maciel, et al., 1999).

**Tabelle 2: Mögliche intragenetische Haplotypen resultierend aus der Kombination von drei beschriebenen intragenetischen Polymorphismen im Gen *ATXN3* und ihre weltweite Häufigkeit (modifiziert nach Gaspar et al. (2001). G = Guanin, A = Adenin, C = Cytosin, T = Thymin.**

$\underline{A}^{669}TG/$ $\underline{G}^{669}TG$	$\underline{C}^{987}GG/$ $\underline{G}^{987}GG$	$TAA^{1118}/$ $TAC^{1118}$	resultierender Haplotyp	Häufigkeit bei Kontrollpro- banden [%]	Häufigkeit bei SCA3- Patienten [%]
A	C	A	A-C-A	2	72
A	C	C	A-C-C	6	0
A	G	A	A-G-A	4	3
A	G	C	A-G-C	13	0
G	C	A	G-C-A	6	0
G	C	C	G-C-C	19	0
G	G	A	G-G-A	12	1
G	G	C	G-G-C	38	26

## 1.2 Therapeutische Ansätze für SCA3

Bis jetzt gibt es für Mutationsträger keine präventive oder kurative Therapie (Coarelli, et al., 2018; Klockgether, et al., 2019). Zu zentralen Problemen der therapeutischen Forschung zählen die fehlende Randomisierung, das Fehlen von Placebogruppen und die kurze Dauer von klinischen Studien (Rapaso & Lima, 2018). Vor allem fehlen jedoch Surrogatmarker, die den Erfolg der pharmakologischen Studien validieren könnten. Aus diesen Gründen muss bis heute auf eine symptomatische bzw. krankheitsmodifizierende Therapie zurückgegriffen werden, die grob in pharmakologische und nicht-pharmakologische Ansätze eingeteilt werden kann (D'Abreu, et al., 2010). Zur nicht-pharmakologischen Basistherapie gehört das rechtzeitige Angebot von Physiotherapie, Logopädie, Prismengläser und unterstützenden Gehhilfen bzw. Rollstühlen (Rieß, et al., 2008). Ein Ganzkörper-Koordinationstraining über 4 Wochen beispielsweise reduzierte den SARA von Patienten mit verschiedenen Ataxieformen signifikant und nachhaltig (Klockgether, et al., 2019). SCA3-Patienten mit Parkinson-ähnlichen Symptomen kann durch Applikation von fokalen Läsionen oder mittels tiefer Hirnstimulation der motorischen Anteile des *Nucleus subthalamicus* im *Diencephalon* geholfen werden (Schöls, et al., 2015). Bei pharmakologischen Therapieansätzen werden häufig Medikamente eingesetzt, die sich bei anderen (neurologischen) Krankheitsbildern bewährt haben, für SCA3 aber keine offizielle Indikationsstellung haben. Zum Einsatz kommen hier beispielsweise L-DOPA gegen den Parkinsonismus, Botulinumtoxin gegen Dystonie und Baclofen gegen Spastiken (Rieß, et al., 2008; D'Abreu, et al., 2010). Das L-DOPA aus der Parkinson-Therapie spricht bei vielen SCA3-Patienten mit Parkinson-ähnlichem Subphänotyp sehr gut an, weil es zwar in der *Substantia nigra* der Patienten zu Neuronenverlust und im *Striatum* zu einer signifikanten Reduktion von Dopamin-Transportern im *Striatum* kommt, die Zahl der postsynaptischen striatalen D2-Rezeptoren aber weitestgehend unbeeinflusst bleibt (Klockgether, 2015; Schöls, et al., 2015).

Wenn es um neue Therapieansätze geht, müssen zwei Therapieziele unterschieden werden: einerseits das Abfangen der toxischen Folgen des expandierten ATXN3 durch ein Medikament (z.B. Stoffwechseldysregulationen) und das

Abfangen von neuronalem Zelltod mittels Gen-Stillegung, was die direkte Reduktion des expandierten ATXN3 bewirken soll. Unter Ersterem beginnen die Ideen bei der Induktion von Autophagie und der proteasomalen Aktivität zum Abbau des expandierten ATXN3 mit Hilfe von Temsirolimus, Lithiumkarbonat, dem Rho-Kinase-Inhibitor H1152 oder der Überexpression von Beclin-1. Resveratrol als Aktivator der Histon-Deacetylase Sirtuin-1 soll neuroprotektiv wirken und führte im SCA3-Mausmodell zur Verbesserung der eingeschränkten Motorik und Balance. Dem selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer Citalopram wird nachgesagt, in Drosophila und Mausmodellen die Krankheitsprogression in SCA3 zu verlangsamen und die Aggregation von ATXN3 zu vermindern (Duarte-Silva & Maciel, 2018). Valproinsäure, ein Histon-Deacetylase-Inhibitor, und Riluzol, ein Natriumkanalblocker mit Glutamat-senkender Wirkung, sind die bis heute nutzbringendsten krankheitsmodifizierenden Medikamente, denn in randomisierten, kontrollierten, klinischen Studien konnten hier bereits nach mehrwöchiger Therapie Reduktionen im SARA festgestellt werden (Coarelli, et al., 2018; Duarte-Silva & Maciel, 2018). Im Gegensatz dazu stellte eine Studie in einem SCA3 transgenen Mausmodell unter einer Therapie mit Riluzol zwar eine Reduktion von löslichem ATXN3 im Kleinhirn, jedoch keine Verbesserung der motorischen Symptomatik fest (Schmidt, et al., 2016). Valproinsäure reduziert laut einer Studie über einen verminderten Transport des expandierten ATXN3 in den Nukleus der Zelle dessen Toxizität (Klockgether, et al., 2019).

Einen neuen potenziellen Therapieansatz stellten Alves et al. (2008) vor. Ihre Idee ist eine Genexpressionshemmung mittels allelspezifischer RNA-Interferenz (RNAi) zur Herunterregulierung der Expression von expandiertem ATXN3. Das Prinzip der Genexpressionshemmung durch RNA-Interferenz ist in der Wissenschaft bereits bekannt und wird bei anderen autosomal-dominant vererbten neurodegenerativen Erkrankungen, wie z.B. Chorea Huntington, derzeit in der Anwendung geprüft. Das Besondere an der neuen Herangehensweise dieser Methode bezüglich SCA3 ist die Möglichkeit einer Allelspezifität durch das Vorhandensein des Einzelnukleotidpolymorphismus ATXN3 BP 987 am 3'-Ende der krankheitsverursachenden CAG-Expansion im Gen *ATXN3*. Dieser ist bei

ca. 70 % der Mutationsträger im Genom zu finden. Die Forscher nutzten lentivirale Vektoren, um die Expression von nicht-expandiertem (27 Q) und expandiertem (72 Q) humanem ATXN3 inklusive beider Allel-Varianten des SNPs ATXN3 BP 987 *in vitro* in humanen, embryonalen Nierenzellen (293T) und *in vivo* in neuronalen Rattenzellen zu ermöglichen. Zusätzlich brachten sie durch Transduktion mit lentiviralen Vektoren zwei verschiedene *Short hairpin RNAs* (shRNAs) in die Zellen ein. Beide shRNAs hatten eine nahezu identische Sequenz und unterschieden sich nur durch einen einzigen Einzelnukleotidpolymorphismus (CGG/GGG) in der Mitte des Moleküls. Damit waren die shRNAs so konstruiert, dass sie unter Nutzung des SNPs das nicht-expandierte oder expandierte *ATXN3* selektiv abzuschalten vermochten. Da bekannt ist, dass nicht-expandiertes *ATXN3* eine protektive Wirkung bei SCA3-Patienten zu haben scheint und die Neurotoxizität von expandiertem *ATXN3* vermindert, beschränkte man sich im weiteren Verlauf auf eine Allelspezifische Genexpressionshemmung durch die shRNAs mit der Allel-Variante C am SNP. Im Tiermodell exprimierten die Neuronen dieser Ratten in der Folge deutlich weniger pathogene Proteine (Alves, et al., 2008). Die akquirierten Daten sprechen *in vitro* laut Alves et al. für eine selektive und effiziente Genexpressionshemmung des Allels mit expandiertem *ATXN3*. *In vivo* wurde darüber hinaus eine statistisch signifikante Verminderung von *ATXN3*-Aggregaten beobachtet (Alves, et al., 2008). Eine weitere Studie arbeitete mit Adeno-assoziierten Viren (AAV), die eine *microRNA* (miRNA) exprimierten, welche nicht allelspezifisch an *ATXN3*-mRNA bindet und über den *RNA-induced silencing complex* (RISC) zu deren Abbau führt. In pluripotenten Stammzellen und in einem SCA3 *knock-in* Mausmodell führte das zu starker Reduzierung der *ATXN3*-mRNA und des expandierten *ATXN3*, ohne dass gefährliche Nebenwirkungen auftraten. Auch die intrathekale Applikation der miRNA im AAV5 lieferte vielversprechende Ergebnisse für ein potenziellen Therapieansatz direkt im Zentralen Nervensystem (ZNS) (Martier, et al., 2019).

Tonnen, et al (2017) publizierten einen ähnlichen Therapieansatz, bei dem es im transgenen Mausmodell unter Nutzung von *Antisense*-Oligonukleotiden zum *Exon-Skipping* des Exons 10 kam. Dazu injizierten die Forscher die entspre-

chenden *Antisense*-Oligonukleotide wiederholt intrazerebrovaskulär. Auf molekularer Ebene resultierte dies im Gehirn der Mäuse in der Modifikation der prä-mRNA des *ATXN3* mit Überspringen des Exon 10 und Generierung eines Stoppcodons am Beginn des Exon 11 und damit in einem verkürzten *ATXN3* ohne polyQ-Trakt. Die JD und Teile des C-terminalen Proteinschwanzes mit UIM 1 und 2 konnten dabei erhalten werden, weshalb die DUB-Aktivität des Proteins nicht eingeschränkt war. Die Therapie führte bei den Mäusen zu signifikant weniger unlöslichem *ATXN3* und intranukleären Aggregaten. Um die Methoden in Zukunft anwenden zu können, müssen viele offene Fragen zunächst geklärt werden. Dazu zählen vor allem die Sicherheit und langanhaltende Effizienz einer RNAi-basierten Therapie (Alves, et al., 2008).

In Zukunft wäre es natürlich erstrebenswert, Patienten mit Biomarkern bereits vor Symptombeginn zu identifizieren, ihnen bereits im präsymptomatischen Stadium eine effektive, präventive Therapie zukommen zu lassen und so den Krankheitsverlauf zu mildern bzw. zu verzögern (Klockgether, et al., 2019).

### **1.3 *European Spinocerebellar Ataxia Type 3/Machado-Joseph-Disease Initiative (ESMI)***

Die *European Spinocerebellar Ataxia Type 3/Machado-Joseph-Disease Initiative*, kurz ESMI, ist ein im Rahmen des EU Programms für Neurodegenerative Erkrankungen (*EU Joint Programme – Neurodegenerative Disease Research*) in Zusammenarbeit mit der Europäischen Kommission unterstütztes Forschungsprojekt, das in Kooperation mit zwölf Forschungszentren in Europa stattfindet. Das Projekt vereinigt acht vorher bestehende SCA3-Kohorten aus Europa und den USA, die zusammen mehr als 800 Studienteilnehmer umfassen. Eine gemeinsame Datenbank, genauso wie standardisierte und qualitätskontrollierte klinische Untersuchungen, MRT-Untersuchungen und Biomarkerstudien tragen zur Entwicklung und zur Validierung von innovativen Bewertungsinstrumenten und Biomarkern der Erkrankung SCA3 bei. Zusätzlich sollen Fragebögen helfen den Einfluss des Lebensstils auf die Entwicklung der Krankheit zu klären (Full Proposal Application Form ESMI, n.d.). Das übergeordnete Ziel von ESMI ist es, eine *Trial-Ready*-Kohorte mit einer großen Anzahl

an SCA3-Patienten zu generieren (DZNE, kein Datum), die Entwicklung der Krankheit SCA3 offenzulegen, die Sensitivität und Effektivität von verschiedenen Biomarkern in präsymptomatischen und symptomatischen Phasen zu klären und neue motorische, bildgebende und biochemische Marker zu identifizieren, die in zukünftigen klinischen und Medikamenten-Studien Behandlungserfolge validieren bzw. kontrollieren können (Full Proposal Application Form ESMI, n.d.).

### **1.3.1 Studiendesign**

Die ESMI führt eine analytische Kohortenstudie durch, die sowohl präsymptomatische Mutationsträger und SCA3-Patienten als auch Kontrollprobanden einschließt. Je nach Zeitpunkt der Rekrutierung handelt es sich zum größten Teil um eine prospektive Kohortenstudie, wobei einige Daten von bereits im symptomatischen Stadium rekrutierten SCA3-Patienten retrospektiv erhoben wurden. Neben einer Erstuntersuchung im Rahmen von ESMI sind für alle Studienteilnehmer zwei Folgeuntersuchungen geplant. Die Art der durchgeführten Untersuchungen hängt dabei von den örtlichen Ressourcen der Kooperationspartner ab. Jeder der Kooperationspartner in ESMI ist für einen anderen Teilaspekt der formulierten Zielsetzung verantwortlich. Der Austausch der akquirierten Daten wird über eine einheitliche Datenbank gewährleistet. Für alle Kooperationspartner gilt ein einheitliches, obligatorisches, definiertes Protokoll zur Durchführung von klinischen Untersuchungen, standardisierten MRT-Untersuchungen und zur Probenentnahme, -verarbeitung und Lagerung von Biomaterialien. Dadurch soll ein hoher Grad an Standardisierung erreicht werden (Full Proposal Application Form ESMI, n.d.).

Der Kooperationspartner Universität Tübingen ist mit dem neu entwickelten Immunoassay TR-FRET verantwortlich für die Messung der Proteinkonzentrationen von ATXN3 und für genetische Analysen der Studienteilnehmer. In der Neurologie des Universitätsklinikums Tübingen führte Prof. Dr. Ludger Schöls die klinische Untersuchung eines deutschen Anteils der SCA3-Kohorte und die Auswertung eines Lifestyle Fragebogens durch. Weiterhin wurde durch ihn die Koordination der Ganganalysen, die in Tübingen, Bonn und Nijmegen stattfanden

den, übernommen. Prof. Dr. Matthis Synofzik forscht im Rahmen von ESMI am Universitätsklinikum Tübingen zu den Biomarkern NfL und pNFH in der ESMI-Kohorte.





## 2 Fragestellung und Zielsetzung

Auf dem Feld der neurodegenerativen Erkrankungen gehört die Spinozerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3) zu denjenigen Erkrankungen, die bis heute in ihren kausalen Einzelheiten nicht vollständig verstanden ist und für die in der Konsequenz weder zielgerichtete symptomatische noch kurative Therapieansätze zur Verfügung stehen. Heute wird deshalb intensiv an der Identifikation von potenziellen Biomarkern für die weltweit häufigste Form der autosomal-dominant vererbten Ataxie geforscht, die sowohl diagnostische als auch prognostische Aussagekraft besitzen und zur Verifizierung von Therapieerfolgen in pharmakologischen Studien herangezogen werden können. Im Rahmen der *European Spinocerebellar Ataxia Type 3/Machado-Joseph-Disease Initiative* (ESMI) wurde für diese Promotion unter der Nutzung hochstandardisierter Protokolle auf vorbestehende SCA3-Kohorten zurückgegriffen und die Biomaterialien EDTA-Blut und aus Vollblut extrahierte mononukleären Zellen des peripheren Blutes für genetische Analysen und Biomarkerstudien bereitgestellt. Ziel war es, mit der hochsensitiven und antikörperbasierten Methode des *Time-resolved fluorescence energy transfer* (TR-FRET) Assays expandiertes ATXN3 als krankheitsverursachendes Protein in SCA3 als möglicher quantifizierbarer und reproduzierbarer Biomarker in mononukleären Zellen des peripheren Blutes zu validieren. Dazu dienten nach der Messung des ATXN3-Proteinlevels statistische Korrelationen dessen mit dem Alter und Geschlecht der Probanden, dem Krankheitsbeginn (AAO), der Krankheitsdauer (DD), der Krankheitsschwere in Form von klinischen Bewertungssystemen (SARA, INAS, CSDP) und der CAG-Länge. Idealerweise könnte das krankheitsverursachende expandierte ATXN3 in Zukunft als prognostischer Statemarker eingesetzt werden und in zukünftigen Therapieansätzen, welche auf die Senkung von expandiertem ATXN3 ausgelegt sind, als Surrogatmarker zur Überprüfung des Therapieerfolgs dienen. Neben diesem klar in ESMI formulierten Studienziel, sollten aus den Biomaterialien zusätzlich die Genotypen dreier in der Literatur vorbeschriebener Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) im Gen *ATXN3* (A<sup>669</sup>TG/G<sup>669</sup>TG, C<sup>987</sup>GG/G<sup>987</sup>GG, TAA<sup>1118</sup>/TAC<sup>1118</sup>) mittels Sequenzierung nach Sanger und für diese SNPs neu etablierte *High Resolution Melting Analysis* bestimmt werden.

Mit Hilfe der Häufigkeit ihres Vorkommens und statistischer Korrelationen der Genotypen zu krankheitsdeterminierenden Parametern (wie AAO, DD, SARA, INAS) wurde der krankheitsmodulierende Effekt der Einzelnukleotidpolymorphismen untersucht. In Zukunft könnte das Wissen über diese Polymorphismen eine Genotyp-spezifische Zuweisung zu pharmakogenetischen Therapien in SCA3 ermöglichen.

An dieser Stelle ein Hinweis zur Terminologie: Im Folgenden wurden SCA3-Mutationsträger ohne Symptome als präsymptomatische Mutationsträger bezeichnet, sobald sie Symptome entwickelten als symptomatische Mutationsträger oder SCA3-Patienten. Gegen Ende des Schreibprozesses dieser Arbeit wurde innerhalb von ESMI eine Änderung des Terms „präsymptomatisch“ zum Begriff „präataktisch“ vorgenommen.

### **3 Material und Methoden**

Diese Promotion wurde im Rahmen der *European Spinocerebellar Ataxia Type3/Machado-Joseph-Disease Initiative* (ESMI) durchgeführt. Für die verschiedenen europäischen Partnerzentren waren hierbei verschiedene Ethikfreigaben notwendig. Für das Partnerzentrum Tübingen sind die folgenden Aktenzeichen des Ethikvotums vermerkt: 598/2011BO1 für die Kollektion von Biomaterialien und 911/2019BO2 für die Analysen mittels TR-FRET. Allgemein erfolgte für jeden Probanden bei Einschluss in ESMI eine entsprechende Aufklärung.

#### **3.1 Material**

##### **3.1.1 Probandenrekrutierung, Probengewinnung und anamnestische Datengewinnung**

Für die Probandenrekrutierung wurde auf vorbestehende, europäische SCA3-Kohorten zurückgegriffen und daraus präsymptomatische Mutationsträger, SCA3-Patienten und Kontrollprobanden selektiert. Nach dem Einschluss in ESMI nach hochstandardisierten Protokollen folgte für jeden Probanden bei der Erstuntersuchung im Rahmen von ESMI beim jeweiligen Vertragspartner die venöse Blutabnahme, klinische Einschätzung der Beeinträchtigung nach den Bewertungssystemen SARA und INAS und eine anamnestische Datenerhebung. Die Zusammenführung und Verwaltung der Daten erfolgte in einer fusionierten Datenbank. Zur weiteren Verarbeitung der Biomaterialien für genetische Analysen und Biomarkerstudien wurden jeweils 1 ml EDTA-Blut und das aus Vollblut isolierte Pellet von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) zum Vertragspartner am Universitätsklinikum Tübingen verschickt und dort verarbeitet und analysiert. Das Protokoll von ESMI sieht weiterhin *Follow-Up*-Untersuchungen und -Blutentnahmen vor und ermöglicht somit auch longitudinale Studien.

### 3.1.2 Reagenzien/Chemikalien

Tabelle 3: Verzeichnis der verwendeten Chemikalien, ihrer Hersteller mit Hauptsitz und Herkunftsland.

Chemikalien	Hersteller, Hauptsitz, Land
H <sub>2</sub> O Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg vor der Höhe, Deutschland
<i>Albumin from bovine serum (BSA)</i>	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Betainlösung	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Borsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>Bovine Serum Albumin Fraction V (BSA)</i>	Roche, Basel, Schweiz
cOmplete Mini, EDTA-frei	Roche, Basel, Schweiz
DPBS (1x) ( <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> )	Gibco® by Life Technologies™
Ethanol absolut, Qualität für Molekularbiologie, 99,8 % (CAS: 64-17-5)	PanReac AppliChem ITW Reagents, Glenview, USA
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Dinatriumsalzlösung	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Ficoll™ PM400	GE Healthcare, Chicago, USA
<i>GenomeLab DNA Size Standard Kit – 600</i>	Beckman Coulter Life Science, Brea, USA
<i>GenomeLab Separation Buffer</i>	Beckman Coulter Life Science, Brea, USA
<i>GenomeLab Separation Gel</i>	Beckman Coulter Life Science, Brea, USA
Glykogen	Beckman Coulter Life Science, Brea, USA
Isopropanol, 99,9 % (CAS: 67-63-0)	Honeywell International Inc., Morristown, USA
<i>Light Cycler® 480 High Resolution Melting Master Mix, 2x conc.</i>	Roche, Basel, Schweiz
<i>Light Cycler® 480 High Resolution Melting</i>	Roche, Basel, Schweiz

<i>ing Master, MgCl<sub>2</sub>, 25 mM</i>	
<i>Light Cycler® 480 High Resolution Melting Master, Wasser, PCR Grad</i>	Roche, Basel, Schweiz
Mineralöl	Beckman Coulter Life Science
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumfluorid (NaF)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>O' GeneRuler DNA Ladder Mix</i>	Thermo Scientific, Waltham, USA
Orange G	Omikron, Neckarwestheim, Deutschland
<i>PCR Grade Nucleotide Mix</i>	Roche, Basel, Schweiz
<i>Protein Assay Dye Reagent Concentrate</i>	BioRad, Hercules, USA
Pwo-DNA-Polymerase mit 10x Reaktionspuffer	VWR, Radnor, USA
<i>Q-Solution (5x)</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>Quick Start Mix</i>	Beckman Coulter Life Science
<i>Sample Loading Solution (SLS)</i>	Beckman Coulter Life Science
SeaKem Agarose	VWR, Radnor, USA
Natriumacetat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Taq DNA-Polymerase mit PCR Puffer 10x	Qiagen, Hilden, Deutschland
TRIS-Base	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Triton X® 100	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween®-20 für die Molekularbiologie	PanReac AppliChem ITW Reagents, Glenview, USA

### 3.1.3 Kits

Tabelle 4: Verzeichnis der verwendeten Kits, ihrer Hersteller mit Hauptsitz und Herkunftsland.

<b>Kit</b>	<b>Hersteller, Hauptsitz, Land</b>
Flexi Gene DNA Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
MinElute® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>Light Cycler® 480 High Resolution Melting Master</i>	Roche, Basel, Schweiz

### 3.1.4 Primer

Die folgenden Primer wurden von der Firma Metabion International AG aus Planegg, Deutschland produziert.

**Tabelle 5: Verzeichnis der verwendete Primer für die CAG-Fragmentlängen-Bestimmung, ihrer Sequenz und der Länge des entstehenden Produkts.** G = Guanin, A = Adenin, C = Cytosin, T = Thymin, bp = Basenpaar.

Primer	Sequenz (5' - 3')	Produktlänge [bp]
ATXN3 vorwärts (P247), HPLC aufgereinigt, 5'Cy5 fluoreszenz- markiert	CCA GTG ACT ACT TTG ATT CG	202
ATXN3 rückwärts (P248), HPLC aufgerei- nigt	TGG CCT TTC ACA TGG ATG TGA A	

**Tabelle 6: Verzeichnis der verwendeten Primer für die Sanger-Sequenzierung, ihrer Sequenz und der Länge des entstehenden Produkts.** G = Guanin, A = Adenin, C = Cytosin, T = Thymin, bp = Basenpaar.

Primer	Sequenz (5' - 3')	Produktlänge [bp]
ATXN3 BP 669 vorwärts (P290)	TAC TAG AGC TTA TTT GCC AG	221
ATXN3 BP 669 rückwärts (P291)	CAG AGC CCT CTG CAA ATC CT	
ATXN3 BP 987 und BP1118 vorwärts (R478)	CCA GTG ACT ACT TTG ATT CG	405 (variable Länge durch
ATXN3 BP 987 und BP 1118 rückwärts (R479)	GGT AAC TGC TCC TTA ATC CAG GG	CAG-Triplett- Wiederholung)

**Tabelle 7: Verzeichnis der verwendeten Primer für die *High Resolution Melting Analysis* ihrer Sequenz und der Länge ihres Produkts.** G = Guanin, A = Adenin, C = Cytosin, T = Thymin, bp = Basenpaar.

<b>Primer</b>	<b>Sequenz (5´-3´)</b>	<b>Produktlänge [bp]</b>
ATXN3 BP 669 vorwärts (T979) HPLC aufgereinigt	TAC TAG AGC TTA TTT GCC AG	221
ATXN3 BP 669 rückwärts (T980) HPLC aufgereinigt	CAG AGC CCT CTG CAA ATC CT	
ATXN3 BP 987 vorwärts (T982) HPLC aufgereinigt	CCA GTG ACT ACT TTG ATT CG	212 (variable Länge durch
ATXN3 BP 987 rückwärts (T984) HPLC aufgereinigt	AAC TGG TGG CTG GCC	CAG-Triplett- Wiederholung)
ATXN3 Aa118 vorwärts (T983) HPLC aufgereinigt	GCT CAC CAT TCA TCA TGT TCG C	160
ATXN3 BP 1118 rückwärts (T981) HPLC aufgereinigt	GGT AAC TGC TCC TTA ATC CAG GG	

### 3.1.5 Antikörper

**Tabelle 8: Verzeichnis der verwendeten Antikörper für den TR-FRET, ihre Eigenschaften und Hersteller mit Hauptsitz und Herkunftsland.**

<b>Antikörper</b>	<b>Eigenschaften</b>	<b>Hersteller, Hauptsitz, Land</b>
MW1 (AB_528290)	monoklonaler Maus-AK, Anti-Polyglutamin	Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, USA
1H9 (MAB5360)	monoklonaler Maus-AK, Anti-ATXN3	Chemicon International, Temecula, USA
5TF1-1C2 (MAB1574)	monoklonaler Maus-AK, Anti-Polyglutamin	Merck Millipore, Burlington, USA

### 3.1.6 Lösungen und Puffer

#### 0.5 M EDTA pH 8,0

---

0,5 M	EDTA
	ddH <sub>2</sub> O ad 1 l
	pH auf 8,0 einstellen

#### TBE-Puffer (10x)

---

890 mM	TRIS Base
890 mM	Borsäure
4 %	0,5 M EDTA-Na <sub>2</sub> pH 8,0
	ddH <sub>2</sub> O ad 1l

#### TBE-Puffer (1x)

---

10 %	TBE-Puffer (10x)
	ddH <sub>2</sub> O ad 2l

#### Orange G Ladepuffer (6x)

---

0,044 mM	Orange G
0,35 mM	Ficoll <sup>TM</sup> PM400
	ddH <sub>2</sub> O ad 50 ml

#### 3 M NaAcetat pH 5,2

---

3 M	NaAcetat
	ddH <sub>2</sub> O ad 250 ml
	pH auf 5,2 einstellen

#### 100 mM EDTA-Na<sub>2</sub> pH 8,0

---

100 mM	EDTA-Na <sub>2</sub>
	ddH <sub>2</sub> O ad 250 ml
	pH auf 8,0 einstellen



### **Stopp-Mix**

---

64,5 %	Ampuwa Wasser
14,2 %	3 M NaAcetat pH 5,2
14,2 %	100 mM EDTA-Na <sub>2</sub> pH 8,0
7,1 %	Glykogen

### **Ethanol (70 %)**

---

70 %	Ethanol (100 %) ddH <sub>2</sub> O ad 50 ml
------	--

### **Verdünntes *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (1:2,2)**

---

45 %	<i>Protein Assay Dye Reagent Concentrate</i> (100 %) ddH <sub>2</sub> O
------	---

### **Verdünntes cOplete Mini**

---

1 Tablette	cOplete Mini, EDTA-frei ddH <sub>2</sub> O ad 2 ml
------------	---

### **Lysepuffer**

---

40 µl	Verdünntes cOplete Mini
1 %	10 % TritonX 100 DPBS ad 1 ml

### **Verdünnungsmedium der PBMC-Proben**

---

40 µl	Verdünntes cOplete Mini DPBS ad 1 ml
-------	---

### **Detektionspuffer**

---

50 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
400 mM	NaF
0,1 %	BSA
0,05 %	Tween-20

## BSA 1 %

10 %	BSA (10 µg/µl) ddH <sub>2</sub> O
------	--------------------------------------

### 3.1.7 Geräte

Tabelle 9: Verzeichnis der verwendeten Geräte, ihrer Hersteller und Herkunftsland.

Gerät	Hersteller, Hauptsitz, Land
<i>Light Cycler<sup>®</sup> 480 Real Time PCR System</i>	Roche, Basel, Schweiz
CEQ <sup>™</sup> 8000 Genetic Analysis System	Beckman Coulter Life Science, Brea, USA
T100 Thermal Cycler	BioRad, Hercules, USA
G-Storm GS1	AlphaMetrix Biotech GmbH, Rödermark, Deutschland
<i>Centrifuge 5415R (Kühlzentrifuge)</i>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<i>Concentrator 5301</i>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
SynergyHT	BioTek, Winooski, USA
<i>Multimode Plate Reader mit 337nm TRF Light Unit</i>	PerkinElmer, Waltham, USA
Elektrophorese Spannungsgerät, 300V – 500mA	Consort bvba, Turnhout, Belgien
PerfectBlue <sup>™</sup> Mini S (kleine Gelkammer)	PEQLAB BIOTECHNOLOGIE GmbH, Darmstadt, Deutschland
PerfectBlue <sup>™</sup> Mini L (große Gelkammer)	PEQLAB BIOTECHNOLOGIE GmbH, Darmstadt, Deutschland
Transilluminator BIO View mit Dunkelhaube und Kamera	biostep, Burkhardtsdorf, Deutschland
UV-Transilluminator (UV-Tisch)	PEQLAB BIOTECHNOLOGIE GmbH, Darmstadt, Deutschland
Wasserbad WB 7	Memmert, Schwabach, Deutschland

Schüttelwasserbad 1083	GFL, Burgwedel, Deutschland
<i>Thermomixer compact</i> mit 1,5 ml Block	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
$\mu$ Cuvette G1.0	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Vortexmixer 7-2020	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
HERASAFE HS 12 Sicherheitswerkbank mit Absaugpumpe	Heraeus, Hanau, Deutschland

### 3.1.8 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 10: Verzeichnis der verwendeten Verbrauchsmaterialien, ihrer Hersteller und Herkunftsland.**

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller, Hauptsitz, Land</b>
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
<i>Safe-Lock</i> Reaktionsgefäße 1,5 ml, braun (UV-Licht-geschützt)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
0,2 ml 8-Streifen PCR-Gefäße	STARLAB International GmbH, Hamburg, Deutschland
TipOne Pipettenspitzen 10 $\mu$ l	STARLAB International GmbH, Hamburg, Deutschland
TipOne Pipettenspitzen 200 $\mu$ l	STARLAB International GmbH, Hamburg, Deutschland
TipOne Pipettenspitzen 1000 $\mu$ l	STARLAB International GmbH, Hamburg, Deutschland
<i>epT.I.P.S. Reloads</i> 0.1-10 $\mu$ l	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<i>epT.I.P.S. Reloads</i> 2-200 $\mu$ l	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
96-Well Assay Mikrotiterplatte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
<i>Light Cycler® 480 Multiwell</i> Platte, 384, weiß + Abdichtungsfolie	Roche, Basel, Schweiz

96-Well PCR Platte, <i>non-skirted</i>	4titude, Surrey, Vereinigtes Königreich
<i>ProxiPlate™-384 TC Plus</i> , weiß, hohl mit 384 Vertiefungen, mit Deckel	PerkinElmer, Waltham, USA
GeXP Probenplatte	Beckman Coulter Life Science, Brea, USA
GeXP Pufferplatte	Beckman Coulter Life Science, Brea, USA
Cellstar® Zentrifugenröhrchen 15 ml und 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pasteur Kapillarpipetten, 230 mm	Wilhelm Ulbrich GdbR, Mainz, Deutschland
Kryoröhrchen CRYO.S™	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 DNA-Extraktion aus EDTA-Blut

Die Extraktion der DNA aus EDTA-Blut erfolgte nach dem Handbuch *FlexiGene DNA Extraction Kit* (Version Februar 2003) und dem darin enthaltenen Protokoll für die Isolation von DNA aus 1-3 ml Vollblut. Nach Studienprotokoll wurde pro ESMI-Studienteilnehmer die Extraktion von DNA aus 1 ml EDTA-Blut vorgenommen. Abweichend zum Schritt 2 des Protokolls wurde das Vollblut für 10 min bei 3000 x G zentrifugiert. Der Proteasenverdau in Schritt 5 des Protokolls wurde im Wasserbad WB7 durchgeführt. Schritt 7 – 11 wurden ausgelassen. Stattdessen wurde die in Isopropanol gefällte DNA mit einer Pipettenspitze aufgenommen und in 70%igem Ethanol gewaschen und in das endgültige Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt. Es folgte Schritt 12. Das Auflösen der DNA in *Buffer FG3* in Schritt 13 erfolgte nach subjektiv beurteilter Menge gefällter DNA mit 30 – 100 µl *Buffer FG3*. Die abschließende Inkubation der aufgelösten DNA fand im Heizblock (Thermomixer compact) für mindestens 2 Stunden oder über Nacht statt.

### 3.2.2 DNA-Konzentrationsbestimmung und Lagerung der Proben

Die photometrische Bestimmung der Konzentration an doppelsträngiger Nukleinsäure (dsDNA) in einer Probe nach der DNA-Extraktion erfolgte mittels µCuvette G1.0 im BioPhotometer. Nach der Leerwertmessung mit 1,5 µl des *FlexiGene hydration Buffer (Buffer FG3)*, wurde die Extinktion von 1,5 µl aufgetragener DNA-Probe bei 260 nm gemessen. Die Einstellung verschiedener Parameter am BioPhotometer sind in Tabelle 11 dargestellt. Der Methodenfaktor 50 µg/ml als Voreinstellung für dsDNA legt fest, dass ein Extinktionswert von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml entspricht. Die DNA-Konzentration wurde für alle Proben in der Einheit ng/µl gemessen. Die Messung der Extinktion bei den drei weiteren Wellenlängen 230 nm, 280 nm, 320 nm und die daraus gebildeten Quotienten  $E_{260}/E_{280}$  und  $E_{260}/E_{230}$  gaben zusätzlich Auskunft über die Reinheit der DNA-Extraktion. Für reine Proben sollte die Extinktion bei der Wellenlänge 320 nm idealerweise nahe Null, der Quotient  $E_{260}/E_{280}$  bei ca. 1,8 liegen.

Tabelle 11: Einstellungen am Eppendorf BioPhotometer.

Parameter	Einstellung
Methodenfaktor	50 µl/ml
Korrektur mit E <sub>230</sub>	Aus
Einheit	ng/µl
Molare Einheit	pmol/µl
Küvette	1 mm

Gelagert wurden die DNA-Proben bei -20 °C.

### 3.2.3 Agarosegel und Fotografie des Gels

Im Folgenden werden im Rahmen verschiedener Methoden Agarosegele zur Überprüfung des Reaktionserfolges von Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) angewendet. Diese Technik soll hier im Voraus allgemein erklärt werden, um sie im Zuge der Aufführung anderer Methoden und dem dortigen Aufzeigen des Ergebnisses der PCR-Erfolgskontrolle als bekannt vorauszusetzen.

Agarosegele dienen im Allgemeinen zur Auftrennung von Nukleinsäuren oder Proteinen. Zum Gießen des Gels wurden 99 % TBE-Puffer (1x) und 1 % Sea-Kem Agarosepulver in einen Erlenmeyerkolben gefüllt und in einer Mikrowelle zum Kochen gebracht, bis das Agarosepulver vollständig in Lösung gegangen war. Nach Hinzufügen des entsprechend nach Größe des Agarosegels gewählten Volumens an 0,00001 % Ethidiumbromid, wurde die homogene Lösung in eine vorbereitete Gussform gegossen und ein Kamm mit gewünschter Anzahl an Vertiefungen eingesetzt. Beim folgenden Aushärten des Agarosegels für mindestens 20 Minuten gelierte die Agarose. Nach Entfernen des Kamms wurde das Agarosegel in eine mit TBE-Puffer (1x) gefüllte Gelelektrophorese-Kammer gesetzt und beladen. Die zu analysierenden Proben wurden für die Beladung des Gels zunächst vorbereitet. Hierzu wurden 5 µl Orange G Lade-puffer und 5 µl der zu analysierenden Proben in der Vertiefung einer 96-Well-Platte gemischt. 5 µl des *O' GeneRuler DNA Ladder Mix* dienten als molekularer Fragmentlängen-Marker mit Referenzbanden. Im Allgemeinen wurde jedes Agarosegel mit jeweils einem Marker, einer Negativkontrolle und den zu analysierten Proben beladen. Als Grundeinstellung am Netzgerät diente eine ange-

legte Spannung von 80 V für kleine Agarosegele und 120 V für große Agarosegele. Die Laufzeit des Programms richtete sich nach der Größe des Agarosegels. Nach vollständiger Laufzeit des Agarosegels wurde dieses aus der Gelelektrophorese-Kammer auf einen Transilluminator BIO View mit Dunkelhaube gelegt und mittels Kamera im UV-Licht fotografiert und visualisiert. Als Kontrolle der Reaktionsqualität nach PCR-Reaktionen wurde stets ein 1%iges Agarosegel verwendet. Die eingesetzten Volumina und Massen sind in Tabelle 12 dargestellt.

**Tabelle 12: Zusammensetzung der Agarosegele nach Größe und Prozentanteil zur Kontrolle der Reaktionsqualität nach PCR.** TBE = TRIS-Borat-EDTA, EtBr = Ethidiumbromid.

<b>Agarosegelgröße</b>	<b>TBE-Puffer (1x) [ml]</b>	<b>Agarosepulver [g]</b>	<b>EtBr [<math>\mu</math>l]</b>
Klein (1 %)	49,5	0,5	3
Groß (1 %)	89,1	0,9	5

### **3.2.4 CAG-Fragmentlängen-Analyse**

In der CAG-Fragmentlängen-Analyse wurde die CAG-Länge beider Allele aller Studienteilnehmer ermittelt. Dies diente primär zur Einordnung der ESMI-Studienteilnehmer in Kontrollprobanden und SCA3-Mutationsträger. Für die Analyse wurde zunächst eine PCR zur Amplifikation der DNA-Zielsequenz durchgeführt. Im nächsten Schritt erfolgte die eigentliche Analyse der CAG-Fragmentlänge im *CEQ<sup>TM</sup>8000 Genetic Analysis System*.

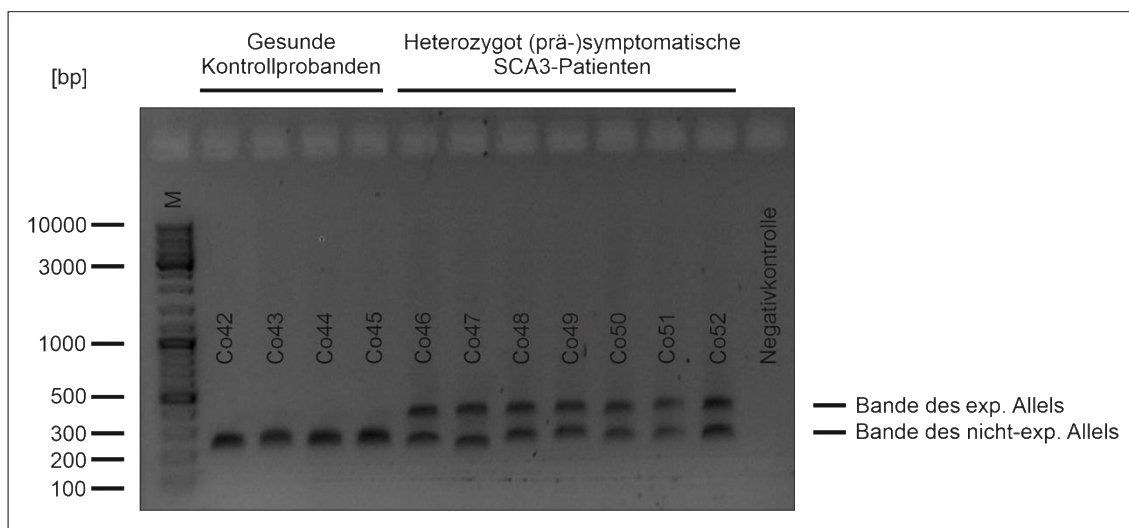
#### **3.2.4.1 Polymerase-Kettenreaktion zur initialen DNA-Amplifikation**

Der für die PCR verwendete Reaktionsansatz und die Thermozykler-Bedingungen für den G-Storm GS1 sind in Tabelle 13 dargestellt. In Tabelle 5 sind die beiden verwendeten Primer aufgelistet. Der Vorwärtsprimer ist mittels 5'Cy5 fluoreszenzmarkiert und stellt die Grundlage für die Bestimmung der CAG-Länge dar. Die DNA-Konzentration wurde nach ihrer Bestimmung (3.2.2) für die PCR mit H<sub>2</sub>O Ampuwa als Verdünnungsmittel auf eine Konzentration von 40 ng/ $\mu$ l eingestellt. Bei 3  $\mu$ l eingesetzter (verdünnter) DNA waren somit absolut 120 ng DNA im Reaktionsansatz enthalten.

**Tabelle 13: Reaktionsansatz und Thermozykler-Bedingungen für die CAG-Fragmentlängen-Bestimmung.**

Reagenzien	Volumen [ $\mu$ l]	Temperatur [ $^{\circ}$ C]	Zeit [min]
H <sub>2</sub> O Ampuwa	12,8	94	5
PCR Puffer 10x	2,5	94	1
Primer vorwärts (10 pmol/ $\mu$ l)	1	60	1
Primer rückwärts (10 pmol/ $\mu$ l)	1	72	2
PCR Grade Nucleotide Mix	0,5	72	10
Q-Solution	4	10	$\infty$
Taq DNA-Polymerase	0,2		
DNA	3		

Zur Klärung des Reaktionserfolgs und -qualität wurden jeweils 5  $\mu$ l der PCR-Probe und 5  $\mu$ l des *O' GeneRuler DNA Ladder Mix* auf ein großes, 1%iges Agarosegel aufgetragen und für ca. 60 Minuten eine Gelelektrophorese bei 120 V durchgeführt. Durch Visualisierung der PCR-Produktbanden unter UV-Licht zeigten sich für Mutationsträger jeweils eine Bande eines nicht-expandierten Allels und eine Bande eines expandierten Allels. Für Kontrollprobanden war hingegen nur eine Bande für beide nicht-expandierten Allele sichtbar (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Fotografie der Gelelektrophorese der PCR zur Amplifikation der ATXN3-Zielsequenz vor der CAG-Fragmentlängen-Bestimmung im CEQ<sup>TM</sup>8000 Genetic Analysis System unter UV-Licht.** Durchführung einer PCR mit den Primern P247 und P248 zur Amplifikation der Zielsequenz der DNA im ATXN3-Gen für die gesunden Kontrollprobanden Co42, Co43, Co44 und Co45 und die heterozygoten Mutationsträger Co46, Co47, Co48, Co49, Co50, Co51 und Co52. Beladung eines 1%igen Agarosegels mit jeweils 5  $\mu$ l des *O'GeneRuler DNA Ladder Mix* (M), der PCR-Produkte und der Negativkontrolle. Bandentrennung durch eine Gelelektrophorese für ca. 60 Minuten bei 120 V mit Laufrichtung im Bild von oben nach unten. Folgende Visualisierung der Banden des expandierten Allels und des nicht-expandierten Allels unter UV-Licht. PCR = Polymerase-Kettenreaktion, DNA = Desoxyribonukleinsäure, bp = Basenpaar, exp. = expandiert.



### 3.2.4.2 Finale Analyse der CAG-Fragmentlänge

Die eigentliche Analyse der CAG-Fragmentlänge wurde durch Alexandra Grenzendorf im *CEQ<sup>TM</sup>8000 Genetic Analysis System* der Diagnostischen Abteilung im Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik der Universitätsklinik Tübingen durchgeführt. Hierzu wurde das fluoreszenzmarkierte PCR-Produkt zunächst mit H<sub>2</sub>O Ampuwa als Verdünnungsmittel 1 : 200 verdünnt. Der in Tabelle 14 aufgelistete Reaktionsansatz wurde in die Vertiefungen einer GeXP Probenplatte pipettiert und mit 1 Tropfen Mineralöl bedeckt. In die Säulen einer GeXP Pufferplatte wurden positionsanalog ca. 200 µl *GenomeLab Separation Buffer* gefüllt. Tabelle 15 zeigt das im *CEQ<sup>TM</sup>8000 Genetic Analysis System* durchgeführte Programm.

Tabelle 14: Reaktionsansatz im *CEQ<sup>TM</sup>8000 Genetic Analysis System* zur CAG-Fragmentlängen-Analyse.

Reagenzien	Volumen [µl]
Fluoreszenzmarkiertes PCR-Produkt (1 : 200)	5
<i>Sample Loading Solution</i> (SLS)	34,5
<i>GenomeLab DNA Size Standard Kit – 600</i>	0,5

Tabelle 15: Inhalt des Programm "Frag-2" am *CEQ<sup>TM</sup>8000 Genetic Analysis System* zur CAG-Fragmentlängen-Analyse nach initialer PCR.

Programmschritt		Passende Einstellung
Kapillare	Temperatur	35 °C
	Warten auf Temperatur	Ja
Denaturierung	Temperatur	90 °C
	Dauer	2 min
Injektion	Spannung	2,0 kV
	Dauer	0,5 min
Seperation	Spannung	6,0 kV
	Dauer	60 min
Pause	Dauer	0 min

Das im Reaktionsansatz enthaltene *GenomeLab DNA Size Standard Kit – 600* ist ein Standard mit ebenfalls fluoreszenzmarkierten PCR-Produkten definierter Größe, die dem Gerät als Fragmentgrößenvergleich dienen. Anhand der Mes-

sung von Fluoreszenzspitzen registriert das Gerät alle PCR-Produkte je nach Größe und errechnet aus der Fluoreszenzspitze des nicht im Standard enthaltenen PCR-Produkts einen Wert  $x$ . Dieser entspricht noch nicht der CAG-Fragmentlänge, weil das PCR-Produkt primerbedingt 159 bp länger ist als der CAG-Trakt. Sie lässt sich deshalb aus folgender Formel berechnen:

$$\text{CAG – Fragmentlänge} = \frac{(x - 159)}{3}$$

### **3.2.5 Analyse der SNPs in *ATXN3* mittels Sanger-Sequenzierung**

Die Basen der drei untersuchten Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) wurden zu Beginn der praktischen Arbeit im Labor in mehreren Schritten mittels initialer PCR, folgender Kettenabbruch-Synthese (Sequenzier-PCR) und abschließender Sanger-Sequenzierung bestimmt. Diese schlossen die SNPs rs1048755 (*ATXN3* BP 669), rs12895357 (*ATXN3* BP 987) und rs7158733 (*ATXN3* BP 1118) ein.

#### **3.2.5.1 Polymerase-Kettenreaktion zur initialen DNA-Amplifikation**

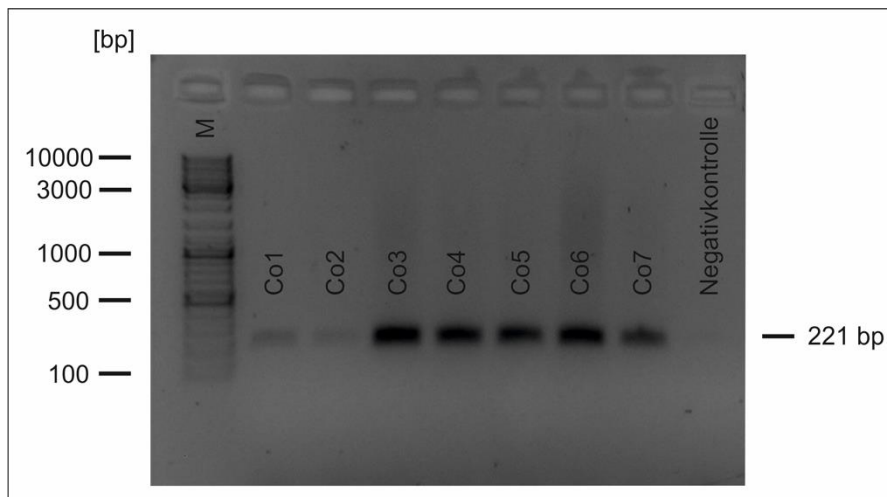
Zur Vervielfältigung der Ausgangs-DNA in den extrahierten DNA-Proben der Patienten wurde die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt, um genügend DNA für die Analyse der SNPs rs1048755 (*ATXN3* BP 669), rs12895357 (*ATXN3* BP 987) und rs7158733 (*ATXN3* BP 1118) zu generieren. Um für jeden SNP das passende DNA-Stück zu amplifizieren, wurde die PCR mit dem für jeden SNP spezifisch generierten Primern durchgeführt (Tabelle 6). Auch der Reaktionsansatz, das PCR-Protokoll und der eingesetzte Thermozykeler (PCR-Block) unterschieden sich je nach SNP.

Im Bezug auf den SNP *ATXN3* BP 669 wurde der folgender Reaktionsansatz und das nachfolgende PCR-Protokoll (Tabelle 16) im *T100 Thermal Cycler* (3.1.7, Tabelle 9) verwendet. Mit den ausgewählten Primern entstand dabei ein PCR-Produkt von 221 Basenpaaren. Um die Reaktionsqualität der PCR für den SNP *ATXN3* BP 669 zu ermitteln, wurden jeweils 5  $\mu$ l jeder PCR-Probe, 5  $\mu$ l der Negativkontrolle und 5  $\mu$ l *O' GeneRuler DNA Ladder Mix* auf ein 1%iges ausgehärtetes Agarosegel aufgetragen und das PCR-Produkt mittels Gelelektrophorese in Banden bildlich dargestellt (3.2.3, Abbildung 8).

Tabelle 16: Reaktionsansatz und Thermozykler-Bedingungen für die PCR des SNPs ATXN3 BP 669.

Reagenzien	Volumen [ $\mu$ l]	Temperatur [ $^{\circ}$ C]	Zeit [min]
H <sub>2</sub> O	14,3	94	5
10x Reaktionspuffer	2	94	1
Primer vorwärts (10 pmol/ $\mu$ l)	1	56	1
Primer rückwärts(10 pmol/ $\mu$ l)	1	72	1
<i>PCR Grade Nucleotide Mix</i>	0,5	72	4
Taq DNA-Polymerase	0,2	10	$\infty$
DNA	1,5		

Bei guter Reaktionsqualität erfolgte im Anschluss die Aufreinigung des PCR-Produkts nach Benutzerhandbuch des *QIAquick PCR Purification Kit* (Version: April 2015). Die Menge an *Buffer EB* in Schritt 9 des Benutzerhandbuchs wurde je nach subjektiv beurteilter Bandenstärke im Kontrollagarosegel wie empfohlen zwischen 30  $\mu$ l für schwache Banden und 50  $\mu$ l für starke Banden angepasst. Ein 1%iges Agarosegel kontrollierte den Erfolg der PCR-Aufreinigung. Dazu wurde erneut ein ausgehärtetes Agarosegel mit 5  $\mu$ l jeder PCR-Probe und 5  $\mu$ l *O' GeneRuler DNA Ladder Mix* beladen, eine Gelelektrophorese durchgeführt und die Banden visualisiert.



**Abbildung 8: Fotografie der Gelelektrophorese unter UV-Licht nach Amplifikation der DNA mit der Zielsequenz ATXN3 inklusive des Einzelnukleotidpolymorphismus ATXN3 BP 669.** Durchführung einer PCR mit den Primern P290 und P291 für die Probanden Co1 – Co7. Beladung eines großen, 1%igen Agarosegels mit jeweils 5  $\mu$ l des *O'GeneRuler DNA Ladder Mix* (M), der PCR-Produkte und der Negativkontrolle. Gelelektrophorese zur Kontrolle des Reaktionserfolgs für ca. 50 Minuten bei 120 V mit Laufrichtung des PCR-Produkts (221 bp) im Bild von oben nach unten. Folgende Visualisierung der Banden unter UV-Licht. PCR = Polymerase-Kettenreaktion, DNA = Desoxyribonukleinsäure, BP/bp = Basenpaar.

Hinsichtlich der SNPs ATXN3 BP 987 und ATXN3 BP 1118 gelang eine allelspezifische PCR. Hierzu wurden mit den ausgewählten Primern (Tabelle 6) gemäß der CAG-Repeat-Länge PCR-Produkte verschiedener Länge generiert, die sowohl den SNP ATXN3 BP 987 als auch den SNP ATXN3 BP 1118 einschlossen. Der ursprüngliche Reaktionsansatz inklusive Touchdown-PCR-Protokoll (Tabelle 17) im Thermozykler G-Storm GS1 erwies sich im Verlauf als ungeeignet, da trotz großer Anzahl pipettierter PCR-Ansätze nur einige wenige PCR-Reaktionen für einzelne DNA-Proben tatsächlich funktionierten.

**Tabelle 17: Ursprünglicher Reaktionsansatz und Thermozykler-Bedingungen für die PCR der SNPs ATXN3 BP 987 und ATXN3 BP 1118.**

<b>Reagenzien</b>	<b>Volumen [<math>\mu</math>l]</b>	<b>Temperatur [<math>^{\circ}</math>C]</b>	<b>Zeit [min]</b>
H <sub>2</sub> O Ampuwa	24	94	5
PCR Puffer 10x	3	94	0,5
Primer vorwärts (10 pmol/ $\mu$ l)	0,66	65 - 55	0,5
Primer rückwärts (10 pmol/ $\mu$ l)	0,66	68	0,75
<i>PCR Grade Nucleotide Mix</i>	0,33	94	0,5
Pwo-DNA-Polymerase	0,2	55	0,5
DNA	1,5	68	0,75
		68	5
		10	$\infty$

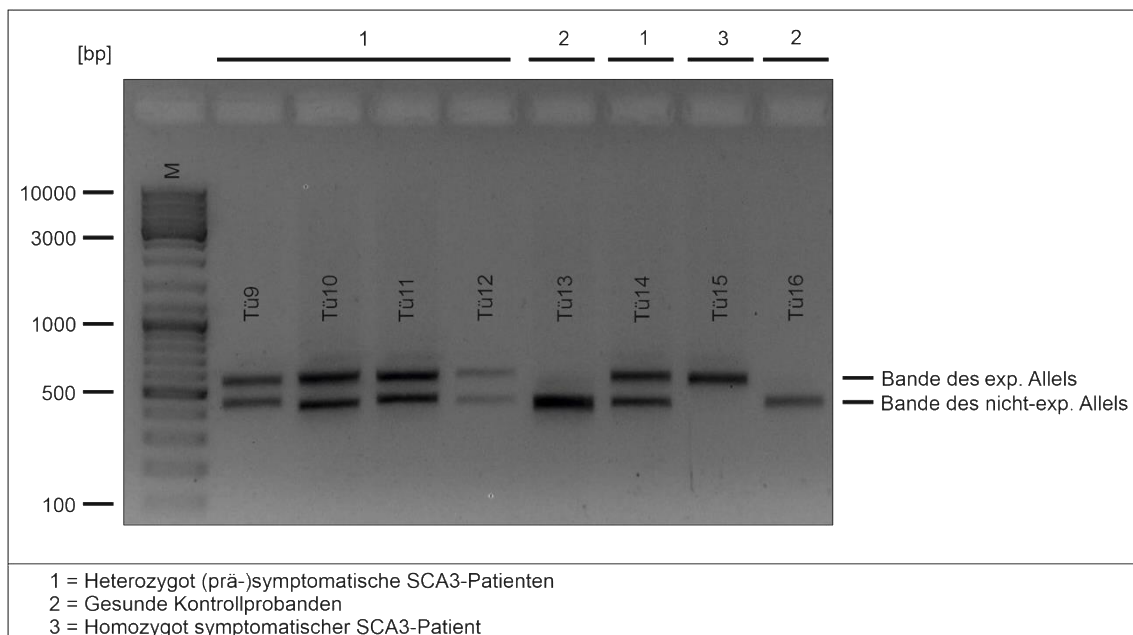
Stattdessen wurde auf den Reaktionsansatz und das PCR-Protokoll der CAG-Fragmentlängenanalyse zurückgegriffen (3.2.4, Tabelle 18), wobei dieselben Primer wie im vorherigen PCR-Protokoll eingesetzt wurden. Die DNA-Konzentration der Proben wurde im Vorhinein so angepasst, dass im endgültigen Reaktionsansatz 120 ng DNA enthalten waren. Diese PCR wurde im Thermozykler G-Storm GS1 durchgeführt.

Nach Beenden der PCR erfolgte auch für die SNPs ATXN3 BP 987 und ATXN3 BP 1118 eine Gelelektrophorese zur Kontrolle des Reaktionserfolgs und -qualität. Dazu wurden jeweils 5  $\mu$ l jeder PCR-Probe, 5  $\mu$ l der Negativkontrolle und 5  $\mu$ l *O' GeneRuler DNA Ladder Mix* auf ein 1%iges ausgehärtetes Agarosegel aufgetragen und eine Gelelektrophorese durchgeführt. Die Laufzeit des Agarosegels wurde mit ca. 50 Minuten so gewählt, dass eine Auftrennung der

möglichen Allelbanden (nicht-CAG-expandierte Allel-Bande und CAG-expandierte Allel-Bande) in der anschließenden Fotografie unter UV-Licht gut voneinander abzugrenzen waren (Abbildung 9).

**Tabelle 18: Endgültiger Reaktionsansatz und Thermozykler-Bedingungen für die PCR der SNPs ATXN3 BP 987 und ATXN3 BP 1118.**

Reagenzien	Volumen [µl]	Temperatur [°C]	Zeit [min]
H <sub>2</sub> O	11,4	94	5
PCR Puffer 10x	2	94	1
Primer vorwärts (10 pmol/µl)	1	60	1
Primer rückwärts (10 pmol/µl)	1	72	2
<i>PCR Grade Nucleotide Mix</i>	0,4	72	10
Q-Solution	4	10	∞
Taq DNA-Polymerase	0,2		
DNA	2		



**Abbildung 9: Fotografie der Gelelektrophorese unter UV-Licht nach initialer DNA-Amplifikation der Zielsequenz im Gen ATXN3 inklusive der Einzelnukleotidpolymorphismen ATXN3 BP 987 und ATXN3 BP 1118 vor der Sanger-Sequenzierung.** Durchführung einer PCR mit den Primern R478 und R479 für den homozygoten Mutationsträger Tü15, die heterozygoten Mutationsträger Tü9, Tü10, Tü11, Tü12, Tü14 und die gesunden Kontrollprobanden Tü13 und Tü16. Beladung eines großen, 1%igen Agarosegels mit jeweils 5 µl des *O'GeneRuler DNA Ladder Mix* (M), der PCR-Produkte und der Negativkontrolle. Auftrennung der DNA-Banden für nicht-expandierte und expandierte Allele durch eine Gelelektrophorese für ca. 50 Minuten bei 120V mit Laufrichtung im Bild von oben nach unten. Folgende Visualisierung der PCR-Banden unter UV-Licht. PCR = Polymerase-Kettenreaktion, DNA = Desoxyribonukleinsäure, bp = Basenpaar, exp = expandiert.

Anschließend erfolgte, ebenfalls unter UV-Licht, im abgedunkelten Raum das Ausschneiden der CAG-expandierten Allel-Bande und der nicht-CAG-expandierten Allel-Bande.

Im nächsten Schritt folgte die Aufreinigung der im Gel vorhandenen DNA nach Handbuch des *QIAquick Gel Extraction Kit* (Version: Version Juli 2015) bei mittelstarken bis starken PCR-Produktbanden oder nach Handbuch des *MinElute® Gel Extraction Kit* (Version: Januar 2011) bei sehr schwachen PCR-Produktbanden. Modifiziert wurden beide Kitsysteme durch Aussparen des Schritt 6 im Benutzerhandbuch. Die Menge des eingesetzten *Buffer EB* in Schritt 9 des Benutzerhandbuchs wurde je nach subjektiver Beurteilung der Bandenstärke im Agarosegel nach der PCR zwischen 11 µl für sehr schwache Banden, 30 µl bei mittelstarken Banden und 50 µl bei starken Banden variiert. Die Effektivität der PCR-Aufreinigung wurde wiederum mit einer Gelelektrophorese mit 1%igem Agarosegel nach Beladen der Vertiefungen mit 5 µl jeder PCR-Probe und 5 µl *O' GeneRuler DNA Ladder Mix* kontrolliert.

### **3.2.5.2 Kettenabbruch-Synthese (Sequenzier-PCR) als Basis für die Sanger-Sequenzierung**

Für die Sequenzier-PCR wurden für die SNPs ATXN3 BP 669, ATXN3 BP 987 und ATXN3 BP 1118 unterschiedliche Reaktionsansätze genutzt, die aber mit übereinstimmendem PCR-Protokoll im Thermozykler G-Storm GS1 durchgeführt wurden (Tabelle 19, Tabelle 20). Als PCR-Ausgangsprodukt diente die in der PCR-Aufreinigung eluierte DNA, deren eingesetzte Menge je nach Augenmaß subjektiv beurteilter Bandenstärken in der Gelelektrophorese nach der PCR-Aufreinigung variiert wurde, jedoch maximal 11 µl betrug. Wurden weniger als 11 µl eluierte DNA eingesetzt, diente H<sub>2</sub>O Ampuwa zur Probenverdünnung. Im initialen Schritt des PCR-Protokolls wurde die (verdünnte) DNA zunächst für 3 Minuten denaturiert. Nach Unterbrechen des PCR-Programms nach 3 Minuten wurde der restliche Reaktionsansatz in die einzelnen Vertiefungen der Reaktionsgefäße hinzupipettiert. Für alle drei SNPs kam bei dieser PCR jeweils der Vorwärts-Primer zum Einsatz (Tabelle 6), um ausschließlich gleichgerichte-

te Nukleotidsequenzen eines DNA-Stranges zu erhalten, die später im *CEQ™8000 Genetic Analysis System* eindeutig auswertbar waren.

**Tabelle 19: Reaktionsansatz und Thermozykler-Bedingungen für die Sequenzier-PCR des SNPs ATXN3 BP 669.**

Reagenzien	Volumen [µl]	Temperatur [°C]	Zeit [min]
PCR-Produkt + H <sub>2</sub> O	11	98	3
Betainlösung	2	96	0,33
<i>Quickstart Mix</i>	3	55	0,33
Primer vorwärts (10 pmol/µl)	1,2	60	4
		10	∞

31x

**Tabelle 20: Reaktionsansatz und Thermozykler-Bedingungen für die Sequenzier-PCR der SNPs ATXN3 BP 987 und ATXN3 BP 1118.**

Reagenzien	Volumen [µl]	Temperatur [°C]	Zeit [min]
PCR-Produkt + H <sub>2</sub> O Ampuwa	11	98	3
<i>Q-Solution (5x)</i>	4	96	0,33
<i>Quickstart Mix</i>	4	55	0,33
Primer vorwärts (10 pmol/µl)	1	60	4
		10	∞

31x

Für die Aufreinigung dieser PCR wurden 10 µl des PCR-Produkts in UV-Lichtgeschützte Reaktionsgefäße vorgelegt und 15,5 µl Stopp-Mix (3.1.6) und 60 µl eisgekühltes 100%iges Ethanol hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Zentrifugation in der Kühlzentrifuge (Tabelle 9) für 30 Minuten bei 4 °C und maximaler Geschwindigkeit. Nach vorsichtigem Verwerfen der überstehenden Flüssigkeit wurden 190 µl eisgekühltes 70%iges Ethanol auf das Pellet pipetiert. Erneut erfolgte die Zentrifugation für 20 Minuten bei 4 °C und maximaler Geschwindigkeit. Nach wiederholtem Verwerfen der überstehenden Flüssigkeit erfolgte nach Zugabe von 90 µl eisgekühltem 70%igen Ethanol der letzte Kühlzentrifugationsschritt für 15 Minuten analog zu den oben genannten Bedingungen. Das Ethanol wurde im folgenden Schritt mittels Verwerfen des Überstands und Trocknung im *Concentrator 5301* mit offenen Reaktionsgefäßen abgedunkelt bei 30 °C für 12 Minuten im Vakuum vollständig entfernt. Danach erfolgte die Inkubation in 42 µl SLS-Puffer für 1 Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur.

### 3.2.5.3 Finale Identifikation der SNPs in *ATXN3* mittels Sanger-Sequenzierung

Die Sanger-Sequenzierung ist eine Methode zur Ermittlung von DNA-Sequenzen im Genom (Sanger, et al., 1977). Sie basiert auf dem hemmenden Effekt von 2'-3'-Dideoxyribonukleosid-Triphosphaten (ddNTPs) auf eine elon-gierende DNA-Polymerase beim Einbau der ddNTPs in die wachsende DNA-Kette aufgrund einer fehlenden 3'-Hydroxylgruppe (Sanger, et al., 1977). Die Folge sind wiederholte Kettenabbrüche und produzierte Nukleotidsequenzen unterschiedlicher Länge, die später im Sequenzier-Gerät *CEQ<sup>TM</sup>8000 Genetic Analysis System* (Tabelle 9) zur Positionsbestimmung einzelner Nukleotide dienen (Estrada-Rivadeneira, 2017).

Für diese finale Identifikation der DNA-Zielsequenz der SNPs wurde das *CEQ<sup>TM</sup>8000 Genetic Analysis System* genutzt. In die Vertiefungen der zugehörigen GeXP Probenplatte wurden 40 µl der in SLS-Puffer inkubierten DNA-Probe aus der Sequenzier-PCR pipettiert und mit 1 Tropfen Mineralöl bedeckt. Die positionsanalogen Vertiefungen der GeXP Pufferplatte wurden mit ca. 250 µl *GenomeLab Separation Buffer* gefüllt. Nach Beladen des *CEQ<sup>TM</sup>8000 Genetic Analysis System*, war in zeitlichen Abständen der Austausch des *GenomeLab Separation Gel* notwendig. Zur Sequenzierung wurde das Programm LRF-b verwendet (Tabelle 21).

**Tabelle 21: Programm LRF-b im *CEQ<sup>TM</sup>8000 Genetic Analysis System* für die Sanger-Sequenzierung.**

<b>Programmschritt</b>	<b>Passende Einstellung</b>	
Kapillare	Temperatur	57 °C
	Warten auf Temperatur	Ja
Denaturierung	Temperatur	90 °C
	Dauer	2 min
Injektion	Spannung	2,0 kV
	Dauer	0,25 min
Seperation	Spannung	6,0 kV
	Dauer	60 min
Pause	Dauer	0 min



Die Auswertung der Sequenzierung erfolgte mit der zum Gerät gehörenden CEQ System Software. In diesem wurde die ermittelte DNA-Sequenz der Zielsequenz am Ort der Polymorphismen mit der Referenzsequenz von *ATXN3* verglichen und so der vorliegende Genotyp ermittelt.

### **3.2.6 Analyse der SNPs in *ATXN3* mittels *High Resolution Melting Analysis***

Die *High Resolution Melting Analysis* ist eine einfache und schnelle Methode für das Genotypisieren von SNPs (Liew, et al., 2004). Die Methode basiert auf einer Amplifikation von DNA mittels PCR mit anschließendem Schmelzvorgang der DNA. Beim Schmelzvorgang werden Schmelzkurven generiert, indem die von einem sättigenden Farbstoff (*High Resolution Melting Dye*) im Beisein von doppelsträngiger DNA abgegebene Fluoreszenz kontinuierlich gemessen wird (Reed, et al., 2007). Bei niedrigen Temperaturen des Schmelzvorgangs mit fast ausschließlich doppelsträngig vorliegender DNA werden sehr hohe Fluoreszenzwerte gemessen. Durch Erhöhen der Temperatur im Reaktionsgefäß sinken die Fluoreszenzwerte zunächst langsam. Ab einer charakteristischen Temperatur fallen die Fluoreszenzwerte auf Grund des Schmelzens der doppelsträngigen in einzelsträngige DNA schließlich schnell ab. Dieses Schmelzverhalten einer Nukleinsäure hängt von deren GC-Gehalt, ihrer Länge und ihrer Sequenz ab (Reed, et al., 2007). Ungefähr 84 % aller menschlichen SNPs sind das Ergebnis von Substitutionen zwischen A::T und G::C Basenpaaren ( $A \leftrightarrow C$ ,  $A \leftrightarrow G$ ,  $T \leftrightarrow C$ ,  $T \leftrightarrow G$ ). Die Schmelztemperatur ( $T_m$ ) der DNA der homozygoten Genträger dieser Substitutionen sind mit 0,6 – 1,4 °C bei gleicher Schmelzkurvenform deutlich voneinander unterscheidbar. Bei 16 % der SNPs findet die Substitution innerhalb eines Basenpaares statt ( $A \leftrightarrow T$ ,  $C \leftrightarrow G$ ). In diesem Fall unterscheiden sich die Schmelztemperaturen der DNA der homozygoten Genträger um höchstens 0,4 °C und die Base des SNPs ist somit schwer zu erkennen. Heterozygote Genträger können durch die veränderte Form der Schmelzkurve hingegen im Allgemeinen gut identifiziert werden (Liew, et al., 2004).

Im Rahmen dieser Promotion wurde die *High Resolution Melting Analysis* für die Identifizierung der SNPs ATXN3 BP 669 und ATXN3 BP 1118 etabliert und angewandt. Die Identifikation der vorliegenden Base am SNP wurde durch die charakteristische Form der Schmelzmaxima vorgenommen.

Die *High Resolution Melting Analysis* wurde nach Handbuch des *LightCycler 480® High Resolution Melting Master* (Version 07, September 2016) durchgeführt. Als Grundlage diente dabei der Blocktyp 384 mit der dazu passenden *Light Cycler 480® Multiwell Plate 384 white* mit 384 Vertiefungen. Der 10 µl Volumen umfassende Reaktionsansatz ist in Tabelle 22 dargestellt. Abweichend vom Benutzerhandbuch, in dem eine DNA-Menge von 5-30 ng pro DNA-Probe empfohlen ist, wurde die DNA-Konzentration der einzelnen Proben mit H<sub>2</sub>O Ampuwa als Verdünnungsmittel auf 20 ng/µl angepasst, sodass bei 2,5 µl eingesetzter verdünnter DNA-Probe die absolute DNA-Menge pro Probe 50 ng betrug.

Eine finale Konzentration von 5 mM MgCl<sub>2</sub> im Reaktionsansatz war die optimale Reaktionsbedingung für die FastStart Taq DNA-Polymerase aus dem *Light Cycler® 480 High Resolution Melting Master Kit*. Mit dem im *Light Cycler® 480 Real Time PCR System* einprogrammierten *LightCycler® System* Protokoll (Tabelle 24) wurde mit den in Tabelle 7 gelisteten Primern für den SNP ATXN3 BP 669 ein 221 bp umfassendes PCR-Produkt generiert, das PCR-Produkt für den SNP ATXN3 BP 1118 zählte 160 bp.

Um für den SNP ATXN3 BP 1118 eine allelspezifische Analyse des Polymorphismus im *Light Cycler® 480 Real Time PCR System* zu ermöglichen, erfolgte vor der HRMA eine PCR mit Amplifikation der Zielsequenz im *T100 Thermal Cycler* mit gleichem Reaktionsansatz und identischen Thermozyklerbedingungen, wie für die Analyse des SNPs im Zuge der Vorbereitung auf die Sanger-Sequenzierung (Tabelle 18, 3.2.5.1). Verwendete Primer sind in Tabelle 6 dargestellt. Die Verarbeitung des PCR-Produkts wurde wie in Abschnitt 3.2.5.1 beschrieben durchgeführt und resultierte in aus dem Gel aufgereinigter DNA, die im nächsten Schritt in den Reaktionsansatz der *High Resolution Melting Analysis* eingesetzt werden konnte (Tabelle 22).

**Tabelle 22: Reaktionsansatz der *High Resolution Melting Analysis* für die SNPs ATXN3 BP 669 und ATXN3 BP 1118.**

<b>Reagenzien</b>	<b>Volumen [<math>\mu</math>l]</b>
<i>Light Cycler</i> ® 480 <i>High Resolution Melting Master Mix</i> , 2x konzentriert	5
Primer Mix, 20 x konzentriert (4 $\mu$ M)	0,5
<i>Light Cycler</i> ® 480 <i>High Resolution Melting MgCl<sub>2</sub></i> , 25 mM	1,5
<i>Light Cycler</i> ® 480 <i>High Resolution Melting H<sub>2</sub>O</i> , PCR-Grad	0,5
DNA (+ H <sub>2</sub> O PCR-Grad)	2,5

**Tabelle 23: Einstellungen am *Light Cycler*® 480 *Real Time PCR System* für die *High Resolution Melting Analysis*.**

<b>Parameter</b>	<b>Einstellung</b>
Blocktyp	384
Reaktionsvolumen	10
Detektionsformat	Sybr Green I / HRM Dye
Excitation Filter	465
Emission Filter	510

**Tabelle 24: *Light Cycler*® 480 System Protokoll für die *High Resolution Melting Analysis*.**

<b>Programm- schritt</b>	<b>Zieltemperatur [°C]</b>	<b>Erfassungs- modus</b>	<b>Zeit [min]</b>	<b>Anstiegs- rate [°C/s]</b>	<b>Erfassungen [per °C]</b>
Prä- Inkubation	95	Keine	10	4,4	-
	95	Keine	0,17	4,4	-
Amplifikation	56	Keine	0,25	2,2	-
	72	Einfach	0,17	4,4	-
Schmelz- kurve	95	Keine	1	4,4	-
	40	Keine	1	4,4	-
	65	Keine	0,017	1/1	-
	95	Stetig	-	-	25
Kühlen	40	Keine	0,17	2,2	-

### **3.2.7 Lyse von mononukleären Zellen des peripheren Blutes**

Bei der Verarbeitung der bereitgestellten PBMC-Proben der ESMI-Studienteilnehmer wurden die mononukleären Zellen lysiert, um die darin enthaltenen Proteine für die folgenden Konzentrationsbestimmungen mit dem Bradford-Assay und dem TR-FRET freizusetzen. In der kommenden Beschreibung wurden die ersten Schritte im Zellkulturlabor durchgeführt. Nach dem Auftauen der PBMC-Proben im gelieferten Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37 °C wurde in der Sicherheitswerkbank 1 ml ebenfalls 37 °C warmes DPBS in das Kryoröhrchen pipettiert. Das in DPBS gelöste Pellet wurde dann in ein Cellstar® Zentrifugenröhrchen mit einem Fassungsvermögen von 15 ml überführt. Mit 1 ml DPBS erfolgte danach das Auswaschen des Kryoröhrchen und die Überführung dieser Waschlösung in das gleiche Cellstar® Zentrifugenröhrchen. Es folgte der erste Zentrifugationsschritt für 5 min bei 300 rcf. Mit einer Kapillarpipette und Absaugpumpe wurde der Überstand nach der Zentrifugation abgesaugt und das Pellet erneut in 1 ml DPBS gelöst und gewaschen. Der zweite Zentrifugationsschritt erfolgte erneut für 5 min bei 300 rcf. Erneut wurde der Überstand mit einer Kapillarpipette und einer Absaugpumpe entfernt und das verbleibende Pellet auf Eis gestellt. Außerhalb des Zellkulturlabors wurden die mononukleären Zellen nun je nach subjektiv beurteilter Pelletgröße mit verschiedenen Volumina an Lysepuffer (3.1.6) lysiert und die Proteine so in den Puffer freigesetzt. Die Menge an Lysepuffer betrug bei sehr kleinen Zell-Pellets ca. 50 µl, bei großen Zell-Pellets jedoch maximal 200 µl. Für die nächsten 30 Minuten folgte nun die Inkubation auf Eis und wiederholtes Durchmischen mit dem Vortexmixer, bevor die Proben nach Überführen in ein Kryoröhrchen bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert wurden.

### **3.2.8 Bradford-Assay zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration**

Nach Lyse der mononukleären Zellen des peripheren Blutes sollte zunächst die Konzentration an Gesamtprotein in den Proben der Patienten und Kontrollen bestimmt werden. Hierzu diente der Bradford-Assay. Dieser ist eine kolorische Methode zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration einer Probe. Auf molekularer Ebene basiert er auf der Bindung des Farbstoffs *Coomassie Brilliant*

ant Blue G-250 an Proteine (Bradford, 1976). Das freie *Coomassie Brilliant Blue G-250* existiert pH-abhängig ( $pK_{s1} = 1,15$ ,  $pK_{s2} = 1,82$ ,  $pK_{s3} = 12,4$ ) in vier verschiedenen Farben (Rot, Grün, Blau, Pink) mit spezifischen Absorptionsmaxima (Chial, et al., 1993) (Tabelle 25).

**Tabelle 25: Farben und Absorptionsmaxima des *Coomassie Brilliant Blue G-250* Farbstoffs im Bradford-Assay** (nach Bradford (1976), Chial et al. (1993)).

Farbe des <i>Coomassie Brilliant Blue G-250</i>	Wellenlänge des Absorptionsmaximums [nm]
Rot	465
Grün	650
Blau	595
Pink	530

Die negative Ladung von *Coomassie Brilliant Blue G-250* im sauren Medium sorgt für eine elektrostatische Bindung des Farbstoffs an die Seitenketten der Aminosäuren Lysin und Arginin der Proteine (Chial, et al., 1993). Die Farbe des *Coomassie Brilliant Blue G-250* wechselt nach der Proteinbindung von Rot nach Blau und sorgt damit für eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 465 nm zu 595 nm (Bradford, 1976). Die Aufzeichnung der Zunahme der Absorption bei 595 nm (Bradford, 1976) lässt durch Zugabe des Farbstoffs im Überschuss bei Vergleich mit der Eichgerade eines Standard-Assays mit BSA Rückschlüsse auf die Proteinkonzentration einer beliebigen Probe zu. Die Bindung des Farbstoffs an die in der Probe vorhandenen Proteine erfolgt innerhalb von 2 Minuten. Der gebildete Farbstoff-Proteinkomplex bleibt im Folgenden für ca. 1 Stunde in Lösung. Der Vorteil der Methode liegt in seiner Schnelligkeit, hohen Sensitivität und geringen Interferenz durch Kationen oder Kohlenhydrate (Bradford, 1976).

Zur Vorbereitung zählte das schonende Auftauen der Proben auf Eis und die Herstellung einer Eichreihe, mit deren Grundlage bei der Auswertung der Ergebnisse die Gesamtproteinkonzentrationen der Proben bestimmt wurden. Als Standardprotein wurde hierzu Bovines Serumalbumin (BSA) verwendet. Nach der Verdünnung von 1%igem BSA mit einer Stock-Konzentration von 10 µg/µl im Verhältnis 1 : 9 mit H<sub>2</sub>O Ampuwa auf eine Konzentration von 1 µg/µl, erfolgte

das Pipettieren der Bestandteile der Eichreihe nach dem in Tabelle 26 dargestellten Schema in 1,5 ml Reaktionsgefäße.

**Tabelle 26: Volumina zur Herstellung einer Standard-Eichreihe mit BSA und H<sub>2</sub>O Ampuwa für einen Bradford-Assay.**

<b>BSA 1 % (1 : 9) [µl]</b>	<b>H<sub>2</sub>O Ampuwa [µl]</b>	<b>Volumen insgesamt [µl]</b>
0	250	250
0,5	249,5	250
1	249	250
2,5	247,5	250
5	245	250
7,5	242,5	250
10	240	250

Für die einzelnen Proben der Studienteilnehmer wurden jeweils 245 µl H<sub>2</sub>O Ampuwa in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und 5 µl der aufgetauten, unverdünnten Probe hinzupipettiert. Zum Schluss wurden in alle Reaktionsgefäße 200 µl des im Verhältnis 1 : 2,2 mit H<sub>2</sub>O Ampuwa verdünnten *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* hinzugegeben. Somit enthielten alle proteinhaltigen Reaktionsansätze der Standardreihe und der Studien-Proben ein Volumen von 450 µl. Einen Überblick der pipettierten Volumina von Eichreihe und Proben gibt Tabelle 27.

**Tabelle 27: Reaktionsansatz eines Bradford-Assays.**

	<b>Protein- Probe [µl]</b>	<b>H<sub>2</sub>O Ampuwa [µl]</b>	<b>Gesamt- volumen [µl]</b>	
	0	250	250	} + 200 µl verdünntes <i>Protein Assay Dye Reagent Concentrate</i>
	0,5	249,5	250	
	1	249	250	
Eichreihe	2,5	247,5	250	
	5	245	250	
	7,5	242,5	250	
	10	240	250	
Studien- Proben	5	245	250	

Vom Reaktionsansatz wurden nach Vermischen mit dem Vortexmixer jeweils 200 µl in die Vertiefungen einer Mikroplatte mit 96 Vertiefungen gefüllt. Das Auftragen jedes Reaktionsansatzes auf die Mikroplatte erfolgte jeweils im Duplikat. Schnellstmöglich nach Zugabe des verdünnten *Protein Assay Dye Reagent Concentrate*, jedoch maximal innerhalb von 30 min, erfolgte die Messung im SynergyHT (Tabelle 9) mit den Einstellungen aus Tabelle 28 in der Software Gen5. Fiel vor der Messung im SynergyHT rein optisch eine tiefblaue, ähnlich zum höchst konzentrierten Ansatz der Eichreihe, intensive Färbung eines der Studienproben auf, wurde der Bradford-Assay für diese Probe verworfen und mit einem geringeren Volumen als 5 µl der unverdünnten Patientenprobe wiederholt angesetzt. Bei negativen Messergebnissen für Studienproben im Vergleich zur Standardreihe wurde der Bradford-Assay für diese Probe mit größerem Probenvolumen wiederholt und das Volumen an H<sub>2</sub>O Ampuwa im Reaktionsansatz jeweils angepasst.

Nach der Messung der Gesamtproteinkonzentration der Probe erfolgte die Verdünnung der Proben im Verhältnis 1 : 3 oder 1 : 7 für hoch-konzentrierte Proben mit Verdünnungsmedium für PBMC-Proben (3.1.6) und die Lagerung bei -80 °C.

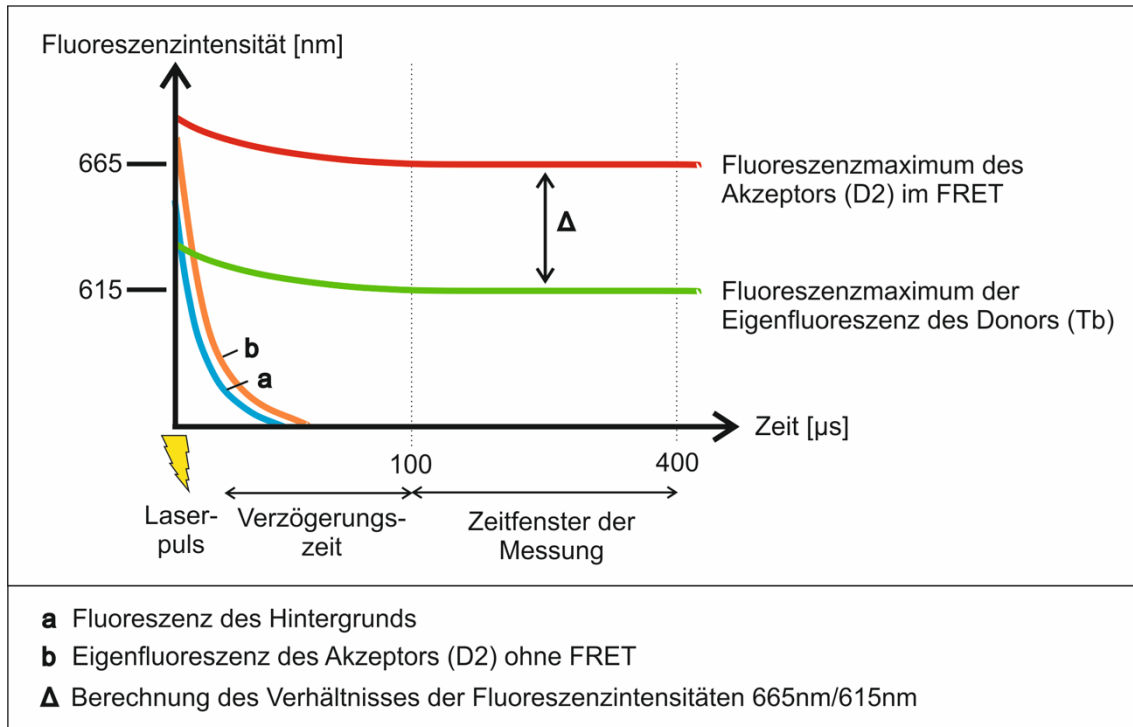
**Tabelle 28:** In der Software Gen5 für das Gerät SynergyHT gewählte Einstellungen der Parameter zur Durchführung eines Bradford-Assays.

Parameter	Einstellung
Platte	Typ 96-Well Mikrotiterplatte
Lesetechnik	Endzeitpunkt
Detektionsmethode	Extinktion
Lesegeschwindigkeit	Normal
Wellenlänge	Anzahl der gemessenen Wellenlängen 1
	Art [nm] 595
	Intensität 0
Schütteln	Dauer [s] 0
	Temperaturkontrolle Nein

### **3.2.9 *Time-resolved fluorescence energy transfer (TR-FRET) zur Bestimmung des ATXN3-Proteinlevels***

Die hochsensitive Hochdurchsatzmethode des TR-FRET (Bidinosti, et al., 2012) erlaubt die quantitative Messung von Proteingehalten für eine sehr große Anzahl an Proben (Cui, et al., 2014). Im Zusammenhang dieser Promotion wurde die TR-FRET-Methode für die quantitative Proteinbestimmung von expandiertem ATXN3 in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) eingesetzt. Die Methode basiert auf einer Energieübertragung zwischen zwei auf Antikörpern befestigten Fluoreszenzträgern (fluoreszenzmarkierte Antikörper), die in sehr enger räumlicher Nähe (zwischen 5 - 9 nm) an ein gemeinsames Zielprotein (hier: expandiertes ATXN3) binden. Dabei dient der eine Fluorophor als Donor, der andere als Akzeptor der Energie. Die genannte Energieübertragung vom Donor aus findet jedoch nicht spontan statt, sondern muss durch Anregung des Donors mittels Laserpuls als Energiequelle getriggert werden. Nach seiner Anregung emittiert der Donor langwährende Fluoreszenzsignale mit einem Fluoreszenzmaximum von 615 nm und überträgt fortwährend Energie auf den Akzeptor, welcher seinerseits langwährende Fluoreszenzsignale einer spezifischen Wellenlänge von 665 nm emittiert (Cui, et al., 2014). Diese Signale dieser beiden Wellenlängen werden detektiert. Um die Detektion durch kurzwährende unspezifische Fluoreszenzsignale nicht zu verfälschen, findet die Messung erst mit einer Verzögerungszeit von 100  $\mu$ s statt und dauert anschließend 300  $\mu$ s. Zu diesen kurzwährenden unerwünschten Fluoreszenzsignalen zählen einerseits die Eigenfluoreszenz des Akzeptors ohne FRET als auch die Fluoreszenz des Hintergrundmediums. Das Verhältnis der gemessenen Fluoreszenzintensitäten im TR-FRET ist nun proportional zur Zielproteinkonzentration, da die enge räumliche Nähe der beiden Fluorophore nur gegeben ist, wenn die fluoreszenzmarkierten Antikörper auf demselben Zielmolekül binden (Cui, et al., 2014). Zur Visualisierung sind die Fluoreszenzverläufe in Abbildung 10 schematisch dargestellt.

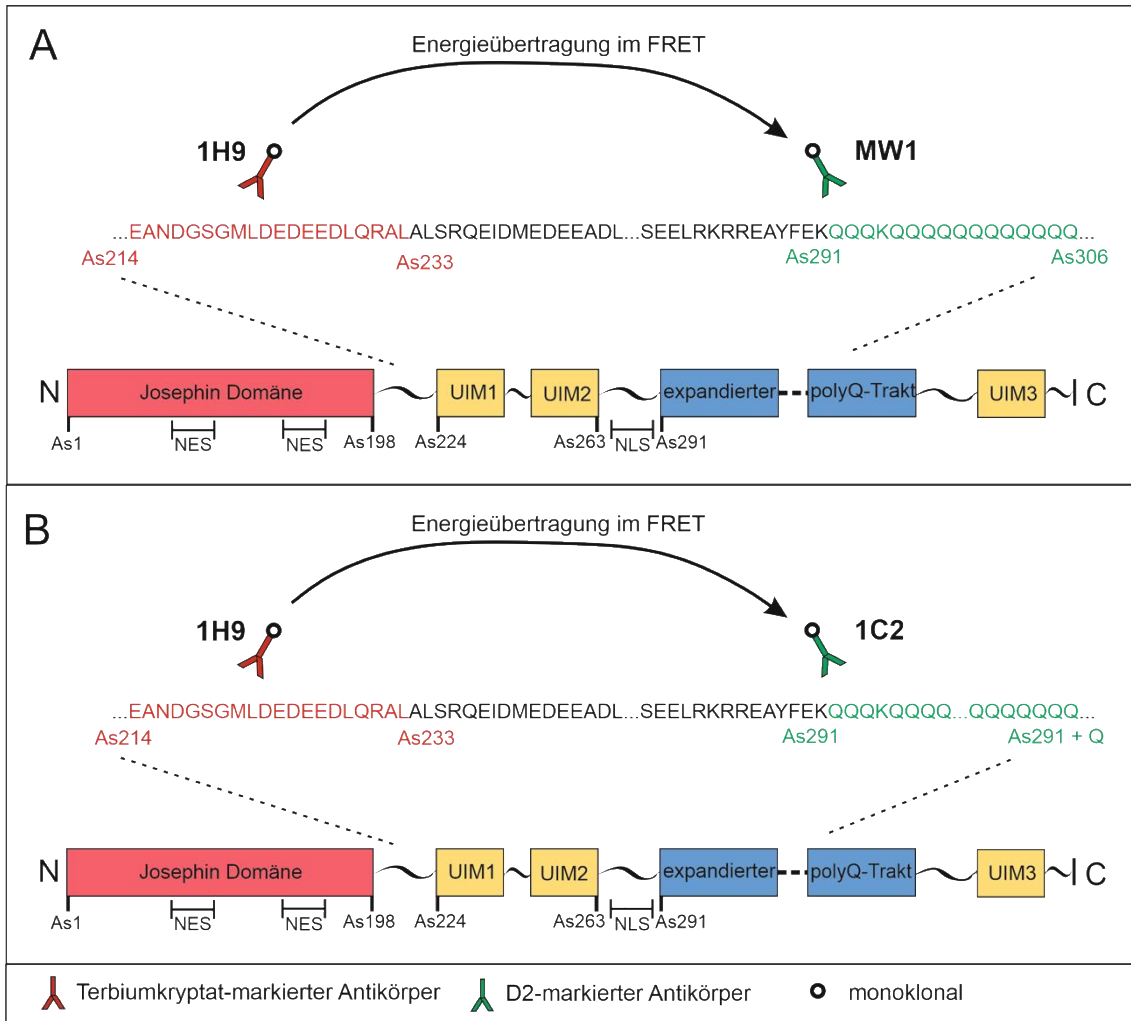




**Abbildung 10: Schema der Fluoreszenzverläufe von Donor (Tb) und Akzeptor (D2) im *Time-resolved fluorescence resonance energy transfer* (TR-FRET) zur quantitativen Messung von löslichem, expandiertem ATXN3 mit Hilfe einer Kombination aus zwei fluoreszenzmarkierten Antikörpern (adaptiert nach Cui et al. (2013)).** Das Liniendiagramm zeigt den Verlauf der Fluoreszenzintensitäten in nm aufgetragen über die Zeit in  $\mu$ s für die zwei antikörpergebundenen Lanthanoide D2 und Tb mit und ohne TR-FRET und für das Hintergrundmedium. Nach der Anregung durch einen Laserpuls sendet der Donor (Tb) langwährende Eigenfluoreszenz mit einem Maximum bei 615 nm aus. Bei räumlicher naher Bindung (5-9 nm) der beiden Antikörper an das gemeinsame Zielprotein kommt es zum Energietransfer vom Donor auf den Akzeptor (D2). Dieser sendet im FRET nun selbst langwährende Fluoreszenzsignale mit einem Maximum bei 665 nm aus. Die Messung findet mit einer Verzögerungszeit von 100  $\mu$ s statt, um die schnell abfallende Eigenfluoreszenz des Akzeptors ohne FRET und die Fluoreszenz des Hintergrunds auszuschalten. Das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten 665nm/615nm führt zu einem Signal  $\Delta F$  definiert als Signalprozent über dem Hintergrundsignal und ist proportional zur ATXN3-Konzentration. Tb = Terbiumkryptat.

In der vorliegenden Promotion diente Terbiumkryptat (Tb) im TR-FRET als Donor, D2-Fluorophore als Akzeptor. Terbiumkryptat zählt zu den Lanthanoiden bzw. den seltenen Erden und hat eine für Hunderte von  $\mu$ s anhaltende Eigenfluoreszenz. D2 hingegen zeigt allein stets eine kurzwährende Eigenfluoreszenz, die sich im Rahmen des TR-FRETs bei anhaltender Anregung durch Terbiumkryptat ebenfalls als langwährende Fluoreszenz präsentiert (Cui, et al., 2014). Beide Fluorophore waren an ATXN3-spezifische Antikörper gebunden, wobei zwei Antikörperkombinationen für die Messung des löslichen, expandierten ATXN3 als Zielprotein eingesetzt wurden (Tabelle 29). Als Akzeptor-Antikörper dienen dabei einerseits MW1-D2, andererseits 1C2-D2. Der Antikörper MW1 ist bereits in der Erforschung von Polyglutaminerkrankungen bekannt

und wird vor allem bei der Quantifizierung von löslichem, polyQ-expandiertem Huntingtin in Chorea Huntington erfolgreich in einem TR-FRET-Assay eingesetzt (Cui, et al., 2014). MW1 bindet spezifisch die polyQ-Region des Huntingtin mit mehr als sechs Glutaminen, erkennt aber vorzugsweise expandiertes, krankheitsassoziiertes Huntingtin (Ko, et al., 2001). Nguyen et al. (2013) modifizierten den bestehenden TR-FRET-Assay für Huntingtin durch Nutzung des Donor-Antikörpers 1H9-Tb zur Detektion von expandiertem ATXN3. 1H9-Tb bindet einen 20 Aminosäuren umfassenden Abschnitt von ATXN3 63 Aminosäuren N-terminal des polyQ-Trakts und ist damit spezifisch für ATXN3 (Nguyen, et al., 2013; Paulson, et al., 1997). In der Kombination mit dem Antikörper MW1-D2, der innerhalb von ATXN3 den polyQ-Trakt des Proteins bindet, wird im neuen etablierten TR-FRET-Assay lösliches ATXN3 mit mehr als 6 Qs detektiert, bevorzugt und sensitiver jedoch expandiertes ATXN3 (Nguyen, et al., 2013) (Abbildung 11A). In einem zweiten Assay fungierte der Antikörper 1C2 als Träger des Donors D2. Dieser wurde ursprünglich für die Detektion des TATA-Box Bindeprotein entwickelt, er detektiert in niedrigen Konzentrationen aber auch krankheitsverursachende Proteine in Polyglutaminerkrankungen. Bei SCA3-Patienten bindet 1C2-D2 somit den polyQ-Trakt von ATXN3, jedoch erst ab einer Länge von 37 Glutaminen und detektiert damit als Kombination mit 1H9-Tb ausschließlich lösliches, expandiertes ATXN3 (Trottier, et al., 1995) (Abbildung 11B).



**Abbildung 11: Schema der Epitope von ATXN3 und der Funktionsweise der im *Time-resolved fluorescence resonance energy transfer* (TR-FRET) verwendeten Antikörperkombinationen zur Messung von löslichem, expandiertem ATXN3 (adaptiert nach Nguyen et al. (2013)).** A) Antikörperkombination 1H9-Tb und MW1-D2 zur Messung von löslichem ATXN3 (Q > 6). B) Antikörperkombination 1H9-Tb und 1C2-D2 zur Messung von löslichem expandiertem ATXN3 (Q > 37). Bei räumlich naher Bindung der beiden Antikörper auf dem Zielprotein ATXN3 kommt es zur langanhaltenden Energieübertragung vom Donor (Tb) auf den Akzeptor (D2). Die Fluoreszenzmaxima beider Lanthanoide werden im Rahmen des TR-FRET detektiert. Ihr Verhältnis ist proportional zur Proteinkonzentration. AS = Aminosäure, UIM = Ubiquitin-interagierende Domäne, Q = Glutamin, NES = *Nuclear export signal*, NLS = *Nuclear localization signal*, N = Amino-Terminus, C = Carboxy-Terminus, n = Anzahl an Glutaminen im Polyglutamin-Bereich.

In der Vorbereitung auf die Messung wurden die nach dem Bradford-Assay verdünnten PBMC-Proben auf Eis aufgetaut. Als Positivkontrolle diente ein 1 : 16 verdünntes überexprimiertes ATXN3 (70Q), als Negativkontrolle das Verdünnungsmedium der PBMC-Proben. Für die Herstellung der Positivkontrolle hatte Dr. med. dent. Gabriele Anna Kaucher im Vorfeld ATXN3 in HEK293T-Zellen überexprimiert und ein Zellhomogenat hergestellt. In eine *ProxiPlate™-384 TC Plus* mit 384 Vertiefungen wurden jeweils 5 µl der Probandenproben,

Positivkontrolle oder Negativkontrolle als Duplikat in die Vertiefungen vorgelegt und 1 µl des Antikörper-Detektionspuffer-Gemisches in jede Vertiefung hinzu pipettiert. Die benötigten Volumina der Antikörperstocklösung zur Herstellung des Antikörper-Detektionspuffer-Gemischs errechnete sich aus der Konzentration des Antikörpers in der Stocklösung und der durch Dr. med. Kathrin Gonsior und Dr. med. dent. Gabriele Anna Kaucher etablierten Antikörpermenge pro Vertiefung (Tabelle 29).

**Tabelle 29: Durchgeführte TR-FRET Antikörperkombinationen mit ihren Markierungen, ihrer Stockkonzentrationen und tatsächlich im Assay eingesetzten Konzentrationen.**

Messung	Antikörper	Markierung	Konzentration im Stock [ng/µl]	eingesetzte AK-Menge [ng]
polyQ- expandiertes	1H9	Tb	161	0,5
ATXN3 (> 6 Q)	MW1	D2	211	3
polyQ- expandiertes	1H9	Tb	161	1
ATXN3 (> 37 Q)	5TF1-1C2	D2	393	3

Für den Ansatz des Antikörper-Detektionspuffer-Gemisches wurde entsprechend Detektionspuffer (3.1.6) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und die errechneten Volumina der Antikörperstocklösung zugesetzt. Um sicherzugehen, dass in alle probenhaltigen Vertiefungen der *ProxiPlate™-384 TC Plus* Antikörper-Detektionspuffer-Gemisch zugegeben wurde, erfolgte eine erste Kontrollmessung mittels des *Multimode Plate Reader* mit 337 nm *TRF Light Unit* und den in Tabelle 30 und Tabelle 31 gelisteten Einstellungen. Zeigten die probenhaltigen Vertiefungen ähnliche Fluoreszenzsignale wie die Vertiefungen ohne Probe, wurde das Versäumnis durch Zugabe des Antikörper-Detektionspuffer-Gemisch in der entsprechenden Vertiefung der *ProxiPlate™-384 TC Plus* korrigiert. Vor der eigentlichen Messung im *Multimode Plate Reader* mit 337 nm *TRF Light Unit* folgte eine lichtgeschützte Inkubation für 24 h bei 4 °C zur Vermengung von Probe und Antikörper und die Bindung der Antikörper an das

Zielprotein. Dabei ist zu beachten, dass die erhaltenen Signale nach einer Inkubation bei 4 °C laut Cui et al. (2014) nachweislich höher waren als bei einer Inkubation bei Raumtemperatur. Dies konnte durch Dr. med. dent. Gabriele Anna Kaucher unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden (mündliche Information). Vermutet werden kann der Signal-minimierende Einfluss von Verdampfung kleinster Volumina in den Vertiefungen der Platte über 24 Stunden Inkubationszeit bei Raumtemperatur. Nach dieser Inkubationszeit wurde die eigentliche Messung mit den in Tabelle 30 und Tabelle 31 gelisteten Einstellungen am *Multimode Plate Reader* mit 337 nm *TRF Light Unit* durchgeführt.

**Tabelle 30: Grundeinstellungen im *Multimode Plate Reader* mit 337 nm *TRF Light Unit*.**

Parameter		Einstellung
Identifikation		TR-FRET with TRF laser unit
Allgemein	Plattentyp	Kopie einer 384 ProxiPlate
	Gebrauch einer rotierten Platte	-
	Gebrauch einer allgemeinen Greifhöhe	ja
	Greifhöhe	2,5
	Gebrauch einer Messhöhe	ja
	Festgelegte Messhöhe (mm)	6,5
	Messmodus	nach Reihe, bidirektional
	Anzahl der Platten	Festgelegt
Wiederholungen	Anzahl der Assay Wiederholungen	1

**Tabelle 31: Einstellungen der 337nm *TRF Light Unit* des *Multimode Plate Reader*.**

Parameter	Einstellung
Name	<i>Copy of Homogeneous TRF Laser</i>
Anregung (Excitation)	Oben
Emission	Oben
Zweite Emission	Oben
Lichtquelle	Lichtquelle 2 - Laser

Spiegel oben	LANCE/DELFLIA Bias
Spiegel unten	keiner
Emissionsfilter	Europium 615 – Em Slot 2
Zweiter Emissionsfilter	APC 665 – Em Slot 3
Messhöhe [mm]	3
Verzögerungszeit [ $\mu$ s]	100
Zeitfenster der Messung [ $\mu$ s]	300
Anzahl aufeinanderfolgender Fenster	1
Zeit zwischen Blitzen [ $\mu$ s]	16600
Anzahl der Blitze	20
Anzahl der Blitze für den zweiten Detektor	5
Referenzsignal	396433
<i>Reference AD gain</i>	2

Die Messung ergab pro Probe jeweils einen Messwert für die Fluoreszenzmaxima der Wellenlängen 665 nm und 615 nm. Daraus wurde ein Verhältnis bei der Fluoreszenzintensitäten errechnet:

$$\text{Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten} = \frac{\text{Fluoreszenz}_{665 \text{ nm}}}{\text{Fluoreszenz}_{615 \text{ nm}}}$$

Zwischen beiden Duplikaten wurde maximal ein Pipettierfehler von 10 % geduldet. Im nächsten Schritt wurde  $\Delta F$  berechnet, welches als Signalprozent über dem Hintergrundsignal definiert ist. Dazu wurde das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten der Negativkontrolle von dem der Proben subtrahiert und auf den Gesamtproteingehalt der Probe angepasst, der vorher im Bradford-Assay bestimmt worden war.

$$\Delta F = \frac{\text{Verhältnis}_{\text{Probe}} - \text{Mittelwert}(\text{Verhältnis}_{\text{Negativkontrolle}})}{\text{Gesamtproteinkonzentration} \left[ \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}} \right]}$$

Der Mittelwert der  $\Delta F$ -Werte beider Duplikate, war proportional zur ATXN3-Konzentration und erlaubte damit eine verhältnismäßige, quantitative Bestimmung von löslichem, expandiertem ATXN3.

### 3.2.10 Statistische Analysen

Für die statistischen Analysen wurde das Programm GraphPad Prism8 verwendet. Vor jeder statistischen Analyse wurde ermittelt, ob bei den vorliegenden Kohorten Normalverteilungen vorliegen. Dazu wurde der D'Agostino-Pearson Test, bei unzureichend großer Stichprobe der Shapiro-Wilk-Test genutzt. Je nach Ergebnis wurde im Kommenden unterschiedlich verfahren. Wenn die Gesamtheit der Kohorten normalverteilt war, wurde bei  $\leq 2$  unabhängigen Kohorten der ungepaarte t-Test durchgeführt, bei  $> 2$  unabhängigen Kohorten eine einfaktorische Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) mit korrigierten p-Werten angewendet. Bei der statistischen Analyse von mehr als zwei nicht-normalverteilten Kohorten kam der Kruskal-Wallis-Test mit korrigierenden p-Werten zum Einsatz. Für höchstens zwei Merkmale, die nicht einer Normalverteilung folgen, wurde für die statistischen Analysen der Mann-Whitney-U-Test gewählt. Die Kennwerte zur Beschreibung der statistischen Analysen wurden ebenfalls nach Normalverteilung ausgewählt. So wurden bei Normalverteilung Median oder Mittelwert und Standardabweichung (SD), bei Nicht-Normalverteilung Median und Interquartilsabstand (IQA) genutzt, um die Ergebnisse zu beschreiben.

Für zusätzliche lineare Korrelationen wurde für normalverteilte Datensätze jeweils der Korrelationskoeffizient nach Pearson  $r_p$ , für nicht-normalverteilte Datensätze der Korrelationskoeffizient nach Spearman  $r_s$  errechnet, die Auskunft über den Grad der Relation zweier Variablen gaben.

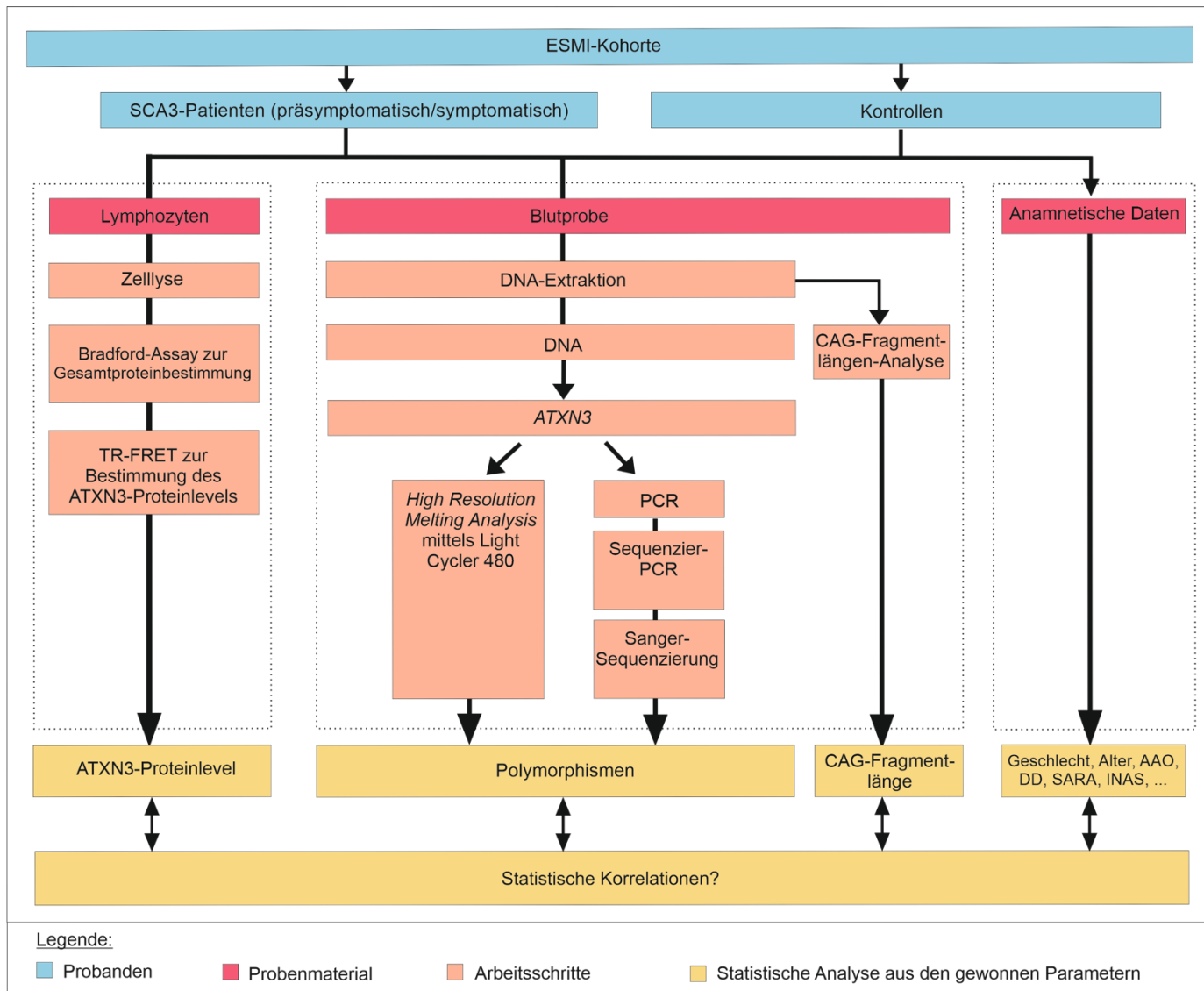
Die Einstufung für statistische Signifikanz war im Allgemeinen folgendermaßen definiert: nicht signifikant für p-Werte  $> 0,05$ , signifikant für p-Werte  $\leq 0,05$  (\*), deutlich signifikant für p-Werte  $\leq 0,01$  (\*\*), hoch signifikant für p-Werte  $\leq 0,001$  (\*\*\*) und höchst signifikant für p-Werte  $\leq 0,0001$  (\*\*\*\*).





#### 4 Ergebnisse

Im Rahmen der *European Spinocerebellar Ataxia Type3/Machado-Joseph-Disease Initiative* (ESMI) wurden nach hochstandardisierten Protokollen diverse Biomaterialien (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) und Vollblut) von SCA3-Patienten und Kontrollprobanden gesammelt und anamnestische Daten erhoben (Abbildung 12). Über den Weg einer Zellyse, eines Bradford-Assays und eines *Time-resolved fluorescence energy transfer* (TR-FRET) Assays wurde die Proteinkonzentration an ATXN3 in den PBMCs bestimmt. Das Vollblut diente als Grundlage für eine DNA-Extraktion und im Folgenden zur CAG-Fragmentlängen-Analyse und der Genotypbestimmung dreier Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) im Gen *ATXN3*. Die anamnestischen Daten wie beispielsweise Geschlecht, Alter, Alter bei Erkrankungsbeginn (AAO), Krankheitsdauer (DD) und die Punktzahl der rein klinischen Bewertungssysteme *Scale of the Assessment and Rating of Ataxia* (SARA) und *Inventory of Non-Ataxia Symptoms* (INAS) komplementierten den Datensatz. Dieser wurde im Weiteren für die statistische Analyse möglicher Korrelationen zwischen diesen Parametern genutzt. Die Analysen ermöglichten es der Frage nachzugehen, ob ATXN3 in PBMCs in Zukunft als Biomarker für die neurodegenerative Erkrankung SCA3 verwendet werden kann und ob bestimmte Genotypen der SNPs in *ATXN3* Einfluss auf Krankheitsverlauf und -schwere nehmen.



**Abbildung 12: Darstellung der Arbeitsschritte dieser Promotion als Flussdiagramm.** Dieses Diagramm bietet einen Überblick über die im Rahmen von ESMI bereitgestellten Biomaterialien (rot) von SCA3-Patienten und Kontrollen (blau) und deren folgende Verarbeitungsschritte in ihrer Reihenfolge (orange). Die durch diese Schritte erhaltenen Informationen und Parameter für die finale statistische Analyse sind in gelber Farbe markiert. DNA = *Deoxyribonucleic acid*, PCR = *Polymerase chain reaction*, AAO = Alter bei Krankheitsbeginn, DD = Krankheitsdauer, CAG = Basensequenz für die Aminosäure Glutamin, TR-FRET = *Time-resolved fluorescence energy transfer*, SARA = *Scale of the Assessment and Rating of Ataxia*, INAS = *Inventory of Non-Ataxia Symptoms*.

## **4.1 Kohortenanalyse und statistische Korrelationen der mittels TR-FRET gemessenen ATXN3-Proteinlevel in PBMCs**

### **4.1.1 Kohortenanalyse**

Im Rahmen von ESMI wurden dem Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik die Probenmaterialien EDTA-Blut und PBMCs isoliert aus CPT-Röhrchen zur Verfügung gestellt, die zuvor von Dr. med. dent. Gabriele Anna Kaucher und Patrik Pelz sowie weitergehend im Rahmen dieser Promotion untersucht wurden. Im Vorfeld hatte Dr. med. Kathrin Gonsior bereits im Zusammenhang mit der *NeurOmics* Studie unter der Aufsicht von Dr. rer. nat. Jeannette Hübener-Schmid den MW1-D2 Assay im TR-FRET zur Messung von ATXN3 etabliert, während Dr. med. dent. Gabriele Anna Kaucher innerhalb von ESMI zusätzlich den 1C2-D2 Assay etabliert hatte, um zusätzlich spezifischer expandiertes ATXN3 messen zu können. Bis zum Beginn der Forschung für diese Arbeit hatte Dr. med. dent. Gabriele Anna Kaucher die ATXN3-Proteinlevel für 82 im MW1-D2 und für 77 im 1C2-D2 Assay der hier eingeschlossenen Probanden aus der ESMI-Kohorte ermittelt.

Zum Zeitpunkt der statistischen Auswertung dieser Arbeit waren durch Dr. med. dent. Gabriele Anna Kaucher, Patrik Pelz und meiner Person zusätzlich die DNA von insgesamt 250 Probanden untersucht worden, die sich nach Tabelle 32 in 63 Kontrollprobanden, 33 präsymptomatische und 152 SCA3-Patienten mit manifester Erkrankung aufschlüsseln ließen. Dazu konnten zwei homozygote SCA3-Patienten in die Studie eingeschlossen werden. Von allen Probanden wurde in Zusammenarbeit mit Alexandra Grenzendorf der diagnostischen Abteilung des Instituts für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik des Universitätsklinikums Tübingen eine CAG-Fragmentlängen-Analyse durchgeführt. Für zwei Probanden erhielt man auch bei Wiederholung der Analyse keine eindeutigen Ergebnisse, sodass eine Zuordnung zur Kontrollgruppe bzw. den Mutationsträgern nicht sicher möglich war. Bei drei Mutationsträgern waren die klinischen Daten unvollständig, weshalb sie zugunsten der Einheitlichkeit aus den statistischen Analysen ausgeschlossen wurden. Für 72 Probanden konnte nur die DNA untersucht werden, weil keine PBMC-Proben vorlagen. Dieser Fall traf leider auch auf einen der beiden homozygoten SCA3-Patienten zu. Unter

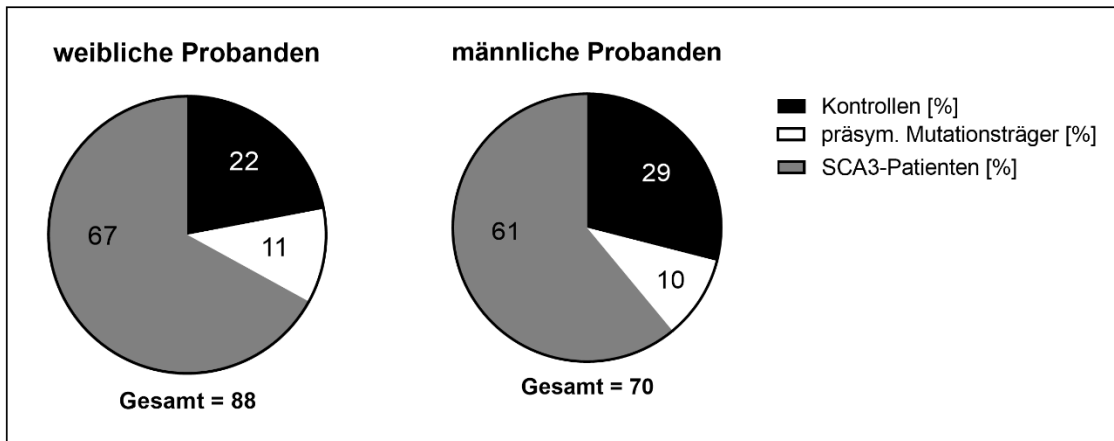
den Probanden mit PBMC-Röhrchen war bei dreien kein Pellet sichtbar gewesen. Dies wurde durch die Messungen mit dem *Time-resolved fluorescence energy transfer* (TR-FRET) bestätigt. Weitere zwölf Kontrollen und fünf Mutationsträger wurden wegen unverwertbarem TR-FRET Ergebnis aus den Analysen ausgeschlossen. Diesem lag vor allem zu große Pipettierungenauigkeiten von über 10 % bzw. fehlendes Material für eine Wiederholung der Messungen zu Grunde (Tabelle 32).

**Tabelle 32: Übersicht und Status der verarbeiteten DNA- und PBMC-Proben in ESMI.** CAG = Basensequenz für die Aminosäure Glutamin, PBMC = mononukleäre Zellen des peripheren Blutes, TR-FRET = *Time-resolved fluorescence energy transfer*.

	Gesunde Kontroll- probanden	Präsymptomatische Mutationsträger	Manifeste SCA3- Patienten	Homozygote SCA3- Patienten
Durchgeführte CAG- Fragmentlängen-Analyse	63	33	152	2
Verwertbare CAG- Fragmentlängen- Analysen	61	33	152	2
Unvollständig klinische Daten	-	1	2	-
Nur DNA erhalten, keine PBMC-Probe	11	15	45	1
Kein Pellet	-	-	3	-
Nicht verwertbares Er- gebnis im TR-FRET	12	-	5	-

Nach diesen Kriterien wurden letztendlich 39 Kontrollprobanden, 17 präsymptomatische Mutationsträger, 101 manifest erkrankte SCA3-Patienten und ein homozygot erkrankter SCA3-Patient in die statistischen Analysen der PBMC-Proben eingeschlossen (Tabelle 33). Unter den Kontrollprobanden waren 19 Personen weiblich, sodass der Frauenanteil von 49 % betrug. Unter den präsymptomatischen Mutationsträgern fiel dieser mit 41 % geringer aus, während die symptomatischen SCA3-Patienten einen höheren Frauenanteil von 58 % aufwiesen. Der einzige homozygote SCA3-Patient war männlich. Abbildung 13 gibt einen Überblick über den relativen Anteil der drei genetisch und klinisch unterschiedlichen Kohorten von weiblichen und männlichen Probanden. Es ist ersichtlich, dass sich unter beiden Geschlechtern der relative Anteil aller Kohorten in

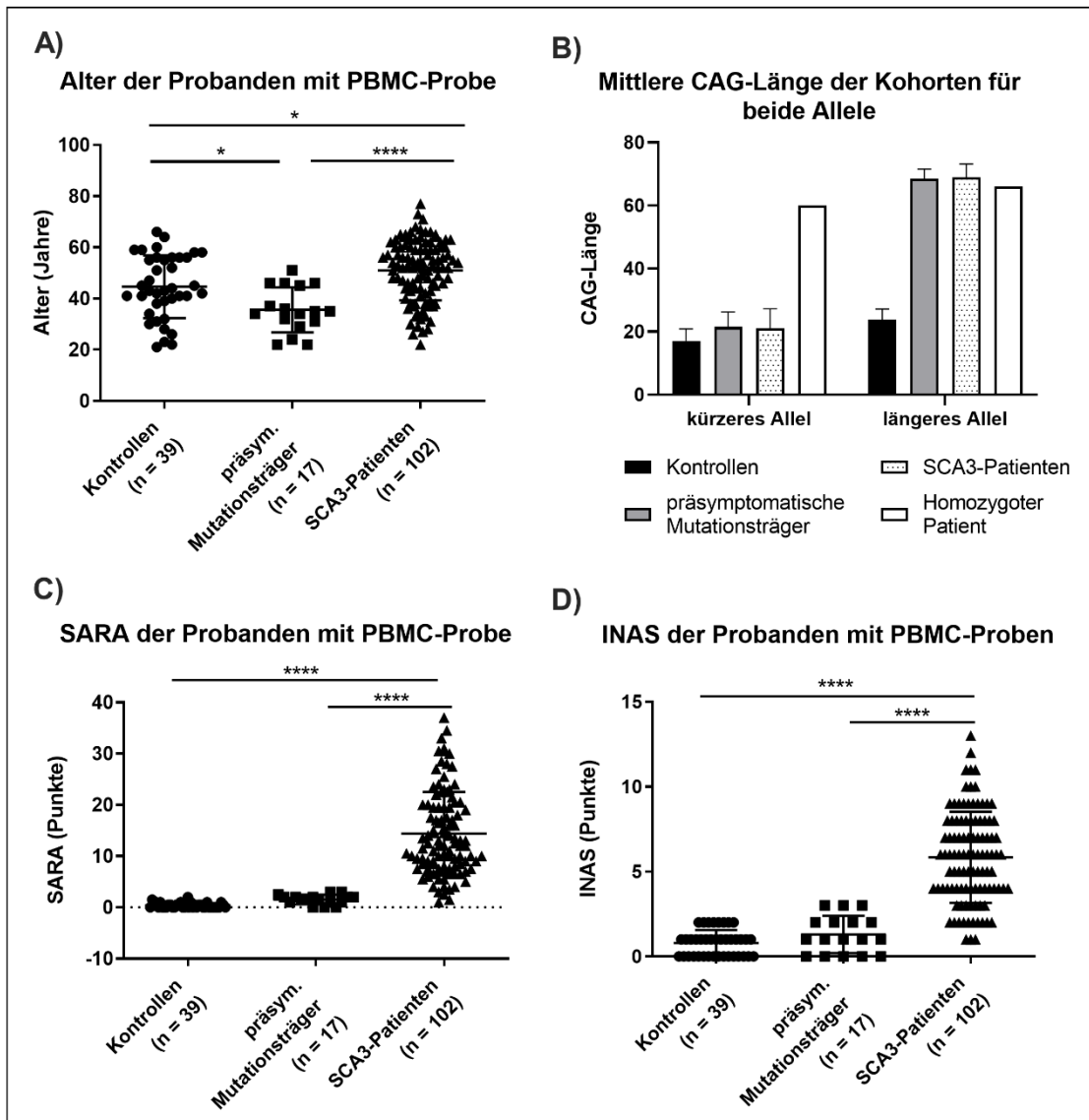
einer ähnlichen Größenordnung befand. Unter den männlichen Probanden befanden sich relativ beurteilt mehr Kontrollen, während unter den 88 weiblichen Probanden relativ mehr manifeste SCA3-Patienten zu finden waren.



**Abbildung 13: Anteil der Kontrollprobanden, präsymptomatischen Mutationsträger und SCA3-Patienten aufgeschlüsselt nach Geschlecht.** Mit einer Anzahl von 88 weiblichen und 70 männlichen Probanden wurden mehr Frauen rekrutiert. In den beiden Kreisdiagrammen für die weiblichen (links) und männlichen Probanden (rechts) ist der relative Anteil der drei Kohorten in % angegeben. Mit 11 % und 10 % fiel dieser für die präsymptomatischen Mutationsträger ähnlich groß aus. Unter den männlichen Probanden befand sich ein größerer Anteil (29 %) an Kontrollen, wohingegen die weiblichen Probanden mit 67 % mehr symptomatische SCA3-Patienten einschlossen.

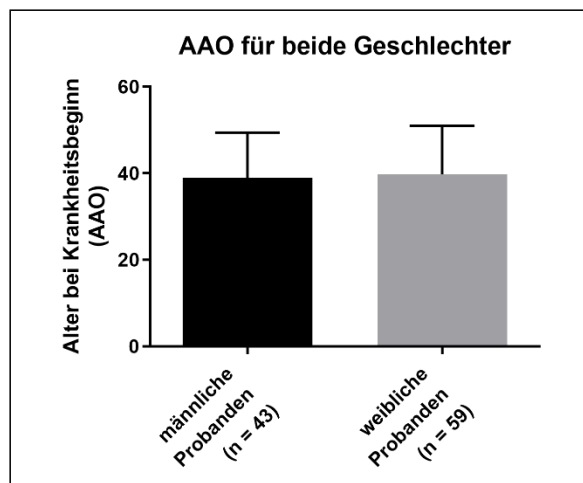
Für die folgende deskriptive Statistik wurden Kenndaten wie Median oder Mittelwert und Standardabweichung (SD) für normalverteilte Datensätze gewählt, während Median und Interquartilsabstand (IQA) für nicht-normalverteilte Datensätze genutzt wurden. Die Kontrollprobanden waren im Mittel 44,6 Jahre alt (SD =  $\pm 12,2$ ) und mit 6,4 Jahren nach einer einfaktoriellem Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) statistisch signifikant jünger als die SCA3-Patienten mit 51,0 Durchschnittsjahren (SD =  $\pm 11,7$ ) ( $p = 0,0112$ ) (Abbildung 14A). Wie zu erwarten, waren die präsymptomatischen Mutationsträger mit einem Mittelwert von 35,6 Lebensjahren (SD =  $\pm 8,8$ ) mittels einer ANOVA um 15,4 Jahre ( $p < 0,0001$ ) höchst signifikant jünger als diejenigen Mutationsträger, die bereits Symptome aufwiesen. Auf genetischer Ebene lagen bei den Kontrollprobanden dem kürzerem *ATXN3*-Gen der beiden Allele 17 CAG-Triplets (IQA = 7) zu Grunde, bei den präsymptomatischen Mutationsträgern 21,5 (SD =  $\pm 4,7$ ) und bei den SCA3-Patienten 21,2 (IQA = 12) CAG-Triplets. Das *ATXN3*-Gen des längeren Allels umfasste bei den Kontrollen als zweites nicht-expandiertes Allel im Mittel 23,8 CAG-Triplets (IQA = 4). Für die präsymptomatischen Mutations-

träger war eine mittlere Anzahl an CAG-Triplets von 68,5 CAGs (SD = ± 3,0) zu verzeichnen, für die manifest erkrankten SCA3-Patienten eine Länge von 67,0 CAGs (IAQ = 4,5). Der homozygote SCA3-Patient wies auf dem kürzeren der beiden expandierten Allele 60 und auf dem längeren Allel 66 CAG-Triplets auf (Abbildung 14B).



**Abbildung 14: Statistische Analyse von Alter, CAG-Länge, SARA und INAS zwischen Kontrollprobanden, präsymptomatischen und symptomatischen Mutationsträgern.** A) In der statistischen Analyse mittels ANOVA waren die Mutationsträger ohne Symptome höchst signifikant ( $p < 0,0001$ ) jünger als diejenigen mit Symptomen und signifikant jünger als die Kontrollprobanden ( $p = 0,0217$ ). Zusätzlich waren die SCA3-Patienten statistisch älter als die Kontrollprobanden ( $p = 0,0112$ ). B) Getrennt für das kürzere und längere Allel ist die mittlere CAG-Länge für die drei Kohorten und den präsymptomatischen Patienten als Balkendiagramm mit Standardabweichung dargestellt. C,D) Sowohl der SARA als auch der INAS waren für die symptomatischen SCA3-Patienten mit Kruskal-Wallis-Test höchst signifikant höher als für die Kontrollprobanden und präsymptomatischen Mutationsträger ( $p < 0,0001$ ), welche sich statistisch nicht signifikant voneinander unterschieden (SARA:  $p = 0,4132$ , INAS:  $p > 0,9999$ ). CAG = Basensequenz für die Aminosäure Glutamin, SARA = Scale for the Assessment and Rating of Ataxia, INAS = Inventory of Non-Ataxia Symptoms.

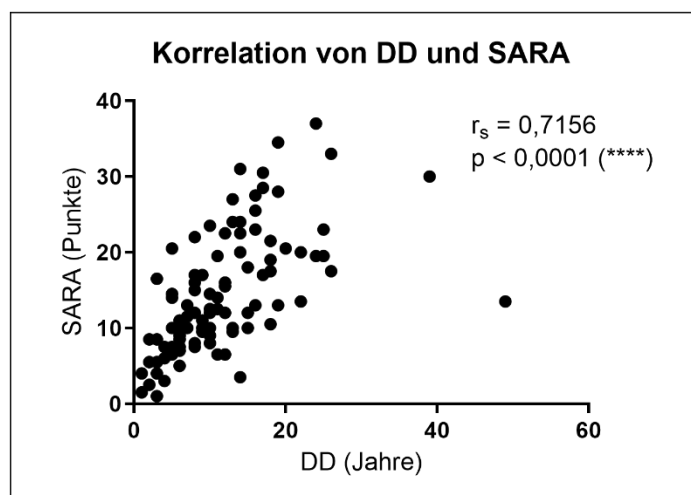
Die klinisch manifesten Mutationsträger hatten im Durchschnitt mit 39,4 Lebensjahren ( $SD = \pm 10,9$ ) Symptome entwickelt, der homozygote SCA3-Patient mit einem Krankheitsbeginn (AAO) bei 30 Lebensjahren deutlich früher. Generell erkrankten männliche SCA3-Patienten tendenziell ein wenige Monate früher im Leben (Mittelwert: 38,9 Jahre) als weibliche SCA3-Patienten (Mittelwert: 39,7 Jahre), dies blieb jedoch ohne statistische Signifikanz ( $p = 0,6925$ ) (Abbildung 15).



**Abbildung 15: Alter bei Krankheitsbeginn für beide Geschlechter.** Die männlichen SCA3-Patienten waren im Durchschnitt etwas früher als erkrankt als die weiblichen. Diese Beobachtung blieb aber ohne statistische Signifikanz ( $p = 0,6925$ ). AAO = Alter bei Krankheitsbeginn.

Zum Zeitpunkt der Datenerhebung hatte die Erkrankung bei den SCA3-Patienten im Mittel bereits 11,6 Jahre ( $IQA = 10$ ) andauert (*disease duration*, DD), während der Symptombeginn des homozygoten SCA3-Patienten bereits 16 Jahren zurücklag (Tabelle 33). Für die Erhebung des Krankheitsstatus bzw. der Symptomschwere wurden die klinischen Bewertungssysteme *Scale for the Assessment and Rating of Ataxia* (SARA), *Inventory of Non-Ataxia Symptoms* (INAS) und *Cross-sectional annual disease progression* (CSDP) herangezogen. Der SARA wurde in Rücksprache mit dem Zentrum für Neurologie am Universitätsklinikum Tübingen (Prof. Dr. med. Ludger Schöls, Prof. Dr. Matthias Synofzik) als klinisches Bewertungsinstrument für die Ausprägung ataktischer Symptome folgendermaßen definiert: nicht betroffen ( $< 3$  Punkte), leicht betroffen (3-12 Punkte), moderat betroffen (13-24 Punkte), schwer betroffen ( $> 24$  Punkte). Entsprechend dazu passend betrug der mittlere SARA der Kontrollprobanden

0,4 Punkte (IQA = 1) und der präsymptomatischen Mutationsträger 1,5 Punkte (SD = ± 0,9), die sich damit in der statistischen Analyse mit Kruskal-Wallis-Test nicht signifikant unterschieden ( $p = 0,4132$ ). Der Mittelwert des SARA der SCA3-Patienten ergab sich aus einer Fülle von Probanden mit unterschiedlichem Krankheitsstatus und Erkrankungsdauer. Der mittlere SARA von 14,3 Punkten lag nach Kruskal-Wallis-Test statistisch höchst signifikant ( $p < 0,0001$ ) über dem der Kontrollen und der Mutationsträger ohne Symptome. Beim homozygoten SCA3-Patienten war ein SARA von 23 Punkten ermittelt worden. Ein IQA von 11,25 Punkten beim SARA der SCA3-Patienten indizierte hier bereits die große Bandweite der verschiedenen Krankheitsausprägungen (Abbildung 14C). Der CSDP setzt die SARA-Punkte eines Patienten ins Verhältnis zur Erkrankungsdauer (DD) und spiegelte damit die Schwere der Krankheitsprogression pro Jahr wider. Seine Grundlage ist die statistisch höchst signifikante Korrelation von SARA mit der DD (Abbildung 16).



**Abbildung 16: Korrelation von DD und SARA.** Die höchst signifikante Korrelation zwischen DD und SARA ist die Grundlage für den CSDP. Die Korrelation zeigt, dass die Krankheitssymptome zunehmen, je länger ein Patient erkrankt ist. DD = Krankheitsdauer, SARA = *Scale for the Assessment and Rating of Ataxia*, CSDP = *Cross-sectional annual disease progression*.

Die Berechnung des CSDP ergab für die SCA3-Patienten einen CSDP-Mittelwert von 1,5 SARA-Punkten pro Erkrankungsjahr (IQA = 0,9). Mit einem SARA von 23 und einer DD von 16 Jahren errechnete sich für den homozygoten SCA3-Patienten eine Krankheitsprogression von 1,4 SARA-Punkten pro Erkrankungsjahr (Tabelle 33). Der INAS bewertete in einem Punktesystem von 0-16 Punkten zusätzlich zum SARA die nicht-ataktische, neurologische Symp-



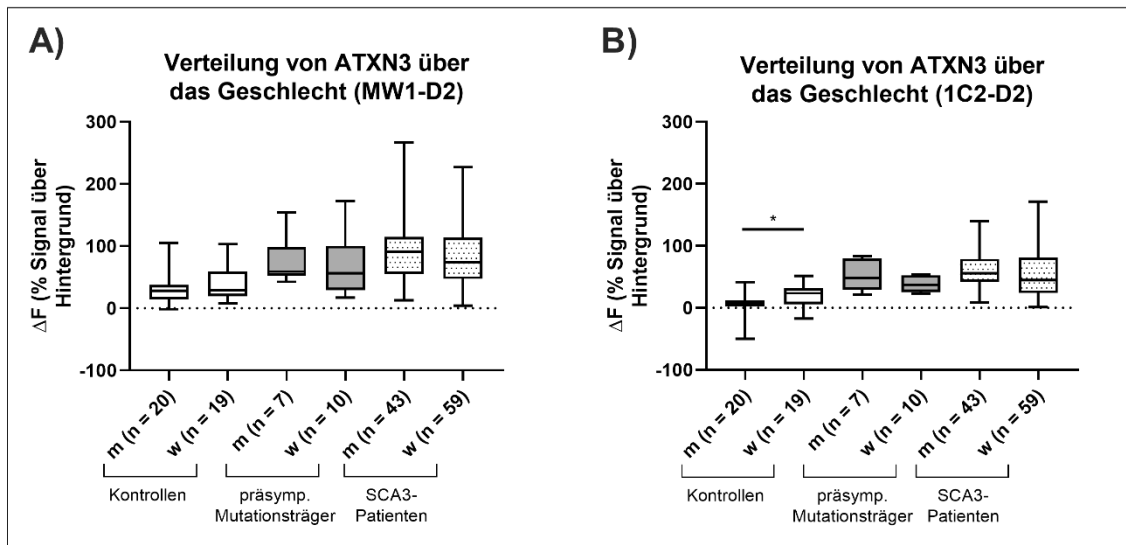
tomatik der Probanden. Wie zu erwarten ergab der Kruskal-Wallis-Test mit im Mittelwert 5,7 Punkten (SD = ± 2,6) einen statistisch höheren INAS für Mutationsträger im symptomatischen Krankheitsstatus als für die Kontrollprobanden und präsymptomatischen Mutationsträger (p < 0,0001). Diese wiesen ihrerseits einen mittleren INAS von 0,8 Punkten (IQA = 1) und 1,3 Punkten (SD = ± 1,1) auf und unterschieden sich damit nicht statistisch signifikant voneinander (p > 0,9999) (Abbildung 14D). Der homozygote SCA3-Patient war mit 8 INAS-Punkten auf dem Feld der nicht-ataktischen Symptome deutlich neurologisch auffällig. Tabelle 33 bietet einen Überblick über die rekrutierten Probanden, die Eckdaten und den Erkrankungsstatus der Kohorte, welche für die statistische Analyse der PBMC-Proben herangezogen wurden.

**Tabelle 33: Eckdaten der vollständigen Kohorte für die statistische Analyse der PBMC-Proben dargestellt als Mittelwert oder Median.** CAG = Basensequenz für die Aminosäure Glutamin, SARA = Scale for the Assessment and Rating of Ataxia, INAS = Inventory of Non-Ataxia Symptoms, CSDP = Cross-sectional annual disease progression.

	<b>Gesunde Kontrolle- probanden</b>	<b>Präsymptomatische Mutationsträger</b>	<b>Manifeste SCA3- Patienten</b>	<b>Homozygoter SCA3-Patient</b>
<b>Kohortenstärke (Frauenanteil)</b>	39 (19; 49 %)	17 (7; 41%)	101 (59; 58 %)	1 (0; 0 %)
<b>Alter</b> in Jahren	44,6 (SD = ± 12,2)	35,6 (SD = ± 8,8)	51,0 (SD = ± 11,7)	46
<b>CAG- Wiederholungen kurzes Allel</b>	17 (IQA = 7)	32,5 (SD = ± 4,7)	21,1 (IQA = 12)	60
<b>CAG- Wiederholungen langes Allel</b>	23,8 (IQA = 4)	68,5 (SD = ± 3,0)	67,0 (IQA = 4,5)	66
<b>Erkrankungsbeginn</b> in Jahren	-	-	39,4 (SD = ± 10,9)	30
<b>Erkrankungsdauer</b> in Jahren	-	-	11,6 (IQA = 10)	16
<b>SARA</b> in Punkten von max. 40	0,4 (IQA = 1)	1,5 (SD = ± 0,9)	14,3 (IQA = 11,25)	23
<b>INAS</b> in Punkten von max. 16	0,8 (IQA = 1)	1,3 (SD = ± 1,1)	5,7 (SD = ± 2,6)	8
<b>CSDP</b> in SARA- Punkte/Erkrankungs- dauer	-	-	1,5 (IAQ = 0,9)	1,4

Im Folgenden werden Ergebnisse der statistischen Analyse der mittels TR-FRET gemessenen ATXN3-Proteinlevel präsentiert. Dabei erfolgte die Messung von ATXN3 in PBMC-Proben im Rahmen dieser Promotion mit zwei verschiedenen Antikörper-Assays. Eingesetzt wurden neben dem Donorantikörper 1H9-Tb die beiden Akzeptorantikörper MW1-D2 und 1C2-D2. Ersterer detektierte ATXN3 mit mindestens sechs Glutaminen (Q) im polyQ-Trakt. Letzterer konnte spezifisch polyQ-expandiertes ATXN3 mit mindestens 37 Qs im polyQ-Trakt des Proteins binden. Zur exakten Interpretation der Ergebnisse wurde zuerst der verzerrende Einfluss von möglichen Alterseffekten, Geschlechtseffekten oder Zentrumeffekten auf das Ergebnis der ATXN3-Messungen mittels TR-FRET ausgeschlossen bzw. aufgedeckt.

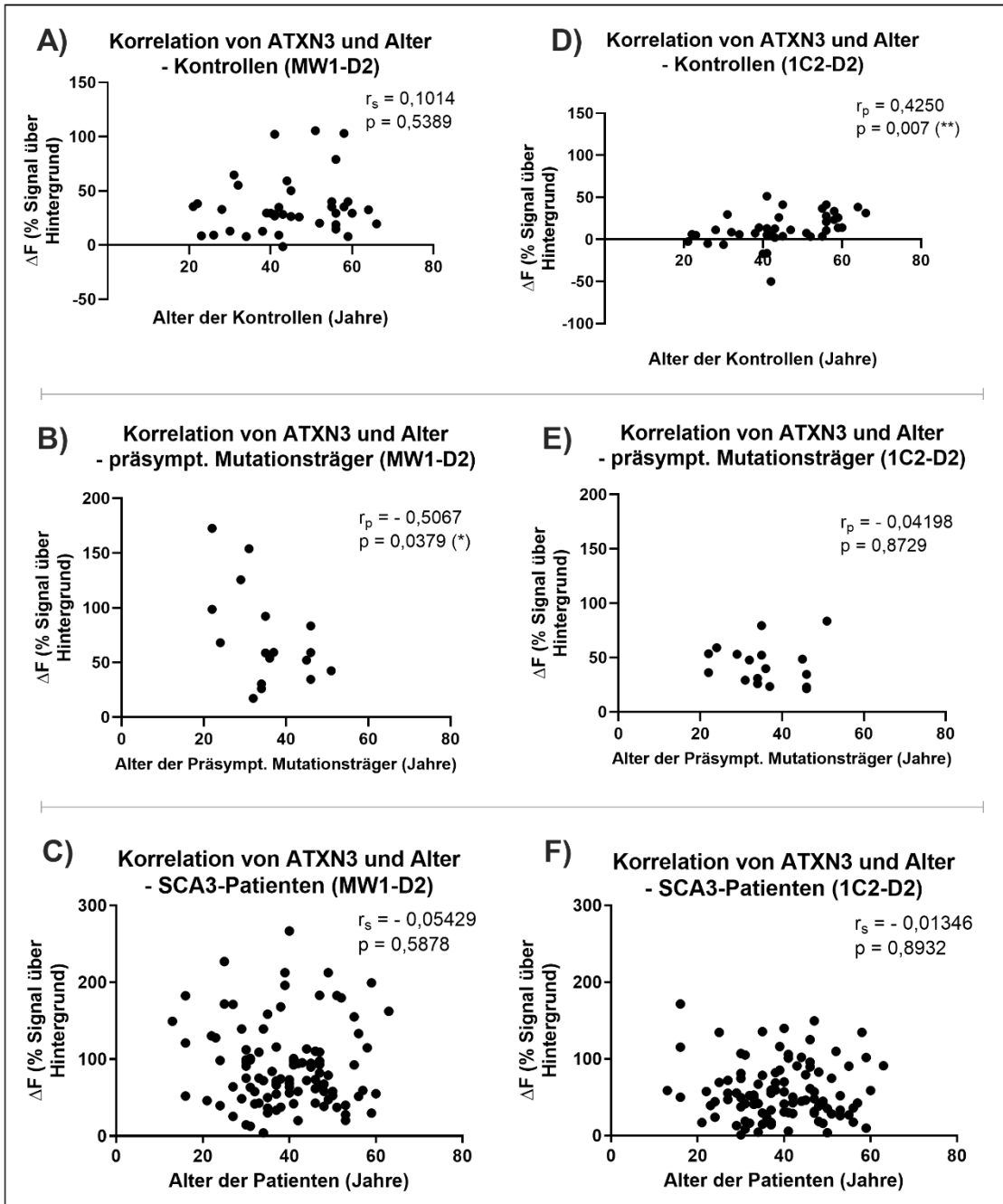
Bezüglich des Geschlechts wurden sowohl für den MW1-D2- als auch den 1C2-D2-Antikörper aufgrund fehlender Normalverteilung des Großteils der Datensätze jeweils das ATXN3-Proteinlevel der männlichen und weiblichen Probanden für alle drei Kohorten mit dem Mann-Whitney-U-Test direkt verglichen (Abbildung 17A, B). Lediglich für die statistische Analyse des Geschlechts der präsymptomatischen Mutationsträger mit dem Antikörper 1C2-D2 wurde bei Normalverteilung der beteiligten Kohorten auf den Welch-Test zurückgegriffen. Für den MW1-D2 Assay ergaben sich sowohl für die Kontrollen ( $p = 0,4115$ ) als auch für die präsymptomatischen ( $p = 0,6009$ ) und symptomatischen Mutationsträger ( $p = 0,4742$ ) keine statistisch relevanten Zusammenhänge zwischen Geschlechter der Probanden und dem ATXN3-Proteinlevel (Abbildung 17A), wobei die ATXN3-Proteinlevel tendenziell für männliche Probanden höher ausfielen. Insgesamt konnte davon ausgegangen werden, dass die ATXN3-Proteinlevel nicht relevant vom Geschlecht der Probanden beeinflusst wurden. Für den 1C2-D2 Assay (Abbildung 17B) ergaben sich ähnliche Ergebnisse. Die ATXN3-Proteinlevel der präsymptomatischen Mutationsträger ( $p = 0,2398$ ) und der symptomatischen SCA3-Patienten ( $p = 0,1365$ ) unterschieden sich mit diesem Antikörper nicht statistisch signifikant für Frauen und Männer, wobei auch hier für männliche Probanden tendenziell höhere ATXN3-Proteinlevel gemessen wurden. Unter den weiblichen Kontrollprobanden waren mit dem 1C2-D2 jedoch signifikant höhere Messwerte feststellbar ( $p = 0,0328$ ).



**Abbildung 17: Einfluss des Geschlechts auf die ATXN3-Proteinlevel für den MW1-D2 und 1C2-D2 Assay.** In A) und B) wurden die ATXN3-Proteinlevel für die drei Kohorten Kontrollen, präsymptomatische Mutationsträger und symptomatische SCA3-Patienten aufgetragen. A) Der Mann-Whitney-U-Test stellte für den MW1-D2 keine signifikanten Unterschiede im ATXN3-Proteinlevel zwischen männlichen und weiblichen Probanden fest. B) Für den 1C2-D2 lieferte weder der Welch-Test für die präsymptomatischen Mutationsträger, noch der Mann-Whitney-U-Test für die SCA3-Patienten signifikante Unterschiede im ATXN3-Level zwischen den Geschlechtern. Unter den Kontrollen wurden für die weiblichen Probanden signifikant höhere ATXN3-Proteinlevel gemessen ( $p = 0,0328$ ). m = männlich, w = weiblich.

Als nächstes wurde der Einfluss des Alters auf die ATXN3-Proteinlevel beurteilt. Dazu wurde die Korrelation beider Größen bei Vorliegen einer Normalverteilung mit dem Korrelationskoeffizienten nach Pearson bzw. für nicht-normalverteilte Daten mit dem Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman untersucht. Bei den Analysen des MW1-D2 Assays ist sowohl für die Kontrollen ( $r_s = 0,5389$ ) als auch die SCA3-Patienten ( $r_s = -0,05429$ ) keine signifikante Korrelation zu verzeichnen gewesen (Abbildung 18A, C). Anderes galt hingegen für die präsymptomatischen Mutationsträger, die mit einem  $r_p = -0,5067$  einen inversen Zusammenhang zwischen Alter und ATXN3-Proteinlevel aufwiesen, der nur zu 3,79 % durch Zufall entstanden war ( $p = 0,0379$ ) (Abbildung 18B). Bei den Messungen mit dem MW1-D2 Assay galt demnach: je höher das Alter des präsymptomatischen Mutationsträgers, desto niedriger der ATXN3-Proteinspiegel. Im 1C2-D2 Assay konnte unter den Mutationsträgern unabhängig vom Erkrankungsstatus keine Korrelation zwischen Alter und ATXN3-Proteinlevel nachgewiesen werden ( $r_p = -0,04198$ ;  $r_s = -0,01346$ ) (Abbildung 18E, F). Eine leichte bis mittelmäßige Korrelation zwischen Alter und ATXN3-Proteinlevel ergab sich hingegen für die Kontrollen. Der zugehörige Korrelationskoeffizient  $r_p = 0,4250$

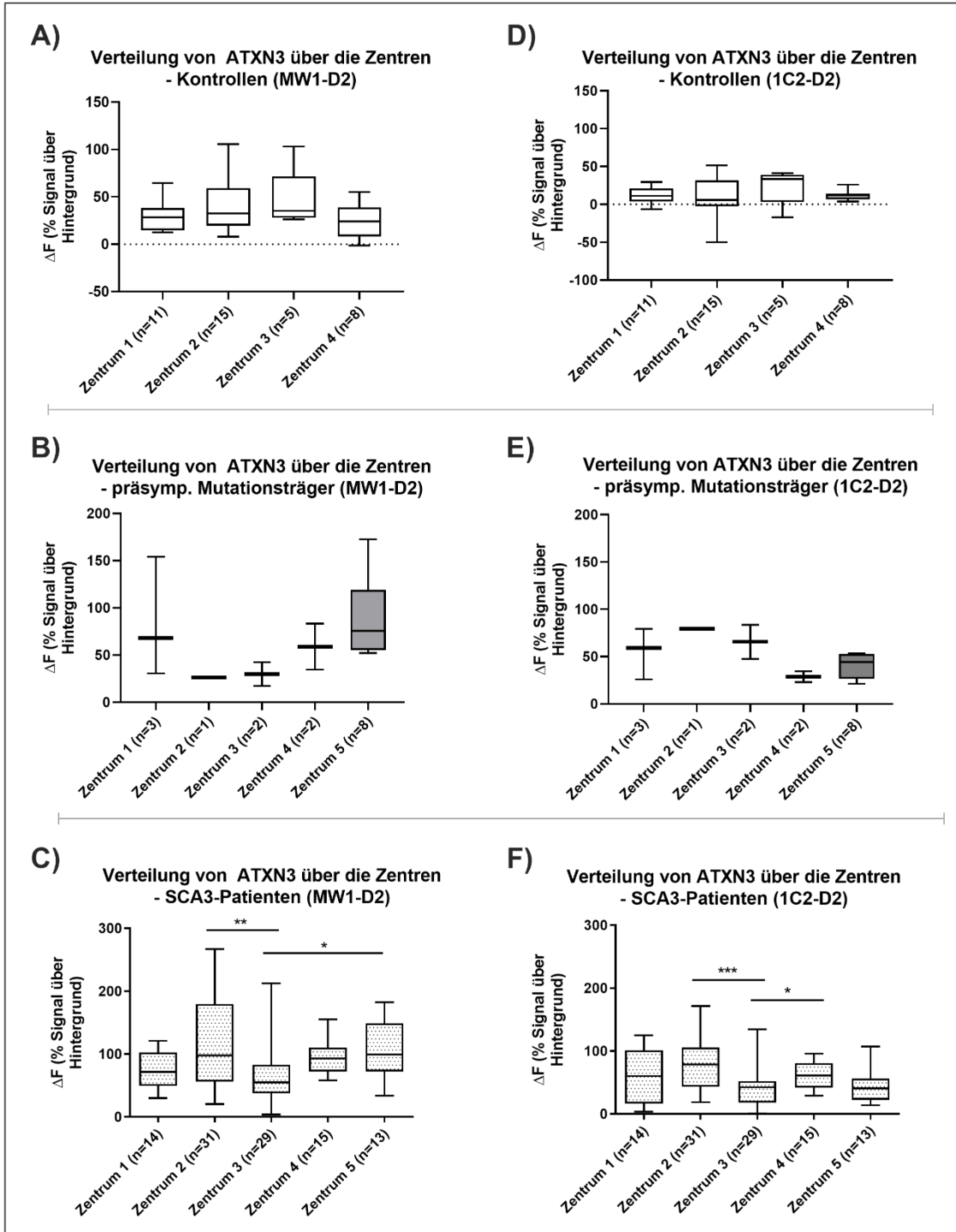
war in der statistischen Analyse deutlich signifikant ( $p = 0,007$ ) (Abbildung 18D). Diese Ergebnisse sind hinsichtlich der limitierten Bindefähigkeiten des 1C2-D2 Antikörpers und der Notwendigkeit von mindestens 37 Glutaminen im polyQ-Trakt kritisch zu betrachten, da die Kontrollen im Mittel auf ihrem längeren Allel lediglich 23,8 CAG-Triplett-Wiederholungen aufwiesen. Als mögliche Fehlerquelle müssen hier zu hohe Hintergrundsignale im Assay, potenzielle Vertauschungen der Proben oder fehlerhafte Messungen in Betracht gezogen werden.



**Abbildung 18: Einfluss des Alters auf die ATXN3-Proteinlevel für den MW1-D2 und 1C2-D2 Assay.** In A) – F) wurden die ATXN3-Proteinlevel über das Alter der Probanden in Jahren getrennt nach Kontrollen, präsymptomatischen Mutationsträgern und SCA3-Patienten und nach den im TR-FRET verwendeten Antikörpern aufgetragen. Für normalverteilte Kohorten wurde der  $r_p$  nach Pearson, für nicht-normalverteilte Daten der  $r_s$  nach Spearman berechnet. Die Analysen des MW1-D2 Assays ergaben eine statistisch signifikante, inverse Korrelation von Alter und ATXN3-Level für die präsymptomatischen Mutationsträger ( $r_s = -0,5067$ ,  $p = 0,0379$ ). Unter den Kontrollen zeigte sich im 1C2-D2 Assay eine leichte Korrelation von Alter und ATXN3-Proteinlevel ( $r_p = 0,4250$ ,  $p = 0,007$ ). Für alle anderen Kohorten war keine Beeinflussung des ATXN3-Proteinlevels durch das Alter feststellbar. TR-FRET = *Time-resolved fluorescence energy transfer*.

Insgesamt sind PBMC-Proben aus fünf Zentren in Europa (Tübingen, London, Bonn, Coimbra, Azoren) analysiert worden, wobei Zentrum 5 keine PBMC-Proben von Kontrollprobanden zur Verfügung stellte. Es wurde untersucht, ob

wohntortsspezifische Einflüsse auf die ATXN3-Proteinlevel existierten oder im Vorfeld bei der Selektion der Probanden unbeabsichtigt relevante Unterschiede zwischen den Zentren entstanden waren, die im weiteren Verlauf entscheidenden Einfluss auf die statistischen Analysen nahmen. Letzterem sollte speziell mit dem Gebrauch hochstandardisierter Protokolle für die Blutentnahme und Verarbeitung der Proben innerhalb des Konsortiums vorgebeugt werden. Im Vorfeld der Analysen war besonders die kleine Gruppengröße der Kontrollen und präsymptomatischen Mutationsträger zu beachten. Flächendeckend waren die untersuchten Datensätze in ihrer Gesamtheit weder mit dem Shapiro-Wilk-Test für kleine Gruppengrößen noch mit dem D'Agostino und Pearson-Test normalverteilt, weshalb für die statistischen Analysen der Kruskal-Wallis-Test zum Einsatz kam. Für die Kontrollen waren mit Anpassung der p-Werte im Rahmen des Test weder mit dem MW1-D2 ( $p = 0,4968$ ) noch mit dem 1C2-D2 Assay ( $p = 0,4838$ ) signifikante Unterschiede im ATXN3-Proteinlevel zwischen den Zentren feststellbar (Abbildung 19A, D). Das Gleiche galt für die präsymptomatischen Mutationsträger, bei denen die zusammenfassenden p-Werte des Kruskal-Wallis-Test für den MW1-D2 Assay bei  $p = 0,1487$  und für den 1C2-D2 Assay bei  $p = 0,1926$  lagen und damit keine signifikanten Einflüsse des Zentrums auf den ATXN3-Proteinlevel ergaben (Abbildung 19B, E). Für Mutationsträger mit Symptomen ergab sich für den MW1-D2 Assay ein deutlich signifikanter Unterschied zwischen den ATXN3-Leveln des Zentrums 2 und 3 ( $p = 0,0081$ ), wobei Zentrum 2 dabei die höheren Messwerte aufwies (Abbildung 19C). Diese Ergebnisse konnten auch mit dem 1C2-D2 Assay reproduziert werden, wobei dieser Unterscheid hierbei sogar hoch signifikant ausfiel ( $p = 0,0006$ ) (Abbildung 19F). Mit einem p-Wert von  $p = 0,0479$  waren für den MW1-D2 Assay auch die ATXN3-Messwerte zwischen Zentrum 3 und 5 statistisch signifikant verschieden. Im Falle des 1C2-D2 Assays war darüber hinaus ein signifikanter Unterschied der ATXN3-Proteinlevel zwischen Zentrum 3 und 4 zu verzeichnen ( $p = 0,0459$ ). In beiden Fällen waren für Zentrum 3 die niedrigeren Proteinlevel ermittelt worden, sodass in der Zusammenschau für Zentrum 3 besonders niedrige und Zentrum 2, 4 (1C2-D2) und 5 (MW1-D2) besonders hohe ATXN3-Proteinlevel ins Auge fielen.



**Abbildung 19: Einfluss des Zentrums auf die ATXN3-Proteinlevel für den MW1-D2 und 1C2-D2 Assay.** A) – F) Aufgeschlüsselt in die drei Kohorten wurden hier die ATXN3-Proteinlevel der PBMC-Proben der fünf partizipierenden europäischen Partnerzentren gezeigt. Zentrum 5 lieferte keine PBMC-Proben von Kontrollprobanden. Aufgrund der Nicht-Normalverteilung der Datensätze wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test gearbeitet. Zwischen den ATXN3-Proteinleveln der Kontrollen und präsymptomatischen Mutationsträger waren keine Unterschiede zwischen den Zentren erkennbar. Unter den SCA3-Patienten war für den MW1-D2 Assay die Proteinlevel des Zentrums 3 signifikant niedriger als die des Zentrums 2 ( $p = 0,0081$ ) und des Zentrums 5 ( $p = 0,0479$ ). Für den 1C2-D2 Assay ließen sich signifikant niedrigere Werte für das Zentrum 3 gegenüber Zentrum 2 ( $p = 0,0006$ ) und Zentrum 4 ( $p = 0,0459$ ) nachweisen.

Tabelle 34 präsentiert die Ergebnisse zur Kohortenanalyse der ESMI-Kohorte für die kommenden Analysen.

**Tabelle 34: Zusammenfassung des Einflusses von Geschlecht, Alter und Zentrum auf das ATXN3-Proteinlevel.**

Parameter	ATXN3-Proteinlevel im MW1-D2 Assay	ATXN3-Proteinlevel im 1C2-D2 Assay
<b>Geschlecht</b>	Innerhalb der drei Kohorten (Kontrollen, präsymptomatische Mutationsträger und SCA3-Patienten) tendenziell höhere Werte für männliche Probanden, aber ohne statistische Relevanz.	Für präsymptomatische Mutationsträger und SCA3-Patienten keine statistisch relevanten Unterschiede mit tendenziell höheren ATXN3-Proteinleveln für männliche Probanden. Statistisch relevant höhere Level für weibliche Kontrollen ( $p = 0,0328$ ).
<b>Alter</b>	Kontrollen und symptomatische SCA3-Patienten ohne signifikante Korrelation zwischen Alter und ATXN3-Proteinlevel. Für präsymptomatische Mutationsträger inverse Korrelation der Parameter ( $r_p = - 0,5067$ ; $p = 0,0379$ ).	Keine Korrelation von Alter und ATXN3-Proteinlevel für Mutationsträger. Kritisch zu betrachtende leichte bis mittelmäßige Korrelation von Alter und ATXN3-Proteinlevel bei Kontrollen ( $r_p = 0,4250$ , $p = 0,007$ ).
<b>Zentrum der Probenverarbeitung</b>	Statistisch relevant niedrige ATXN3-Proteinlevel für Zentrum 3, signifikant hohe ATXN3-Proteinlevel für Zentrum 2 und 5.	Statistisch relevant niedrige ATXN3-Proteinlevel für Zentrum 3, signifikant hohe ATXN3-Proteinlevel für Zentrum 2 und 4.

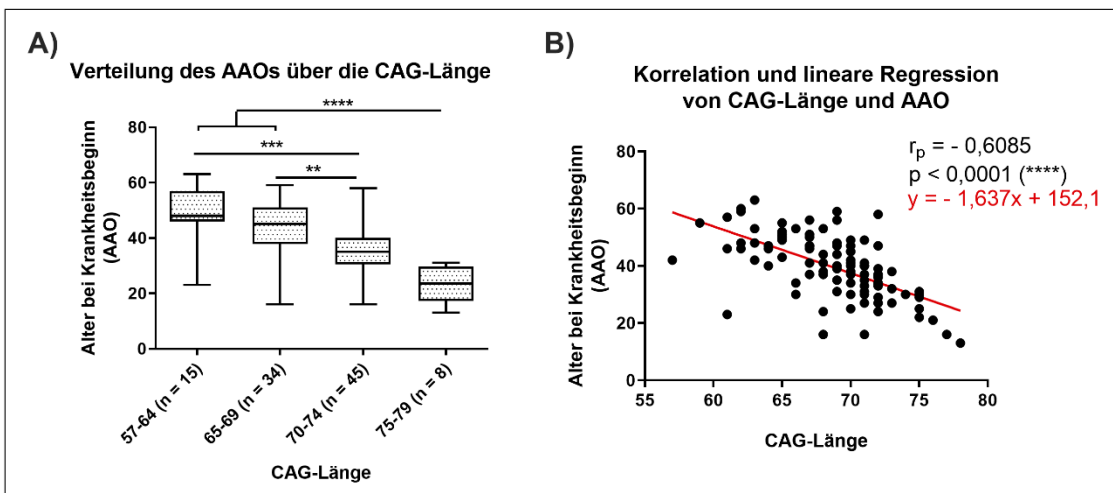
#### 4.1.2 Statistische Analyse der CAG-Länge und klinischer Parameter

Um beurteilen zu können in welchem klinischen Zustand sich die ESMI-Kohorte zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung im Rahmen der Studie befand und ob sie in ihren Eigenschaften dem bisherigen wissenschaftlichen Forschungsstand entsprach, wurde als nächstes eine Art Zustandsaufnahme der Kohorte erstellt. Dazu wurden die symptomatischen SCA3-Patienten nach der CAG-Länge des expandierten Allels in vier Gruppen eingeteilt. 15 der SCA3-Patienten wiesen ein expandiertes Allel mit 57-64 CAGs auf. 34 Probanden zählten 65-69 CAGs und 45 Probanden 70-74s CAGs. Bei einer kleineren Gruppe von acht Probanden wurden auf dem längeren Allel 75-79 CAGs ermittelt.

Analysierte man nun das überlieferte AAO getrennt für jede CAG-Gruppe, fiel auf, dass im Allgemeinen Mutationsträger mit längerem CAG-Trakt früher im

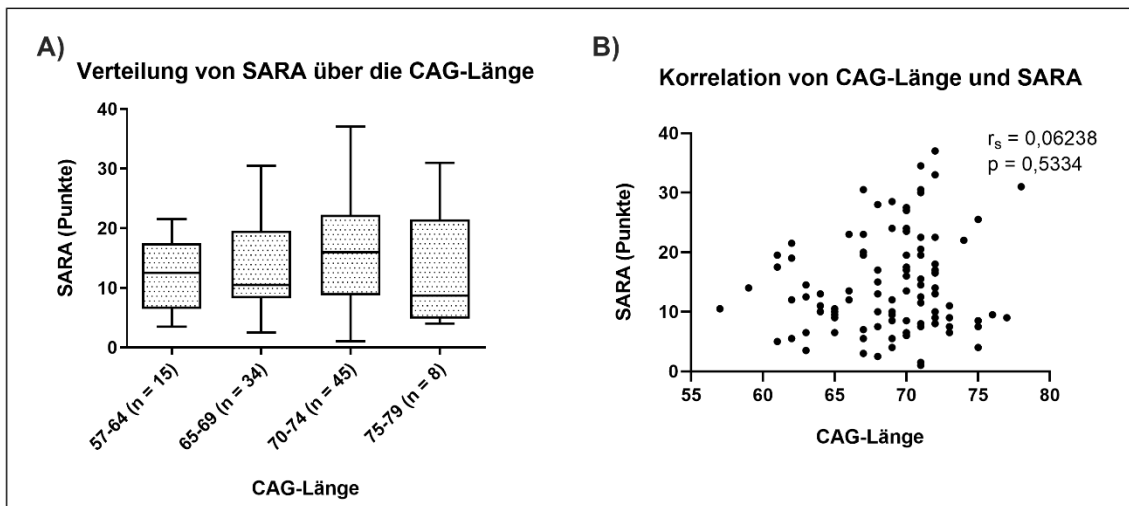


Leben erkrankten (Abbildung 20A). So ergab eine Häufigkeitsverteilung der zum Teil nicht-normalverteilten Datensätze für Mutationsträger mit 57-64 CAGs ein medianes Erkrankungsalter von 48 Lebensjahren (IQA = 11), für Mutationsträger mit 65-69 CAGs von 45 Lebensjahren (IQA = 13,25), für Mutationsträger mit 70-74 CAGs von 35 Lebensjahren (IQA = 9,5) und für Mutationsträger mit 75-79 CAGs von 23,5 Lebensjahren (IQA = 12,5). Die Unterschiede im Median des Alters bei Erkrankungsbeginn waren nach dem Kruskal-Wallis-Test auch statistisch signifikant bis höchst signifikant. Die Differenzen des AAOs von 75-79 CAGs zu 57-64 und 65-69 CAGs waren mit  $p < 0,0001$  höchst signifikant. Der Unterschied des AAOs der Mutationsträgern mit 70-74 und 75-79 CAGs erreichte beinahe das Signifikanzniveau von 5 % ( $p = 0,0538$ ). Die Gruppe der Probanden mit 70-74 CAGs unterschied sich im AAO statistisch deutlich signifikant von der Gruppe mit 65-69 CAGs ( $p = 0,0016$ ) und statistisch hoch signifikant von der Gruppe mit 57-64 CAGs ( $p = 0,0002$ ). Der einzige homozygote SCA3-Patient konnte mit 60 bzw. 66 CAGs auf den expandierten Allelen zu den beiden Gruppen mit den kürzesten CAG-Trakten gezählt werden. Im direkten Vergleich zu diesen Gruppen erkrankte er mit 30 Jahren besonders früh im Leben. Die oben genannten Ergebnisse bestätigten sich bei der Auftragung des AAOs über die CAG-Länge im Sinne einer Korrelation (Abbildung 20B). Bei Normalverteilung beider Größen ergab sich mit einem Korrelationskoeffizienten nach Pearson von  $r_p = -0,6085$  ein mittelmäßiger, inverser, jedoch höchst signifikanter Zusammenhang ( $p < 0,0001$ ) zwischen der CAG-Länge und dem Alter bei Krankheitsbeginn. Bei zusätzlicher Anpassung einer linearen Regressionsgerade ergab sich eine Gerade mit negativer Steigung, die durch die Formel  $y = -1,637x + 152,1$  charakterisiert wurde. Mit ihrer Hilfe wäre für die ESML-Kohorte bei Kenntnis der CAG-Länge eines Mutationsträgers eine Berechnung seines AAOs möglich gewesen. Diese Ergebnisse bestätigen: je länger das expandierte Allel, desto früher trat die Symptomatik der Erkrankung in der ESML-Kohorte auf.



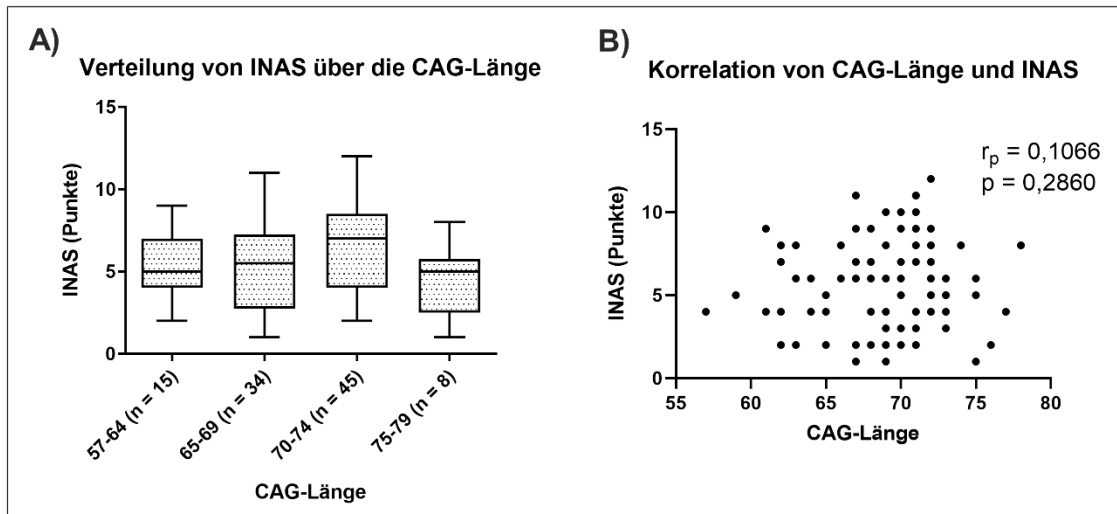
**Abbildung 20: Statistische Analyse von CAG-Länge des expandierten Allels und AAO.** A) Aufgetragen wurde das AAO für vier Gruppen der symptomatischen Mutationsträger im Box-Plot, die sich in der Zahl der CAG-Triplets des expandierten Allels unterschieden (57-64, 65-69, 70-74, 75-79 CAGs). Je höher die Zahl der CAG-Triplets, desto früher erkrankten die Patienten. Die Unterschiede des AAOs waren mit dem Kruskal-Wallis-Test zwischen fast allen Gruppen statistisch deutlich bis höchst signifikant. Der Unterschied zwischen den Gruppen von 70-74 und 75-79 CAGs erreichte knapp keine Signifikanz ( $p = 0,0538$ ). B) Die Korrelation von CAG-Länge und AAO ergab statistisch höchst signifikant einen mittelmäßigen Zusammenhang beider Größen mit einem Korrelationskoeffizient nach Pearson von  $r_p = -0,6085$ . In roter Farbe wurde zusätzlich eine lineare Regressionsgerade eingezeichnet, mit deren Formel für die ESMI-Kohorte ausgehend von der CAG-Länge das AAO eines Mutationsträgers berechnet werden konnte. CAG = Basensequenz für die Aminosäure Glutamin, AAO = Alter bei Krankheitsbeginn.

Eine weitere statistische Analyse untersuchte den Zusammenhang zwischen der CAG-Länge des expandierten Allels von SCA3-Patienten und dem SARA. Abbildung 21A zeigt die Verteilung der SARA-Punktzahl zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung im Rahmen von ESMI über die vier Gruppen mit unterschiedlicher Anzahl an CAG-Triplets. Bei Vorliegen einer Normalverteilung aller Datensätze wurde eine ANOVA durchgeführt, wobei dabei keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen feststellbar waren. Trotzdem war der Mittelwert der Gruppe mit 70-74 CAGs mit 16,3 SARA-Punkten ( $SD = \pm 8,8$ ) deutlich höher als die mittleren 12,3 SARA-Punkte ( $SD = \pm 5,6$ ) der Gruppe mit 57-64 CAGs und 12,4 SARA-Punkte ( $SD = \pm 10,1$ ) der Gruppe mit 75-79 CAGs. Die Probandengruppe mit 65-69 CAGs wies einen Mittelwert von 13,2 SARA-Punkten auf ( $SD = \pm 7,5$ ). Ein nahe bei null liegender Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman von  $r_s = 0,06238$  bewies eine fehlende Korrelation der CAG-Länge mit der aktuellen SARA-Punktzahl bei Erstuntersuchung im Rahmen von ESMI (Abbildung 21B).



**Abbildung 21: Statistische Analyse von CAG-Länge des expandierten Allels und SARA bei Erstuntersuchung im Rahmen von ESMI.** A) Für SCA3-Patienten wurde die SARA-Punktzahl in vier Gruppen unterschiedlicher CAG-Länge des expandierten Allels (57-64, 65-69, 70-74 und 75-79 CAGs) im Box-Plot aufgetragen. Die ANOVA ergab keine signifikanten statistischen Unterschiede im SARA zwischen den Gruppen. B) Eine statistische Korrelation der beiden Größen CAG-Länge und SARA ergab nach Spearman keine Zusammenhänge derer ( $r_s = 0,06238$ ,  $p = 0,5334$ ). CAG = Basensequenz für die Aminosäure Glutamin, SARA = *Scale for the Assessment and Rating of Ataxia*.

Ähnliche Analysen wurden für die CAG-Länge des expandierten Allels von SCA3-Patienten und der INAS-Punktzahl durchgeführt. Wie zuvor auch für den SARA wurde die Verteilung der INAS-Punktwerte über die vier CAG-Gruppen bei Normalverteilung der Datensätze statistisch mit der ANOVA analysiert (Abbildung 22A). Hierbei ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den vier Gruppen. Auffällig war, dass wie bereits für den SARA ermittelt, die Gruppe mit 70-74 CAGs im Mittel mit 6,5 Punkten ( $SD = \pm 2,6$ ) den höchsten INAS aufwies. Die Gruppen mit 57-65 und 65-69 CAGs zeigten beide durchschnittlich 5,3 INAS-Punkte ( $SD = \pm 2,1$ ;  $SD = \pm 2,7$ ). Die niedrigsten INAS-Punktwerte wurden bei der Gruppe mit 75-79 CAGs ermittelt, welche im Mittel 4,5 Punkte ( $SD = \pm 2,2$ ) zählten. Bei Untersuchung der Korrelation beider Größen deutete ein  $r_p = 0,1066$  nach Pearson auf nicht relevante Zusammenhänge zwischen CAG-Länge und INAS bei Erstuntersuchung im Rahmen von ESMI hin ( $p = 0,2860$ ) (Abbildung 22B).

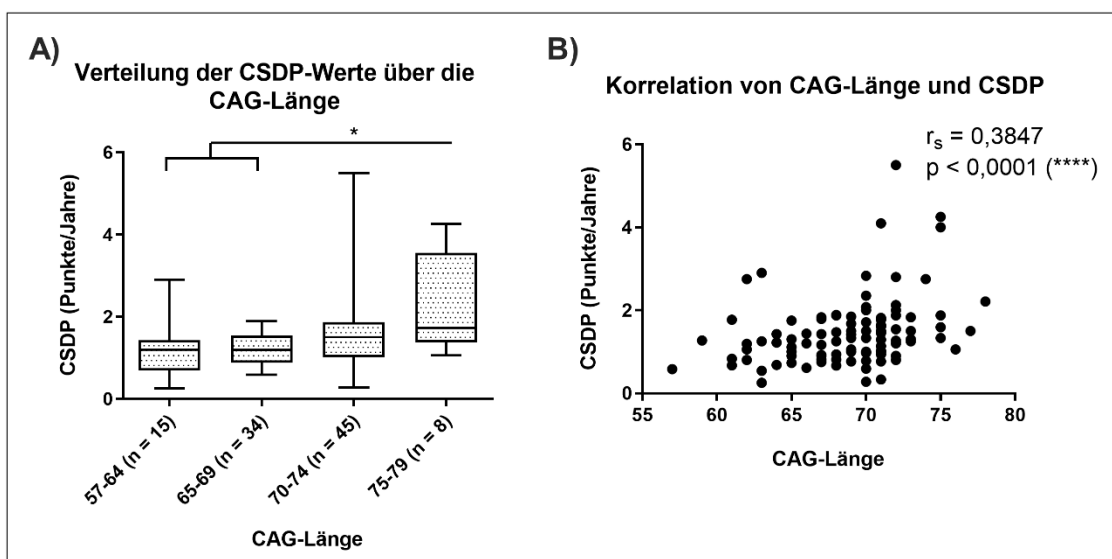


**Abbildung 22: Statistische Analyse von CAG-Länge des expandierten Allels und INAS bei Erstuntersuchung im Rahmen von ESMI.** In A) wurde der INAS-Punktwert als Box-Plot für die symptomatischen Mutationsträger eingeteilt in vier Gruppen je nach CAG-Länge des expandierten Allels gezeigt. Mittels ANOVA waren keine statistisch signifikanten Unterschiede im INAS feststellbar. Tendenziell war für die Gruppe mit 70-74 CAGs der höchste INAS ermittelt worden (Mittelwert: 6,5 Punkte; SD = ± 2,6). B) Es war keine Korrelation zwischen CAG-Länge und INAS nachzuweisen ( $r_p = 0,1066$ ). CAG = Basensequenz für die Aminosäure Glutamin, INAS = *Inventory of Non-Ataxia Symptoms*.

Die Ergebnisse der statistischen Analysen von CAG-Länge mit SARA und INAS waren jeweils vom Status der Erkrankung eines jeden Probanden abhängig. Insgesamt deuten die Untersuchungsergebnisse darauf hin, dass Probanden mit 70-74 CAG-Triplets auf dem expandierten Allel sich zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung im Rahmen von ESMI in einem fortgeschrittenem Krankheitszustand befanden als die anderen CAG-Gruppen.

Um nicht den aktuellen Zustand der ESMI-Kohorte abzubilden, sondern die bisherige Krankheitsprogression ins Zentrum der statistischen Analysen zu rücken, wurde als Nächstes der statistische Zusammenhang zwischen der CAG-Länge und dem CSDP mittels Kruskal-Wallis-Test untersucht (Abbildung 23A). Der CSDP informiert über die Zunahme der ataktischen Symptomatik (SARA-Punktzahl pro Jahr) und damit die Geschwindigkeit der Krankheitsprogression. Hierbei fiel besonders der statistisch signifikant größere CSDP der Gruppe mit 75-79 CAGs gegenüber der Gruppe mit 57-64 CAGs ( $p = 0,0433$ ) und mit 65-68 CAGs ( $p = 0,0452$ ) auf. Dieser suggerierte, dass Mutationsträger mit größerer CAG-Expansion nach dem Symptombeginn einen deutlich rapideren und schweren Krankheitsverlauf durchlebten als Mutationsträger mit kürzerer CAG-Expansion. Die mediane Krankheitsprogression der Gruppe mit 75-79 CAGs

betrug 1,7 SARA-Punkte pro Erkrankungsjahr (IQA = 2,2). Der verhältnismäßig große Interquartilsabstand legt bereits nahe, dass die CSDP-Werte in dieser Gruppe sehr streuten. Zwei Individuen dieser Gruppe hatten sich klinisch im Durchschnitt sehr schnell, nämlich um 4,25 SARA-Punkte pro Erkrankungsjahr, verschlechtert. Die Gruppe der Mutationsträger mit 70-74 CAGs präsentierte sich sehr heterogen. Während sich ein Proband motorisch nur um 0,3 SARA-Punkte pro Erkrankungsjahr verschlechtert hatte, zeigte ein anderer Proband eine sehr auffällige Progression der ataktischen Symptome von 5,5 SARA-Punkten pro Erkrankungsjahr (Median: 1,5 SARA-Punkte/Jahr; IQA = 0,85). In der Korrelationsanalyse war nach Spearman eine leichte Korrelation von  $r_s = 0,3847$  zwischen CAG-Länge und CSDP zu verzeichnen (Abbildung 23B). Die statistisch höchste Signifikanz dieser Korrelation belegte, dass ein Auftreten dieses Ergebnisses nur zu  $< 0,01$  % per Zufall entstanden war.



**Abbildung 23: Statistische Analyse von CAG-Länge des expandierten Allels und CSDP bei Erstuntersuchung im Rahmen von ESMI.** A) Die jährliche Krankheitsprogression als CSDP wurde über vier Gruppen an symptomatischen Mutationsträgern, die sich in der CAG-Länge des expandierten Allels unterschieden, als Box-Plot dargestellt. Die CSDP-Werte der Gruppe mit 75-79 CAGs waren nach Kruskal-Wallis-Test signifikant höher als die der Gruppen mit 57-64 und 65-69 CAGs ( $p = 0,0433$ ;  $p = 0,0452$ ). Im Allgemeinen galt: je größer die Zahl der CAGs auf dem expandierten Allel, desto schwerer die Krankheitsprogression. B) CAG-Länge und CSDP korrelierten nach Spearman leicht miteinander ( $r_s = 0,3847$ ). Dieser Zusammenhang war statistisch höchst signifikant ( $p < 0,0001$ ). CAG = Basensequenz für die Aminosäure Glutamin, CSDP = *Cross-sectional annual disease progression*.

Tabelle 35 fasst die Ergebnisse zur statistischen Analyse der CAG-Länge und der klinischen Parameter zusammen.

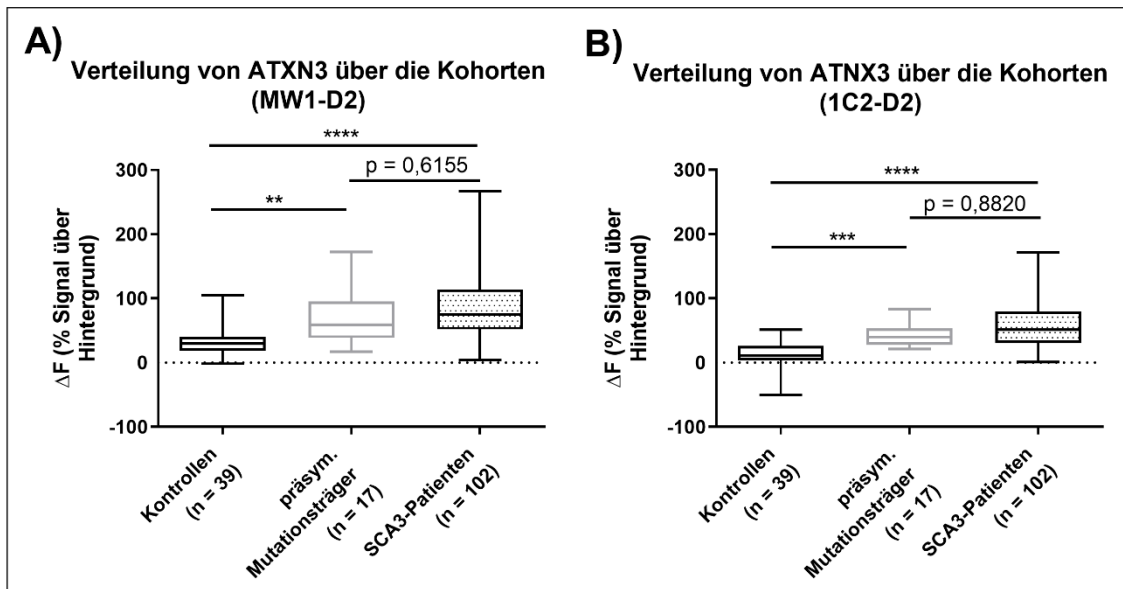
**Tabelle 35: Zusammenfassung des Einflusses der CAG-Länge auf klinische Parameter.** AAO = *Age at onset*, SARA = *Scale of the Assessment of Rating of Ataxia*, INAS = *Inventory of Non-Ataxia Symptoms*, CSDP = *Cross-sectional annual disease progression*.

Parameter	CAG-Länge
<b>AAO</b>	Statistisch höchst signifikante, inverse Korrelation von CAG-Länge und AAO ( $r_p = -0,6085$ , $p < 0,0001$ ). Je größer die CAG-Länge des expandierten Allels, desto früher im Leben erkrankten die SCA3-Mutationsträger.
<b>SARA</b>	Keine Korrelation von SARA-Punktzahl bei Erstuntersuchung im Rahmen von ESMI und CAG-Länge ( $r_s = 0,06238$ ). Höchste mittlere SARA-Punktzahl für Probanden mit CAG-Länge zwischen 70-74 CAGs auf dem expandierten Allel.
<b>INAS</b>	Keine Korrelation von INAS-Punktzahl bei Erstuntersuchung im Rahmen von ESMI und CAG-Länge ( $r_p = 0,1066$ ). Höchste mittlere INAS-Punktzahl für Probanden mit CAG-Länge zwischen 70-74 CAGs auf dem expandierten Allel.
<b>CSDP</b>	Statistisch höchst signifikante Korrelation von CSDP und CAG-Länge ( $r_s = 0,3847$ , $p < 0,0001$ ). Je größer die Zahl der CAG-Triplets, desto ausgeprägter die Krankheitsprogression. Probanden mit 75-79 CAGs im CAG-Trakt mit statistisch signifikant höheren CSDP-Werten als Probanden mit 57-69 CAGs.

#### 4.1.3 Statistische Analyse der ATXN3-Proteinlevel und genetischer und klinischer Parameter

Im Folgenden wurden die ermittelten ATXN3-Proteinlevel in Bezug zu den klinischen Parametern AAO, SARA, INAS und CSDP gesetzt. Dazu wurde in einem ersten Schritt das Potenzial der gemessenen ATXN3-Proteinlevel untersucht, zwischen genetisch gesunden Kontrollprobanden, klinisch präsymptomatischen Mutationsträgern und symptomatischen SCA3-Patienten unterscheiden zu können. Sowohl der Antikörper-Assay mit MW1-D2 als auch derjenige mit 1C2-D2 vermochten nach Kruskal-Wallis-Test zwischen gesunden Kontrollen und Mutationsträgern zu differenzieren, wohingegen die Unterscheidung zwischen präsymptomatischen und symptomatischen SCA3-Mutationsträgern nicht gelang. Im MW1-D2 Assay war der Unterschied der ATXN3-Proteinlevel zwischen den Kontrollen (Median: 29,5; IQA = 21,1) und präsymptomatischen Mutationsträgern (Median: 59,1; IQA = 57,0) statistisch deutlich signifikant ( $p = 0,0057$ ), der Unterschied der Kontrollen zu den SCA3-Patienten (Median: 75,2; IQA = 61,8) höchst signifikant ( $p < 0,0001$ ) (Abbildung 24A). Bei der Auswertung des 1C2-D2 Assays war die Differenz der Messwerte zwischen Kontrollen (Median: 11,3; IQA = 22,5) und präsymptomatischen Mutationsträgern (Median: 39,9; IQA =

32,0) bereits statistisch hoch signifikant ( $p = 0,0004$ ), von Kontrollen zu den SCA3-Patienten (Median: 51,0, IQA = 49,1) schließlich höchst signifikant ( $p < 0,0001$ ) (Abbildung 24B). Der Unterschied der ATXN3-Proteinlevel zwischen den klinisch unterschiedlichen Mutationsträgern erreichte keine Signifikanz (MW1-D2:  $p = 0,6155$ ; 1C2-D2:  $p = 0,8820$ ).



**Abbildung 24: Statistische Analyse der Verteilung der ATXN3-Proteinlevel über die Kontrollen und Mutationsträger.** Mittels MW1-D2 (A) und 1C2-D2 (B) Assay ließ sich statistisch deutlich bis höchst signifikant zwischen den Kontrollen und den Mutationsträgern unterscheiden. Mit beiden Antikörper-Assays war allein anhand der ATXN3-Proteinlevel keine Unterscheidung zwischen präsymptomatischen und symptomatischen Mutationsträgern möglich.

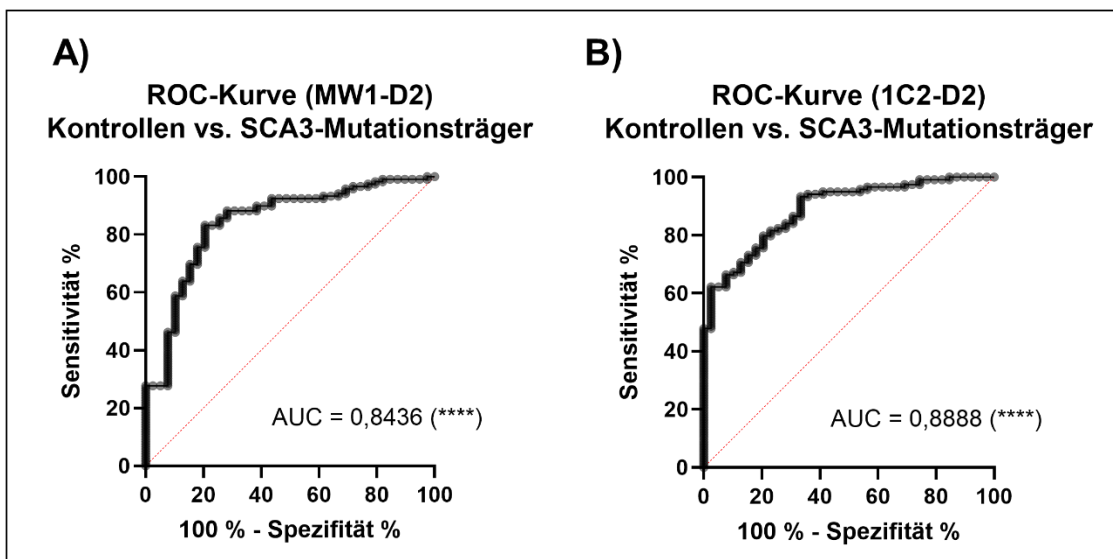
Daran anschließend wurde eine ROC-Kurve (*Receiver Operating Characteristic*) für beide Assays erstellt, mittels derer ermittelt wurde, wie gut sich das ATXN3-Proteinlevel als Klassifikator für den Mutationsstatus im ATXN3-Gen eignete. Beide Assays wiesen eine Entscheidungskraft auf, die über der bloßen Ratewahrscheinlichkeit lag (rote Diagonale). Der AUC-Wert (*Area under the curve*) konnte die Qualität des ATXN3-Proteinlevels als Klassifikator überprüfen und als Wahrscheinlichkeit interpretiert werden, dass ein SCA3-Mutationsträger am gemessenen ATXN3-Proteinlevel bei Erstuntersuchung in ESMI unabhängig von seinem Symptomstatus auch als solcher erkannt wurde. Dieser Wert lag für den MW1-D2 Assay bei 0,8436 und für den 1C2-Assay bei 0,8888 und war jeweils höchst signifikant ( $p < 0,0001$ ) (Abbildung 25A, B; Tabelle 36). Dies bedeutete, dass durch den jeweiligen Assay ein Mutationsträger in 84,36 % der

Fälle bzw. in 88,88 % der Fälle alleine am ATXN3-Proteinlevel als solcher identifiziert wurde.

**Tabelle 36: Ermittelte Parameter zur ROC-Kurve des MW1-D2 und 1C2-D2 Assays. AUC = Area under the curve.**

Parameter	MW1-D2 Assay	1C2-D2 Assay
<b>AUC-Wert</b>	0,8436 (Standardfehler ± 0,03702)	0,8888 (Standardfehler ± 0,02706)
<b>95% Konfidenzintervall</b>	0,7710 – 0,9161	0,8358 – 0,9419
<b>Signifikanzniveau</b>	< 0,0001 (****)	< 0,0001 (****)

Damit schien der 1C2-D2 Assay besser geeignet, um mittels ATXN3-Proteinlevel zwischen Kontrollen und SCA3-Mutationsträgern zu unterscheiden. Bestätigt wurde dies durch die hoch bis höchst signifikanten Ergebnisse für diesen Assay aus dem Kruskal-Wallis-Test (Abbildung 24B).

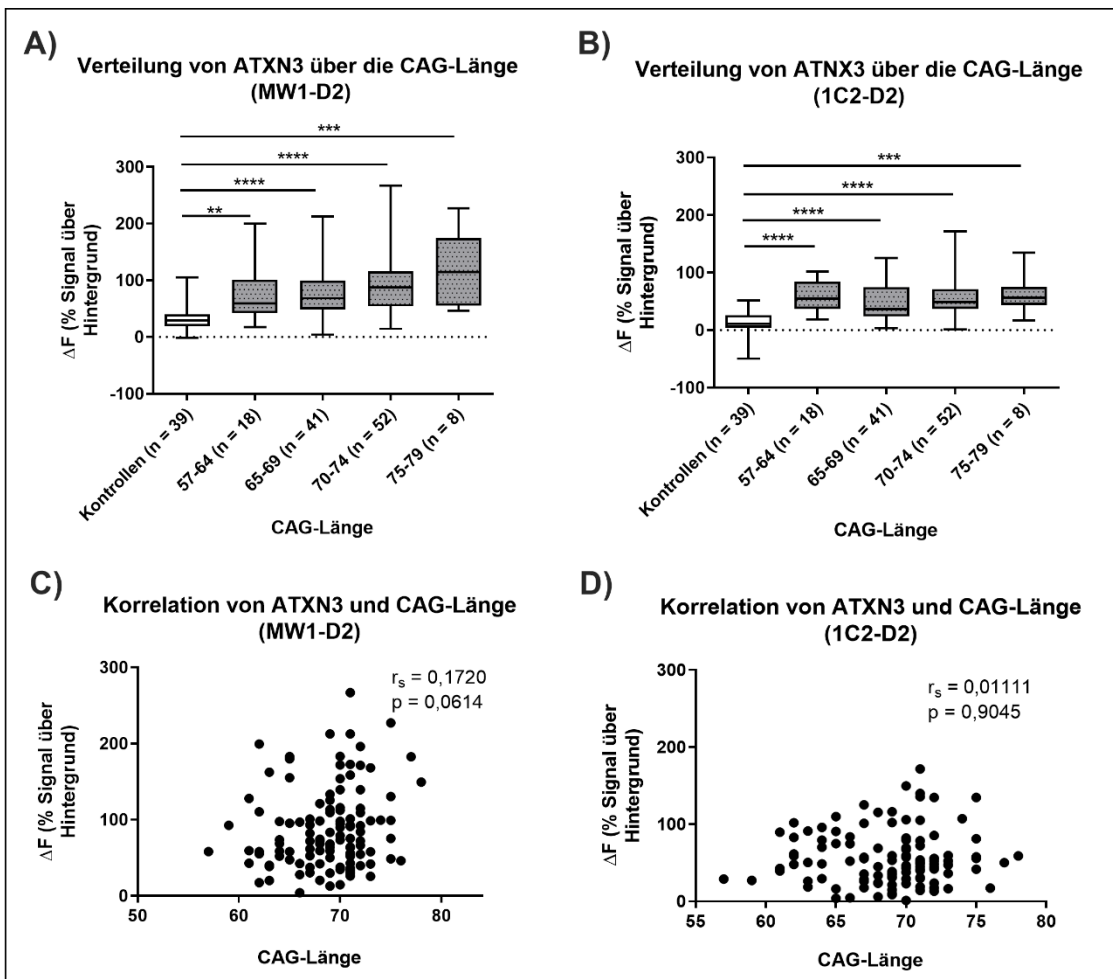


**Abbildung 25: ROC-Kurve für den MW1-D2 und 1C2-D2 Assay mit Gegenüberstellung von Kontrollen und SCA3-Mutationsträgern unabhängig vom Symptomstatus.** Beide Assays ermitteln SCA3-Mutationsträger anhand vom ATXN3-Proteinlevel besser als mit bloßer Ratewahrscheinlichkeit. Mit einem AUC-Wert von 0,8888 konnte der 1C2-Assay (B) besser zwischen Kontrollen und Mutationsträgern differenzieren als der MW1-D2 Assay mit einem AUC-Wert von 0,8436. Beide Ergebnisse waren jedoch statistisch höchst signifikant ( $p < 0,0001$ ). ROC = Receiver Operating Characteristic.

Schlüsselte man die Mutationsträger, dieses Mal sowohl diejenigen mit und ohne Symptome, in vier Gruppen nach Anzahl der CAG-Triplets des expandierten Allels auf und korrelierte sie mit den ATXN3-Proteinleveln, so erhielt man im Wesentlichen die gleichen Ergebnisse wie zuvor (Abbildung 26). Beide Antikör-

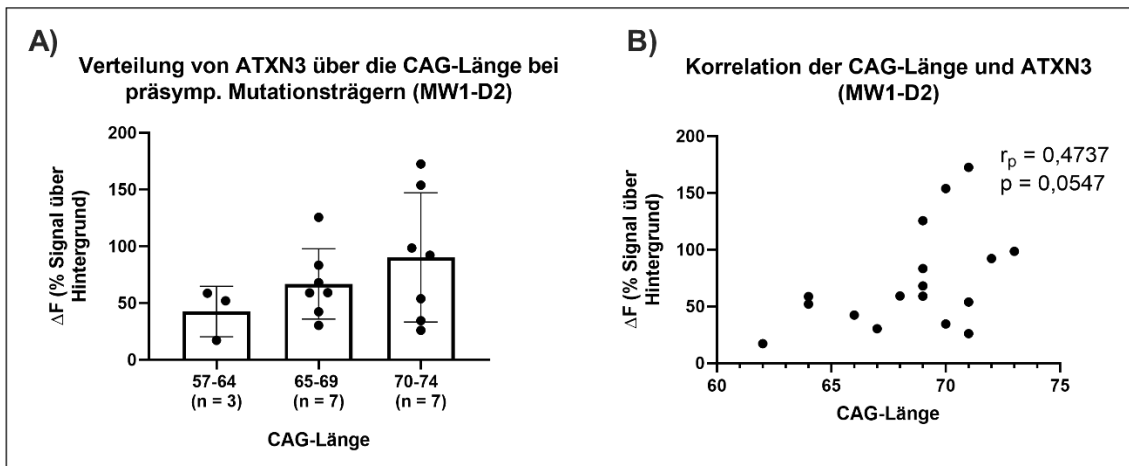


per-Assays ermöglichten abermals eine Differenzierung zwischen Kontrollproben und SCA3-Mutationsträgern anhand der ATXN3-Proteinlevel. Auch diese statistischen Analysen wurden aufgrund fehlender Normalverteilung einiger Datensätze mit dem Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Es ergaben sich im MW1-D2 Assay deutlich bis höchst signifikante Unterschiede im ATXN3-Proteinlevel für Kontrollen und Mutationsträger (Abbildung 26A), für den 1C2-D2 Assay sogar hoch bis höchst signifikante Differenzen (Abbildung 26B). Zwischen den einzelnen Gruppen der Mutationsträger waren hingegen in beiden Assays keine statistisch relevanten Unterschiede auszumachen. Die Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman bewegten sich für beide Antikörper in einer Größenordnung, bei der von einer fehlenden Korrelation von der CAG-Länge der Mutationsträger und dem ermittelten ATXN3-Proteinlevel ausgegangen werden musste (MW1-D2:  $r_s = 0,1720$ ; 1C2-D2:  $r_s = 0,01111$ ) (Abbildung 26C, D).



**Abbildung 26: Statistische Analyse der CAG-Länge von Kontrollen und Mutationsträgern und der ATXN3-Proteinlevel.** A), B) Die ATXN3-Proteinlevel von Kontrollen und der in vier Gruppen eingeteilten Mutationsträgern unterschieden sich sowohl mit dem MW1-D2 als auch mit dem 1C2-D2 Assay gemessen statistisch deutlich bis höchst signifikant voneinander. Diese Ergebnisse wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test ermittelt. Innerhalb der Mutationsträger mit unterschiedlicher Länge des expandierten Allels, gab es keine signifikanten Unterschiede im ATXN3-Proteinlevel. C), D) Für beide Antikörper-Assays war nach Spearman keine Korrelation zwischen der CAG-Länge des expandierten Allels von Mutationsträgern und dem ATXN3-Proteinlevel feststellbar. CAG = Basensequenz für die Aminosäure Glutamin.

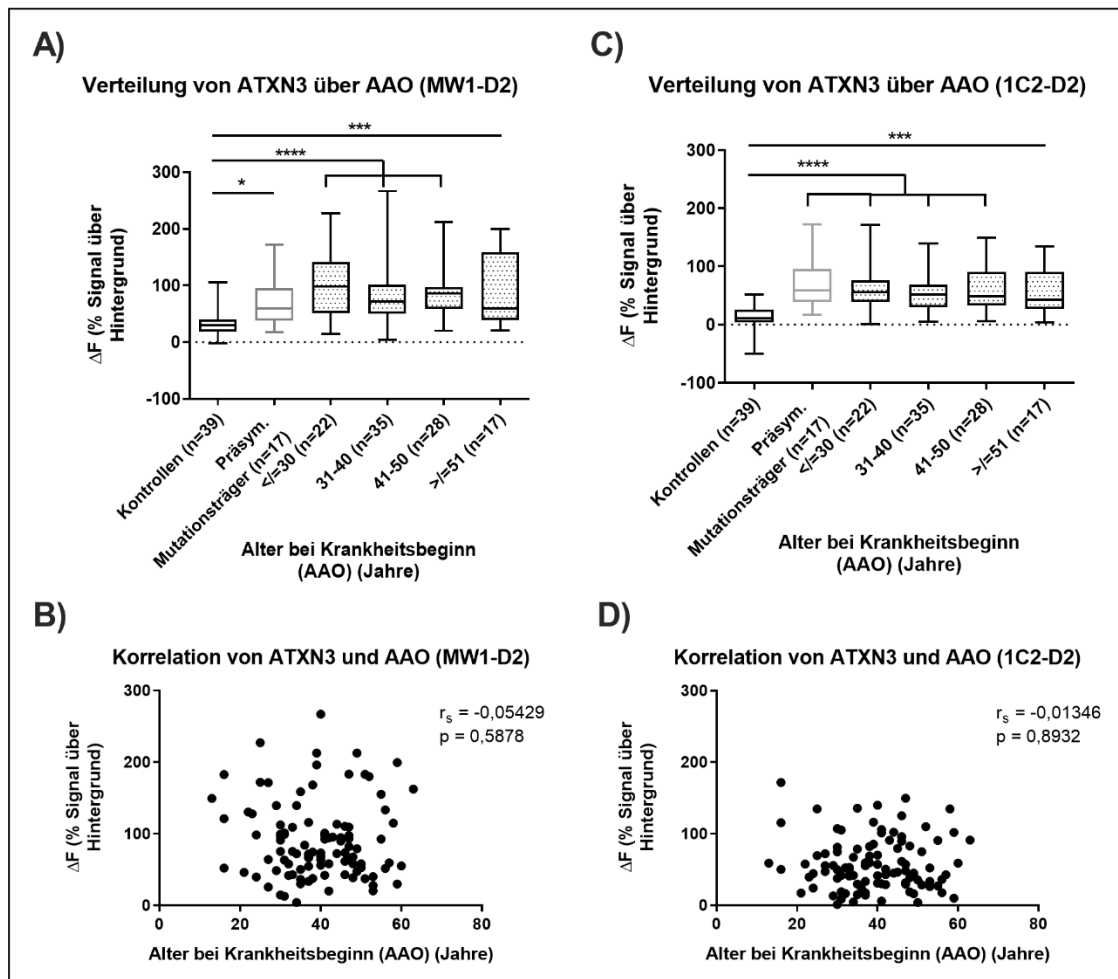
In Abbildung 27A wird zusätzlich ersichtlich, dass präsymptomatische Mutationsträger mit größerer CAG-Länge ein tendenziell höheres ATXN3-Proteinlevel aufwiesen. Diese Beobachtung war allerdings mit der ANOVA bei Normalverteilung der Datensätze nicht statistisch signifikant ( $p = 0,2887$ ). Bei der Korrelation nach Pearson der CAG-Länge des expandierten Allels mit dem ATXN3-Proteinlevel ergab sich eine mittelmäßige Korrelation ( $r_p = 0,4737$ ), die knapp keine Signifikanz erreichte ( $p = 0,0547$ ) (Abbildung 27B).



**Abbildung 27: Statistische Analyse der CAG-Länge präsymptomatischer Mutationsträger und der ATXN3-Proteinlevel.** A) Bei Normalverteilung der Datensätze nach Shapiro-Wilk-Test ergab sich mit der ANOVA keine statistisch signifikante Verteilung der ATXN3-Proteinlevel über die drei Gruppen der präsymptomatischen Mutationsträger mit genetisch unterschiedlicher CAG-Länge (57-64, 65-69, 70-74 CAGs). Tendenziell ging aber eine größere Anzahl an CAGs mit höheren ATXN3-Proteinleveln im Blut einher. B) Die Korrelationsanalyse beider Größen ergab eine mittelmäßige Korrelation ( $r_p = 0,4737$ ) von CAG-Länge und ATXN3-Proteinlevel. Diese war nur knapp nicht statistisch signifikant ( $p = 0,0547$ ). CAG = Basensequenz für die Aminosäure Glutamin.

Zu den statistischen Analysen zählte es weiterhin, den Zusammenhang zwischen dem AAO und dem ATXN3-Proteinlevel zu untersuchen. Dazu wurden die gruppierten ATXN3-Proteinlevel von Kontrollprobanden, präsymptomatischen Mutationsträgern und von vier Gruppen symptomatischer SCA3-Patienten verglichen. Letztere wurden nach dem AAO entsprechend in die Gruppen  $\leq 30$  Jahre, 31-40 Jahre, 41-50 Jahre und  $\geq 50$  Jahre eingeteilt. Aufgrund fehlender Normalverteilung einiger Datensätze wurden die Analysen mit dem Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Dabei ergaben sich auch für das AAO bei der Messung mit beiden Antikörper-Assays MW1-D2 und 1C2-D2 signifikant bis höchst signifikante Unterschiede zwischen den ATXN3-Proteinleveln von Kontrollen und allen Mutationsträgern (Abbildung 28A, C). Erneut ließen sich keine signifikanten Differenzen zwischen den einzelnen Gruppen der Mutationsträger abbilden. Auffällig war dennoch, dass SCA3-Patienten mit einem AAO  $\leq 30$  Jahren mit medianen ATXN3-Proteinleveln von 98,8 (IQA = 90,7; MW1-D2) und 55,5 (IQA = 37,4; 1C2-D2) tendenziell höhere ATXN3-Proteinlevel im peripheren Blut aufwiesen als SCA3-Patienten, die erst mit  $\geq 50$  Lebensjahren Symptome entwickelten. Ihre medianen ATXN3-Proteinlevel lagen im MW1-D2 Assay bei 59,5 (IQA = 120,0) und im 1C2-D2 Assay bei 42,7 (IQA = 64,23). Für

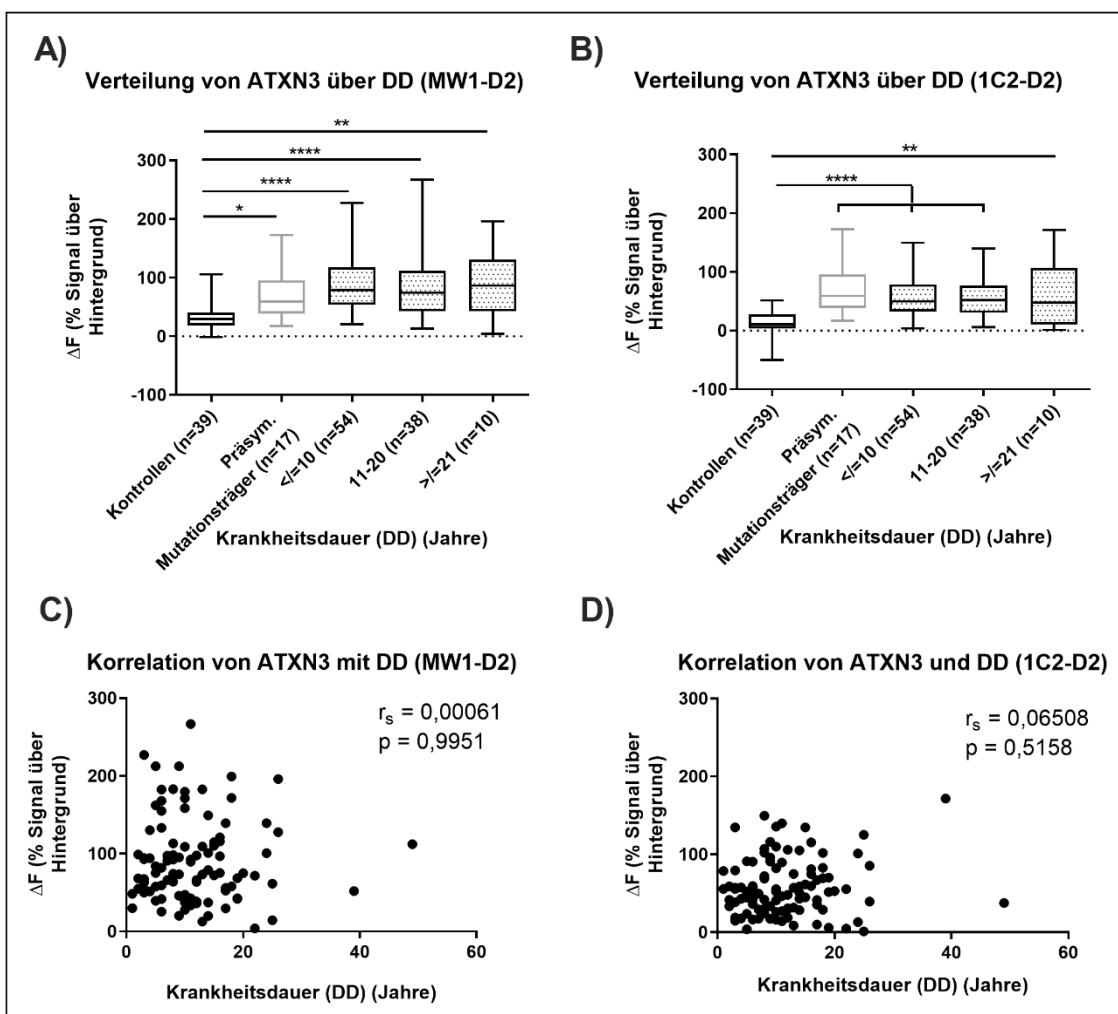
den Zusammenhang von AAO und ATXN3-Proteinlevel wurde in beiden Antikörper-Assays ein Rangkorrelationskoeffizienten nahe null ermittelt ( $r_s = -0,05429$ ;  $r_s = -0,01346$ ), der eine signifikante Korrelation beider Größen ausschloss (Abbildung 28B, D).



**Abbildung 28: Statistische Analyse des AAOs von SCA3-Mutationsträgern und der ATXN3-Proteinlevel.** A), C) Die ATXN3-Proteinlevel sind für vier Gruppen von symptomatischen SCA3-Patienten je nach AAO ( $\leq 30$ , 31-40, 41-40,  $\geq 50$  Jahre), für die Kontrollen und präsymptomatischen Mutationsträger gruppiert mit dem Kruskal-Wallis-Test analysiert und als Box-Plot dargestellt worden. Im MW1-D2 und 1C2-D2 Assay bestanden lediglich statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Kontrollen und allen Mutationsträgern unabhängig vom Symptomstatus. Tendenziell wies die Gruppe mit dem AAO  $\leq 30$  Jahren ein höheres ATXN3-Proteinlevel auf, als Probanden mit späterem AAO, insbesondere mit AAO  $\geq 50$  Jahren. B), D) Eine Korrelation von AAO und ATXN3-Proteinlevel wurde durch Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman nahe null ausgeschlossen. AAO = Age at onset.

Betrachtete man die ATXN3-Proteinlevel von symptomatischen SCA3-Patienten in Abhängigkeit von der Krankheitsdauer (DD, *disease duration*), so ließen sich mittels Kruskal-Wallis-Test keine statistisch signifikanten Unterschiede im ATXN3-Proteinlevel feststellen (Abbildung 29A, B). Nach Analysen mittels

MW1-D2 und 1C2-D2 Assay war es für das ATXN3-Proteinlevel also nicht relevant, ob die SCA3-Patienten bereits vor  $\leq 10$  Jahre, 11-20 Jahre oder  $\geq 21$  Jahre Symptome entwickelt hatten. Dabei ließen sich anhand der Mediane aller Gruppen auch keine Tendenzen ableiten. Wie in vorherigen Analysen waren die ATXN3-Proteinlevel der Kontrollprobanden in beiden Antikörper-Assays signifikant bis höchst signifikant niedriger als die der verschiedenen Gruppen von SCA3-Mutationsträgern. Passend zu den obigen Ergebnissen war nach Spearman keine Korrelation zwischen DD und ATXN3-Proteinlevel auszumachen ( $r_s = 0,00061$ ;  $p = 0,9951$ ) (Abbildung 29C, D).

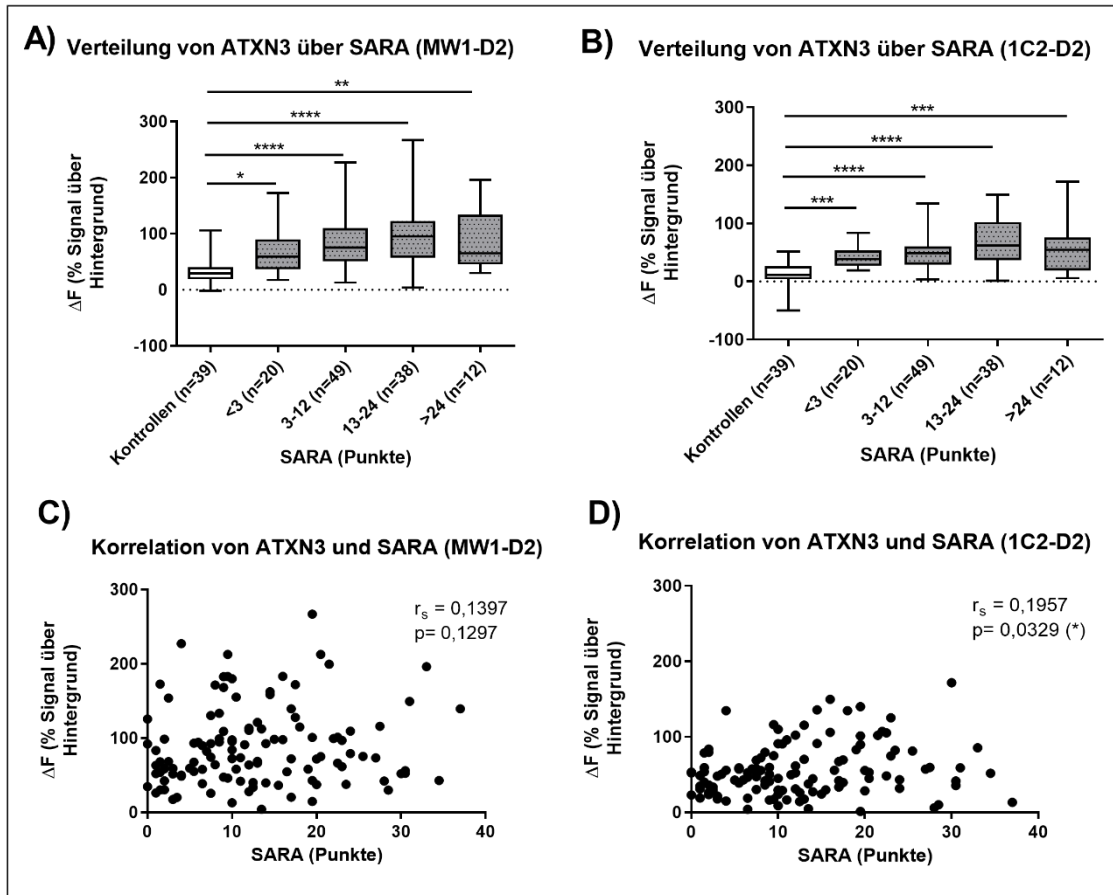


**Abbildung 29: Statistische Analyse der DD von SCA3-Mutationsträgern und der ATXN3-Proteinlevel.** A), B) Mit dem Kruskal-Wallis-Test konnten weder statistisch signifikante Unterschiede noch Tendenzen im ATXN3-Proteinlevel zwischen den drei nach DD eingeteilten Gruppen von SCA3-Patienten ausgemacht werden. Lediglich die Unterscheidung zwischen Kontrollen und SCA3-Mutationsträgern gelang statistisch signifikant. C), D) Zwischen DD und ATXN3-Proteinlevel bestand nach Spearman keine Korrelation. DD = *Disease duration*.

Um die Tauglichkeit der ATXN3-Proteinlevel in PBMC-Proben als möglichen zukünftigen Biomarker für die Erkrankung SCA3 zu prüfen, ist es unabdingbar diese mit den bis jetzt in der Praxis eingesetzten rein klinischen Bewertungssystemen SARA und INAS zu vergleichen bzw. zu korrelieren.

Dazu wurden in Bezug auf SARA die Mutationsträger nach der errechneten SARA-Punktzahl einem mit dem Zentrum für Neurologie am Universitätsklinikum Tübingen definierten ataktischen Betroffenheitsgrad (vgl. 1.1.3) zugeordnet und damit in die folgenden vier Gruppen eingeteilt: nicht betroffen (< 3 Punkte), leicht betroffen (3-12 Punkte), moderat betroffen (13-24 Punkte), schwer betroffen (> 24 Punkte). Bei Vorliegen von Nicht-Normalverteilungen erfolgte die statistische Analyse mit dem Kruskal-Wallis-Test. Zunächst fiel in der statistischen Analyse beider Antikörper-Assays auf, dass die ATXN3-Proteinlevel aller vier Gruppen statistisch signifikant bis höchst signifikant höher waren, als die der Kontrollprobanden (Abbildung 30A, B). Zwischen den einzelnen Gruppen der SCA3-Patienten ergaben sich zwar keine signifikanten Unterschiede im ATXN3-Proteinlevel, dennoch ließen sich sowohl im MW1-D2 als auch im 1C2-D2 Assay zwischen der Gruppe mit < 3 Punkten, 3-12 Punkten und 13-24 Punkten Tendenzen steigender ATXN3-Proteinlevel ausmachen. Besonders auffällig war, dass die ATXN3-Proteinlevel für die schwerstbetroffene Gruppe mit > 24 SARA-Punkten im Median wieder abfielen. Weiterführend wurde deshalb eben jene am schwersten betroffene Gruppe aus den statistischen Analysen ausgeschlossen (Abbildung 31A, B), um mögliche statistisch relevante Zusammenhänge zwischen den Gruppen mit < 3 Punkten, 3-12 Punkten und 13-24 Punkten aufzudecken. Hierbei ergab sich vor allem die Tendenz von steigenden ATXN3-Proteinleveln von < 3 bis 24 Punkten, jedoch keine statistisch relevanten Ergebnisse. Der Unterschied im ATXN3-Proteinlevel zwischen den Gruppen mit < 3 und 13-24 Punkten war in einer Analyse innerhalb der Mutationsträger mit einem Signifikanzniveau von  $p = 0,0665$  beinahe statistisch signifikant (gestrichelte, graue Linie) und unterstrich damit den Trend der steigenden ATXN3-Proteinlevel im Rahmen von < 3 bis 24 SARA-Punkten. In der anschließenden Korrelationsanalyse nach Spearman des MW1-D2 Assays war die Korrelation von SARA und ATXN3-Proteinlevel unter Einbezug

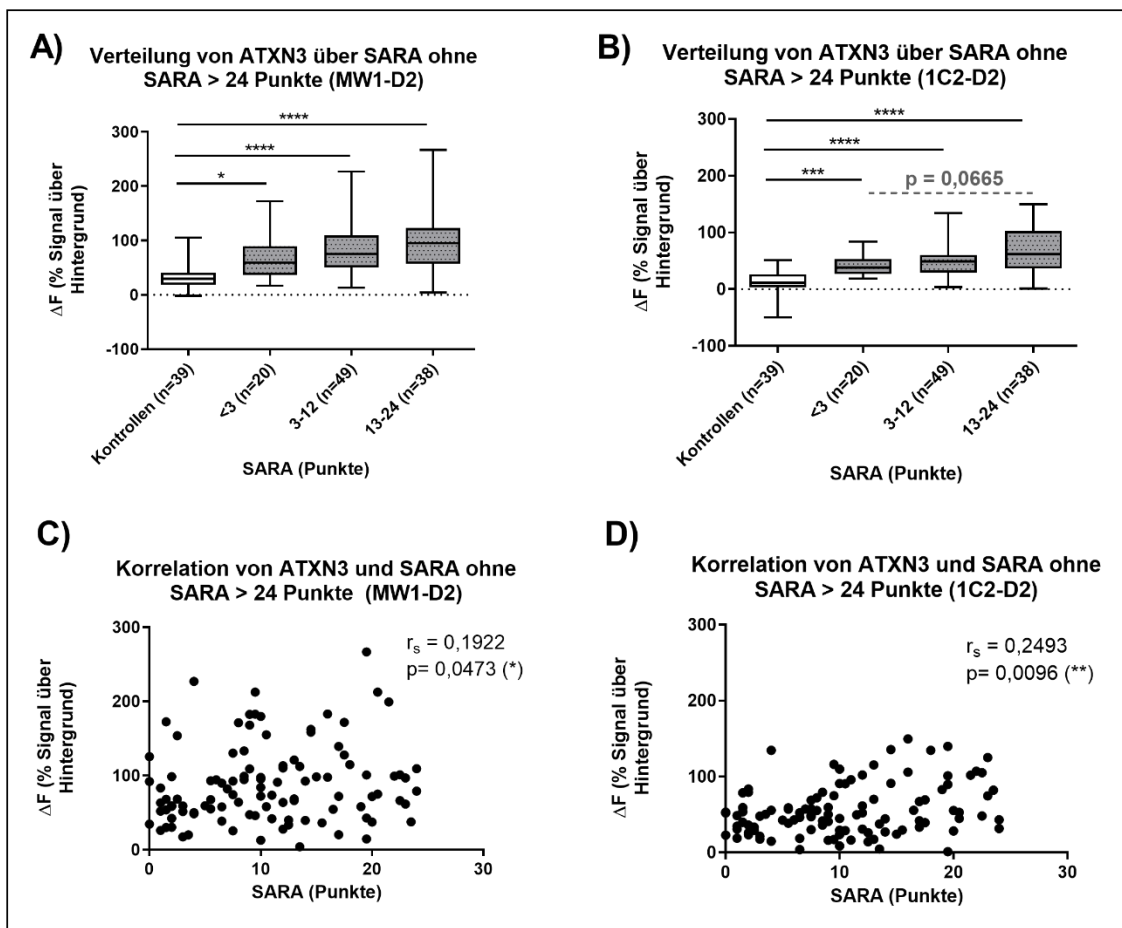
aller vier Gruppen an SCA3-Mutationsträgern bei einem Rangkorrelationskoeffizienten von  $r_s = 0,1397$  nicht statistisch signifikant ( $p = 0,1297$ ) (Abbildung 30C).



**Abbildung 30: Statistische Analyse des SARA und der ATXN3-Proteinlevel.** A), B) Für die Analysen wurden die Mutationsträger nach ermittelter SARA-Punktzahl in 4 Gruppen je nach Betroffenheitsgrad eingeteilt (nicht betroffen (< 3 Punkte), leicht betroffen (3-12 Punkte), moderat betroffen (13-24 Punkte), schwer betroffen (> 24 Punkte)). Der Kruskal-Wallis-Test erbrachte für beide Antikörper-Assays einen statistisch signifikant bis höchst signifikanten Unterschied im ATXN3-Proteinlevel zwischen den Kontrollprobanden und allen Gruppen an Mutationsträgern. Zwischen < 3 und 13-24 SARA-Punkten zeigten sich Tendenzen für steigende ATXN3-Proteinlevel, die aber nicht statistisch signifikant waren. Bei Nutzung beider Antikörper fiel der Median des ATXN3-Proteinlevels in der Gruppe mit > 24 Punkten wieder ab. C), D) Die Korrelation nach Spearman ergab für den MW1-D2 keine, für den 1C2-D2 Assay eine leichte Korrelation von SARA und ATXN3-Proteinlevel. SARA = *Scale for the Assessment and Rating of Ataxia*.

Erst der Ausschluss der Gruppe an SCA3-Mutationsträgern mit > 24 Punkten erbrachte eine statistisch signifikante Korrelation von SARA und ATXN3-Proteinlevel ( $r_s = 0,2493$ ,  $p = 0,0473$ ), sodass mit dem MW1-D2 Assay die beiden Parameter vor allem für mild bis moderat betroffene Mutationsträger zu korrelieren schienen (Abbildung 31C). Wurde diese Korrelationsanalyse nach Spearman anschließend für den 1C2-D2 Assay durchgeführt, so ergab sich un-

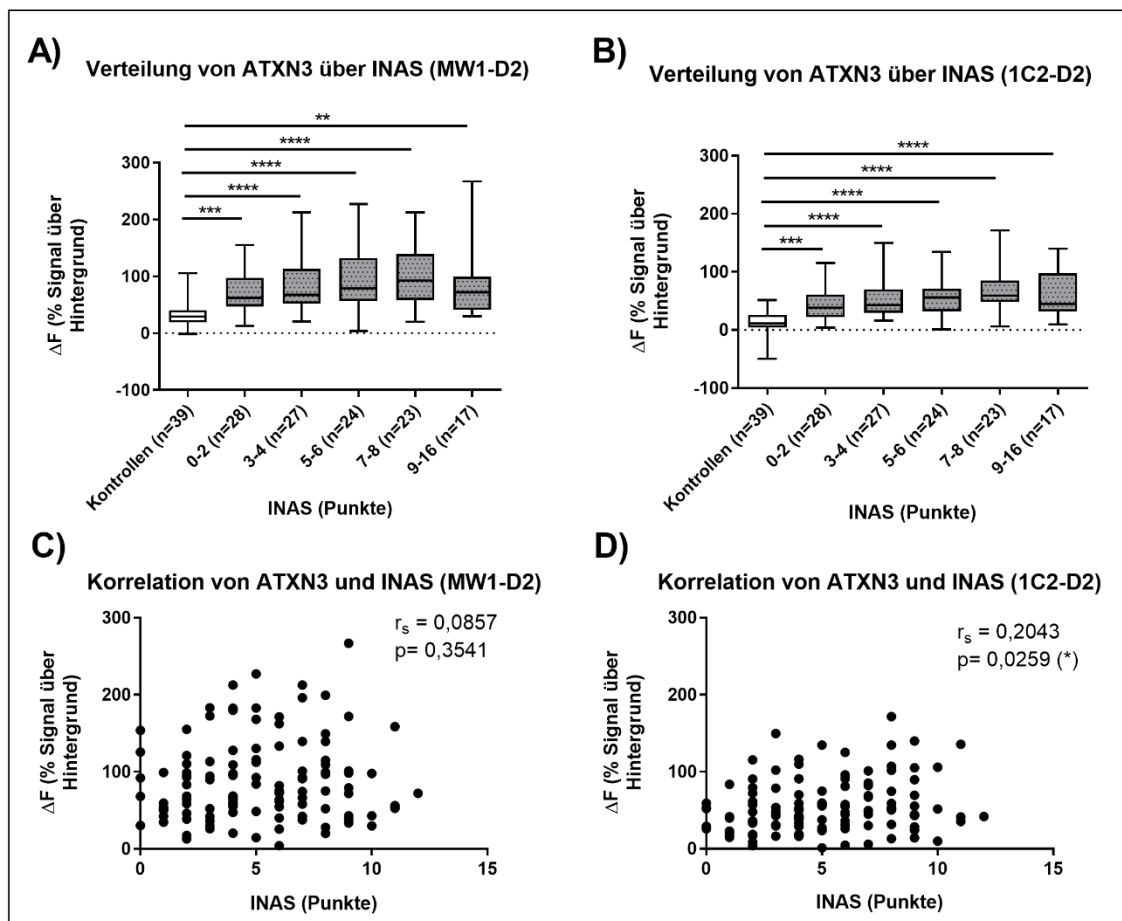
ter Einbeziehung der Gruppe mit > 24 SARA-Punkten ein Rangkorrelationskoeffizient von  $r_s = 0,1957$ , der statistisch signifikant war ( $p = 0,0329$ ) (Abbildung 30D). Dies signalisierte eine schwache Korrelation der mit dem 1C2-D2 gemessenen ATXN3-Proteinlevel und SARA. Wurde genannte Gruppe (> 24 SARA-Punkte) wiederum aus den Analysen eliminiert, so konnte der Rangkorrelationskoeffizient auf  $r_s = 0,2493$  gehoben werden, wobei sich die Korrelation beider Parameter damit sogar statistisch deutlich signifikant präsentierte (Abbildung 31D). Diese Tatsache suggerierte im 1C2-D2 Assay eine Korrelation von SARA und ATXN3-Proteinlevel vor allem für mild bis moderat betroffene Mutationsträger.



**Abbildung 31: Statistische Analyse des SARA und der ATXN3-Proteinlevel ohne die schwerstbetroffenen Mutationsträger mit SARA > 24 Punkte.** A, B) Auch nach Ausschluss der schwerstbetroffenen Mutationsträger (> 24 Punkte) in den Analysen erbrachte der Kruskal-Wallis-Test für beide Antikörper-Assays einen statistisch signifikanten bis höchst signifikanten Unterschied im ATXN3-Proteinlevel zwischen den Kontrollprobanden und allen Gruppen an Mutationsträgern. Zwischen < 3 und 13-24 SARA-Punkten zeigten sich Tendenzen für steigende ATXN3-Proteinlevel C), D) Die Korrelation nach Spearman ergab unter diesen mild bis moderat betroffenen Mutationsträgern statistisch signifikante bis deutlich signifikante Korrelationen von SARA und ATXN3-Proteinlevel. SARA = *Scale for the Assessment and Rating of Ataxia*.

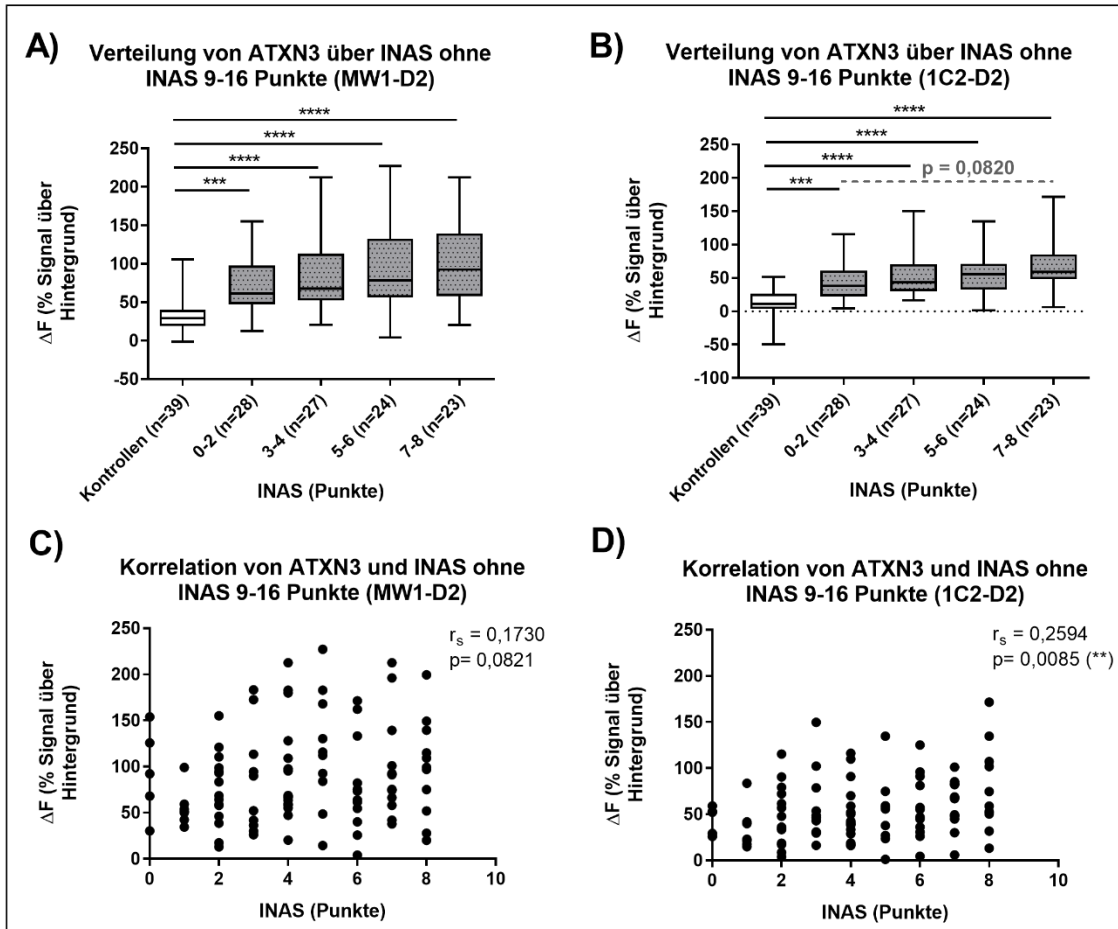


Für die statistischen Analysen des INAS und der ATXN3-Proteinlevel wurden die Mutationsträger erneut in Gruppen eingeteilt, wobei dieses Mal je nach Ausprägung der nicht-ataktischen Symptome zwischen insgesamt fünf Gruppen differenziert wurde (vgl. 1.1.3): < 3 Punkte (= nicht betroffen), 3-4 Punkte, 5-6 Punkte, 7-8 Punkte, 9-16 Punkte (= schwerstbetroffen), wobei die Symptom-schwere mit steigender INAS-Punktzahl zunahm. Ähnlich zu den vorangestellten Analysen bezüglich des SARA vermochten beide Antikörper-Assays mit dem Kruskal-Wallis-Test statistisch signifikant bis höchst signifikant zwischen den Kontrollprobanden und jeder der fünf Gruppen von SCA3-Mutationsträgern zu unterscheiden (Abbildung 32).



**Abbildung 32: Statistische Analyse des INAS und der ATXN3-Proteinlevel.** A), B) Für die Analysen mit dem Kruskal-Wallis-Test erfolgte die Einteilung der SCA3-Mutationsträger nach der nicht-ataktischen Symptomatik und entsprechender INAS-Punktzahl in fünf Gruppen. Zwischen 0-8 INAS-Punkten waren anhand der Mediane Tendenzen steigender ATXN3-Proteinlevel sichtbar, die allerdings nicht statistisch signifikant waren. Für die Gruppe mit 9-16 INAS-Punkten wurden in beiden Assays fallende Proteinlevel registriert. C), D) In der Analyse des MW1-D2 Assays korrelierten die INAS-Punktzahl und das ATXN3-Proteinlevel nicht. Für den 1C2-D2 konnten hingegen eine statistisch signifikante Korrelation der beiden Parameter ausgemacht werden. INAS = *Inventory of Non-Ataxia Symptoms*.

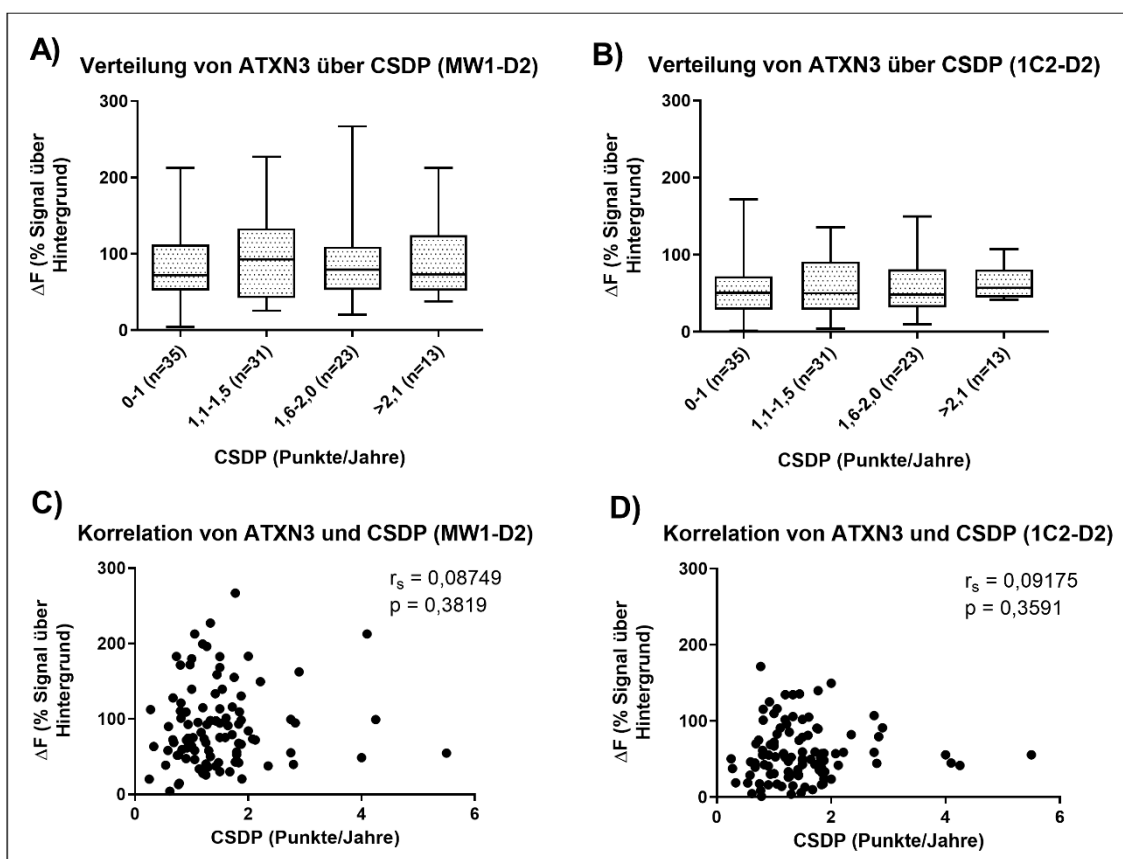
Unter den Mutationsträgern bildeten sich von der Gruppe mit < 3 Punkten bis zur Gruppe mit 7-8 Punkten wiederum Tendenzen steigender medianer ATXN3-Proteinlevel ab, wohingegen die ATXN3-Proteinlevel für die Gruppe der schwerstbetroffenen Mutationsträger (9-16 INAS-Punkte) wieder sanken (Abbildung 32A, B). Auch eine erneute statistische Analyse ohne letztere Gruppe ergab keine statistisch signifikanten Differenzen zwischen den ATXN3-Proteinleveln der ersten vier Gruppen von Mutationsträgern (Abbildung 33A, B). Trotzdem war der Unterschied im ATXN3-Proteinlevel zwischen Gruppe < 3 und 7-8 Punkten beinahe statistisch signifikant ( $p = 0,0820$ ) und unterstrich damit die Tendenz steigender ATXN3-Proteinwerte (gestrichelte, graue Linie). Eine Korrelationsanalyse nach Spearman erbrachte für den MW1-D2 Assay sowohl mit als auch ohne Einbezug der Gruppe mit 9-16 INAS-Punkten keine Korrelation, die statistisch signifikant war (Abbildung 32C, Abbildung 33C). Alleine der Assay mit dem 1C2-D2 Antikörper erbrachte eine statistisch relevante Korrelation von INAS und ATXN3-Proteinlevel von  $r_s = 0,2042$  ( $p = 0,0259$ ) (Abbildung 32D), die unter Ausschluss der Gruppe mit 9-16 INAS-Punkten sogar auf  $r_s = 0,2594$  verbessert werden konnte und nun statistisch deutlich signifikant war ( $p = 0,0085$ ) (Abbildung 33D). Diese Ergebnisse deuteten auf eine Korrelation des INAS-Punktwertes und der mittels 1C2-D2 ermittelten ATXN3-Proteinlevel vor allem für mild bis moderat betroffene (0 – 8 Punkte) SCA3-Mutationsträger hin.



**Abbildung 33: Statistische Analyse des INAS und der ATXN3-Proteinlevel ohne die schwerstbetroffenen Mutationsträger mit INAS 9-16 Punkte.** A), B) Nach Ausschluss der schwerstbetroffenen Gruppe mit INAS 9-16 Punkte konnten zwischen 0-8 INAS-Punkten anhand der Mediane Tendenzen steigender ATXN3-Proteinlevel beobachtet werden, die allerdings nach Kruskal-Wallis-Test nicht statistisch signifikant waren. C), D) In der Analyse des MW1-D2 Assays korrelierten die INAS-Punktzahl und das ATXN3-Proteinlevel nicht. Für den 1C2-D2 Assay konnten hingegen eine deutlich statistisch signifikante Korrelation der beiden Parameter unter mild bis moderat erkrankten Mutationsträgern ausgemacht werden. INAS = *Inventory of Non-Ataxia Symptoms*.

In einem weiteren Schritt war für die manifest erkrankten Mutationsträger interessant, ob der Indikator für Krankheitsprogression CSDP mit dem ATXN3-Proteinlevel der Mutationsträger korrelierte. Somit wurde nicht nur der Istzustand der Erkrankungsschwere als SARA bei Erstuntersuchung im Rahmen von ESMI abgebildet, sondern auch der bisherige Krankheitsverlauf der SCA3-Patienten bezüglich des Proteinlevels untersucht. Dazu wurden die symptomatischen SCA3-Patienten in vier Gruppen nach CSDP-Punktwert eingeteilt (0-1; 1,1-1,5; 1,6-2,0; > 2,1) und mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Test statistisch analysiert. Hohe CSDP-Werte bedeuteten eine zügige Krankheitsprogression, während niedrige CSDP-Werte anzeigten, dass die Symptomatik sich pro Jahr nur

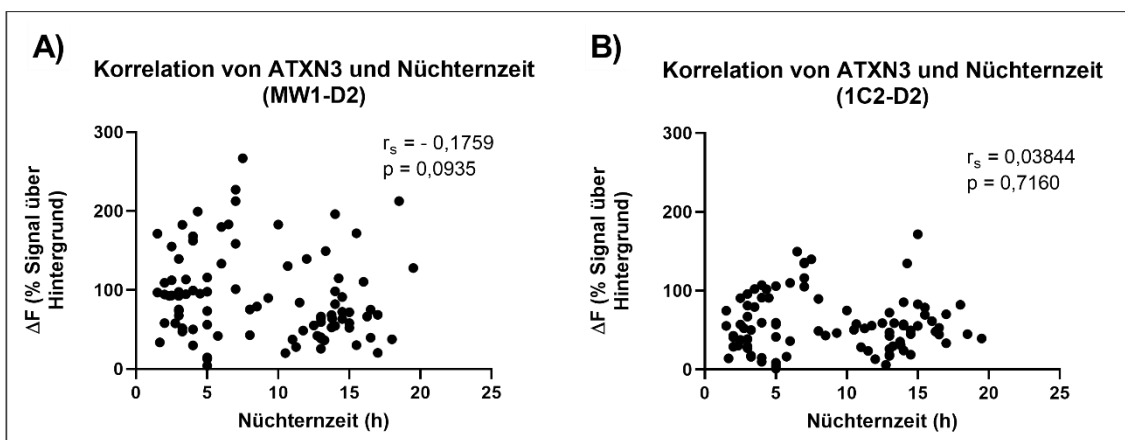
langsam aggraviert hatte. Dabei konnten sowohl im MW1-D2 Assay als auch im 1C2-D2 Assay keine relevanten Unterschiede im ATXN3-Proteinlevel zwischen den vier Gruppen mit unterschiedlich schneller Krankheitsprogression ausfindig gemacht werden ( $p > 0,9999$ ) (Abbildung 34A, B). Auch eine Korrelationsanalyse nach Spearman mit Rangkorrelationskoeffizienten nahe null (MW1-D2:  $r_s = 0,08749$ ; 1C2-D2:  $r_s = 0,09175$ ) lieferte keine Hinweise auf eine Korrelation der ATXN3-Proteinlevel mit der CSDP (Abbildung 34C, D). Somit war davon auszugehen, dass das ATXN3-Proteinlevel keine Aussage über die Schnelligkeit bzw. Ausprägung der Krankheitsprogression erlaubte.



**Abbildung 34: Statistische Analyse der CSDP von symptomatischen SCA3-Patienten und der ATXN3-Proteinlevel.** A), B) Der Kruskal-Wallis-Test erbrachte keine statistisch relevanten Unterschiede im ATXN3-Proteinlevel zwischen vier Gruppen von symptomatischen SCA3-Patienten, die sich durch ihre bisherige Krankheitsprogression (CSDP) unterschieden. C), D) In beiden Assays korrelierten die ATXN3-Proteinlevel nach Spearman nicht mit der CSDP. CSDP = *Cross-sectional annual disease progression*.

Im Rahmen der anamnestischen Datenerhebung in den Zentren war von 92 symptomatischen SCA3-Patienten die Dauer der Nüchternheit vor der Blutentnahme erfragt worden, um einen möglichen Einfluss von Nahrung auf das

ATXN3-Proteinlevel beurteilen zu können. Die Datensätze für beide Assays waren nach dem D’Agostino-Pearson Test nicht normalverteilt. Auf dieser Grundlage lies sich im MW1-D2 Assay für die Korrelation beider Parameter ein Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman von  $r_s = -0,1759$  ermitteln. Mit einem Signifikanzwert von  $p = 0,0935$  war diese inverse Korrelation beinahe statistisch signifikant (Abbildung 35A). Tendenziell ging eine kürzere Nüchternzeit also mit höheren ATXN3-Proteinleveln im MW1-D2 Assay einher. Im 1C2-Assay konnte diese Tendenz mit einem Korrelationskoeffizienten von  $r_s = 0,03844$  nicht bestätigt werden (Abbildung 35B).



**Abbildung 35: Statistische Korrelation der Nüchternzeit vor Blutentnahme und der ATXN3-Proteinlevel symptomatischer SCA3-Patienten.** A), B) Für beide Assays (MW1-D2 und 1C2-D2) wurde bei fehlender Normalverteilung in der statistischen Analyse mit dem Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman gearbeitet. Im 1C2-D2 konnten keine Hinweise auf eine Korrelation von der Nüchternzeit mit dem ATXN3-Proteinlevel gefunden werden. Im MW1-D2 zeigte sich ein inverser Zusammenhang zwischen beiden Parametern, der fast statistisch signifikant war.

Tabelle 37 fasst die Ergebnisse der statistischen Analyse des ATXN3-Proteinlevels mit den klinischen Parametern zusammen.

**Tabelle 37: Zusammenfassung des Einflusses genetischer und klinischer Parameter auf das ATXN3-Proteinlevel.** AAO = Alter bei Krankheitsbeginn, DD = Krankheitsdauer, CSDP = *Cross-sectional annual disease progression*, SARA = *Scale of the Assessment of Rating of Ataxia*, INAS = *Inventory of Non-Ataxia Symptoms*.

Parameter	ATXN3-Proteinlevel im MW1-D2 Assay	ATXN3-Proteinlevel im 1C2-D2 Assay
<b>Kohorten (Kontrollprobanden, präsym. Mutationsträger, SCA3-Patienten)</b>	Deutlich signifikante Unterscheidung zwischen Kontrollprobanden und präsymptomatischen Mutationsträgern ( $p = 0,0057$ ) und höchst signifikante Unterscheidung zwischen Kontrollprobanden und SCA3-Patienten ( $p <$	Hoch signifikante Unterscheidung zwischen Kontrollprobanden und präsymptomatischen Mutationsträgern ( $p = 0,0004$ ) und höchst signifikante Unterscheidung zwischen Kontrollprobanden und SCA3-Patienten ( $p < 0,0001$ ) an-

	0,0001) anhand der ATXN3-Proteinlevel.	hand der ATXN3-Proteinlevel.
<b>CAG-Länge</b>	Keine Korrelation von CAG-Länge und ATXN3-Proteinlevel ( $r_s = 0,1720$ , $p = 0,0614$ ). Keine statistisch relevanten Unterschiede im Proteinlevel zwischen vier Gruppen verschiedener CAG-Länge.	Keine Korrelation von CAG-Länge und ATXN3-Proteinlevel ( $r_s = 0,01111$ , $p = 0,9045$ ). Keine statistisch relevanten Unterschiede im Proteinlevel zwischen vier Gruppen verschiedener CAG-Länge.
<b>AAO</b>	Keine Korrelation von AAO und ATXN3-Proteinlevel. Für Probanden mit $AAO \leq 30$ Jahren wurden die höchsten ATXN3-Proteinlevel gemessen.	Keine Korrelation von AAO und ATXN3-Proteinlevel. Für Probanden mit $AAO \leq 30$ Jahren wurden die höchsten ATXN3-Proteinlevel gemessen.
<b>DD</b>	Keine Korrelation von DD und ATXN3-Proteinlevel.	Keine Korrelation von DD und ATXN3-Proteinlevel.
<b>SARA</b>	Tendenz steigender ATXN3-Proteinlevel zwischen 0-24 SARA-Punkten. Sinkender SARA für Probanden mit $> 24$ Punkten. Statistisch signifikante Korrelation von SARA und ATXN3-Proteinlevel für leicht bis moderat betroffene Patienten ( $r_s = 0,1922$ ; $p = 0,0473$ )	Tendenz steigender ATXN3-Proteinlevel zwischen 0-24 SARA-Punkten. Sinkender SARA für Probanden mit $> 24$ Punkten. Statistisch deutlich signifikante Korrelation von SARA und ATXN3-Proteinlevel für leicht bis moderat betroffene Patienten ( $r_s = 0,2493$ ; $p = 0,0096$ )
<b>INAS</b>	Tendenz steigender ATXN3-Proteinlevel zwischen 0-8 INAS-Punkten. Sinkender INAS für Probanden mit 9-16 Punkten. Keine Korrelation von INAS und ATXN3-Proteinlevel für leicht bis moderat betroffene Patienten ( $r_s = 0,1730$ ; $p = 0,0821$ ).	Tendenz steigender ATXN3-Proteinlevel zwischen 0-8 INAS-Punkten. Sinkender INAS für Probanden mit 9-16 Punkten. Statistisch deutlich signifikante Korrelation von INAS und ATXN3-Proteinlevel für leicht bis moderat betroffene Patienten ( $r_s = 0,2594$ ; $p = 0,0085$ ).
<b>CSDP</b>	Keine Korrelation von Krankheitsprogression (CSDP) und ATXN3-Proteinlevel.	Keine Korrelation von Krankheitsprogression (CSDP) und ATXN3-Proteinlevel.
<b>Nüchternzeit</b>	Keine Korrelation von Nüchternzeit und ATXN3-Proteinlevel. Trotzdem Tendenz einer inverse Korrelation der Parameter ( $r_s = - 1,759$ , $p = 0,0935$ ).	Keine Korrelation von Nüchternzeit und ATXN3-Proteinlevel.

## **4.2 Longitudinale Analyse der ATXN3-Proteinlevel zwischen Erst- und Zweituntersuchung im Rahmen von ESMI**

### **4.2.1 Kohortenanalyse**

In Bezug auf Biomarker-Forschungen und deren Validierung spielen im Allgemeinen longitudinale Studiendesigns eine zentrale Rolle. Im Rahmen von ESMI und der Untersuchung von ATXN3 als putativer Biomarker für die Erkrankung SCA3 konnte eine solche longitudinale Studie bei Wiedervorstellung der Probanden im jährlichen Turnus zumindest für eine kleine Kohorte durchgeführt werden. Diese umfasste insgesamt 23 Probanden, für die jeweils eine PBMC-Probe bei der Erst- und Zweituntersuchung im Rahmen von ESMI abgenommen worden war. Tabelle 38 liefert einen Überblick über die Kohorte und ihren Eckdaten. Zu ihr gehörten 20 manifest erkrankte SCA3-Patienten, während zum Zeitpunkt der statistischen Auswertung nur für eine weibliche gesunde Kontrollprobandin und jeweils einen männlichen und weiblichen präsymptomatischen Mutationsträger aufeinanderfolgende PBMC-Proben in Tübingen zur Analyse vorlagen. Unter den manifesten SCA3-Patienten lag der Frauenanteil bei 70 %. Zum Zeitpunkt der Zweituntersuchung war die Kontrollprobandin 59 Jahre alt. Die präsymptomatischen Mutationsträger waren mit 37 Jahren (IQA = 6) verhältnismäßig jung, während die manifesten SCA3-Patienten im Mittel 52,4 Lebensjahre zählten (SD = ± 10,3). Das mittlere Erkrankungsalter lag für die symptomatischen SCA3-Patienten bei 38,4 Jahren (SD = ± 9,7). Die Erkrankung hatte bei ihnen bereits 13,76 Jahre (SD = ± 6,7) andauert. In einem Jahr zwischen Erst- und Zweituntersuchung in ESMI hatten sich sowohl SARA als auch INAS bei der Kontrollprobandin um keinen Punkt geändert. Die Zweituntersuchung ergab bei den zwei präsymptomatischen Mutationsträgern einen im Mittel 1,25 Punkte (IQA = 0,5) erhöhten SARA als im Jahr zuvor, während der INAS um 2 Punkte (IQA = 2) angestiegen war. Für das Kollektiv der 20 manifesten SCA3-Patienten ergab sich ein Mittelwert der SARA-Differenz von -0,3 SARA-Punkten (IQA = 6), was im Mittel eine leichte Abnahme der SARA-Punktzahl bedeutete. Die Einjahresdifferenz für den INAS lag für das Patientenkollektiv bei +0,83 INAS-Punkten (SD = ± 2,1). Bezüglich des INAS ist zu erwähnen, dass für zwei der manifesten SCA3-Patienten lediglich die Folgewer-

te des SARA, nicht jedoch die INAS-Punktzahl überliefert wurden. Zugunsten einer größeren Kohorte für die Analysen des SARA bei ohnehin begrenzter Probandenzahl wurden diese Patienten dennoch ins Patientenkollektiv aufgenommen.

**Tabelle 38: Eckdaten für die longitudinalen, statistischen Analysen des Patientenkollektives mit abgenommener PBMC-Probe bei der Erst- und Zweituntersuchung im Rahmen von ESMI dargestellt als Mittelwert oder Median.** SARA = *Scale for the Assessment and Rating of Ataxia*, INAS = *Inventory of Non-Ataxia Symptoms*, CSDP = *Cross-sectional annual disease progression*.

	<b>Gesunde Kontrollen</b>	<b>Präsymptomatische Mutationsträger</b>	<b>Manifeste SCA3-Patienten</b>
<b>Kohortenstärke (Frauenanteil)</b>	1 (1; 100 %)	2 (1; 50 %)	20 (14; 70 %)
<b>Alter</b> in Jahren bei der Zweituntersuchung	59	37 (IQA = 6)	52,35 (SD = ± 10,3)
<b>Erkrankungsbeginn</b> in Jahren	-	-	38,4 (SD = ± 9,7)
<b>Erkrankungsdauer</b> in Jahren bei Zweituntersu- chung	-	-	13,75 (SD = ± 6,7)
<b>ΔSARA</b> in Punkten/Jahr	0	1,25 (IQA = 0,5)	-0,3 (IQA = 6)
<b>ΔINAS</b> in Punkten/Jahr	0	2 (IQA = 2)	+0,83 (SD = ± 2,1)

#### 4.2.2 Statistische Analysen der ATXN3-Proteinlevel zwischen Erst- und Zweituntersuchungen im Rahmen von ESMI und klinischer Parameter

Die Abbildung 36A-D bietet zunächst einen Überblick über die 23 Probanden umfassenden Kohorte indem für jeden Probanden die Einjahresänderung des SARA, INAS und des ATXN3-Proteinlevels im MW1-D2 und 1C2-D2 Assay einzeln aufgeschlüsselt dargestellt wurde. Dabei wurde die Kontrollprobandin durch die grüne und die beiden präsymptomatischen Mutationsträger durch die blaue Farbkodierung repräsentiert. Die Verläufe der manifest erkrankten SCA3-Patienten wurden bei steigender SARA-Punktzahl in Schwarz, bei abfallender Punktzahl in Rot dargestellt.

Für die 59-jährige Kontrollprobandin blieben sowohl SARA als auch INAS bei einem Punktwert von 0 Punkten. Für das mittels MW1-D2 Assay bestimmte



ATXN3-Proteinlevel war ein minimaler Anstieg von 35,3 auf 45,6 zu verzeichnen. Im 1C2-D2 Assay war in der Probe der Erstuntersuchung in ESML ein für eine Kontrolle ungewöhnlich hoher Wert von 33,7 gemessen worden, der bei der Zweituntersuchung auf 9,2 abgefallen war. Mit dem Wissen über die Bindungsfähigkeiten des 1C2-D2 Antikörpers muss bei Vorliegen von 27 CAG-Triplett-Wiederholungen auf dem längeren der nicht-expandierten Allele der Probandin eine fehlerhafte Messung oder mangelhaftes Probenmanagement in Betracht gezogen werden. Die präsymptomatische Mutationsträgerin war in der Analyse des SARA von einer Punktzahl von 2 auf 3,5 Punkte angestiegen, der präsymptomatische Mutationsträger von 2,5 auf 3,5 Punkte, womit sich beide in der Definition des Betroffenheitsgrades klinisch zwischen nicht betroffen und mild betroffen befanden. Auch die nicht-ataktischen Symptome waren verstärkt ausgeprägt. Dies äußerte sich in einem Anstieg der INAS-Punktzahl von 1 bzw. 5 Punkten bei der Zweituntersuchung. Bei der weiblichen präklinischen Mutationsträgerin war sowohl im MW1-D2 Assay, als auch im 1C2-D2 Assay innerhalb eines Jahres ein deutlicher Anstieg des ATXN3-Proteinlevels zu verzeichnen. Beim männlichen Probanden dieser Gruppe wurde bei der Zweituntersuchung im MW1-D2 Assay ein niedrigeres, im 1C2-D2 Assay jedoch ein erhöhtes ATXN3-Proteinlevel gemessen. Somit war der Übergang vom präklinischen Stadium zum milden Betroffenheitsgrad im 1C2-D2 Assay einheitlich mit steigendem ATXN3-Proteinlevel verbunden, wohingegen sich im MW1-D2 Assay für beide Probanden entgegengesetzte Änderungen des Proteinlevels abbildeten.

Die Abbildung 36A und B legt dar, dass sich SARA und INAS hinsichtlich der symptomatischen SCA3-Patienten nicht immer in gleicher Richtung veränderten. So gab es SCA3-Patienten mit steigendem SARA bei gleichzeitig abfallendem INAS. Umgekehrt wurden Fälle dokumentiert, bei denen die SARA-Punktzahl abnahm, sich im gleichen Zug aber die nicht-ataktischen Symptome aggravierten. Im MW1-D1 Assay ergaben sich für die Messung des ATXN3-Proteinlevels ähnlich differente Ergebnisse. Bei drei von neun SCA3-Patienten mit fallendem SARA stiegen die ATXN3-Proteinlevel an. Auf der anderen Seite bedeutete ein ansteigender SARA in sechs von zwölf Fällen ein gleichzeitig fal-

lendes ATXN3-Proteinlevel. Im 1C2-D2 Assay war in lediglich vier von zwölf Fällen ein steigender SARA mit einem steigenden ATXN3-Proteinlevel assoziiert. Umgekehrt bedeutete ein gesunkener SARA hier in vier Fällen ein eleviertes ATXN3-Proteinlevel bei der Zweituntersuchung in ESMI.

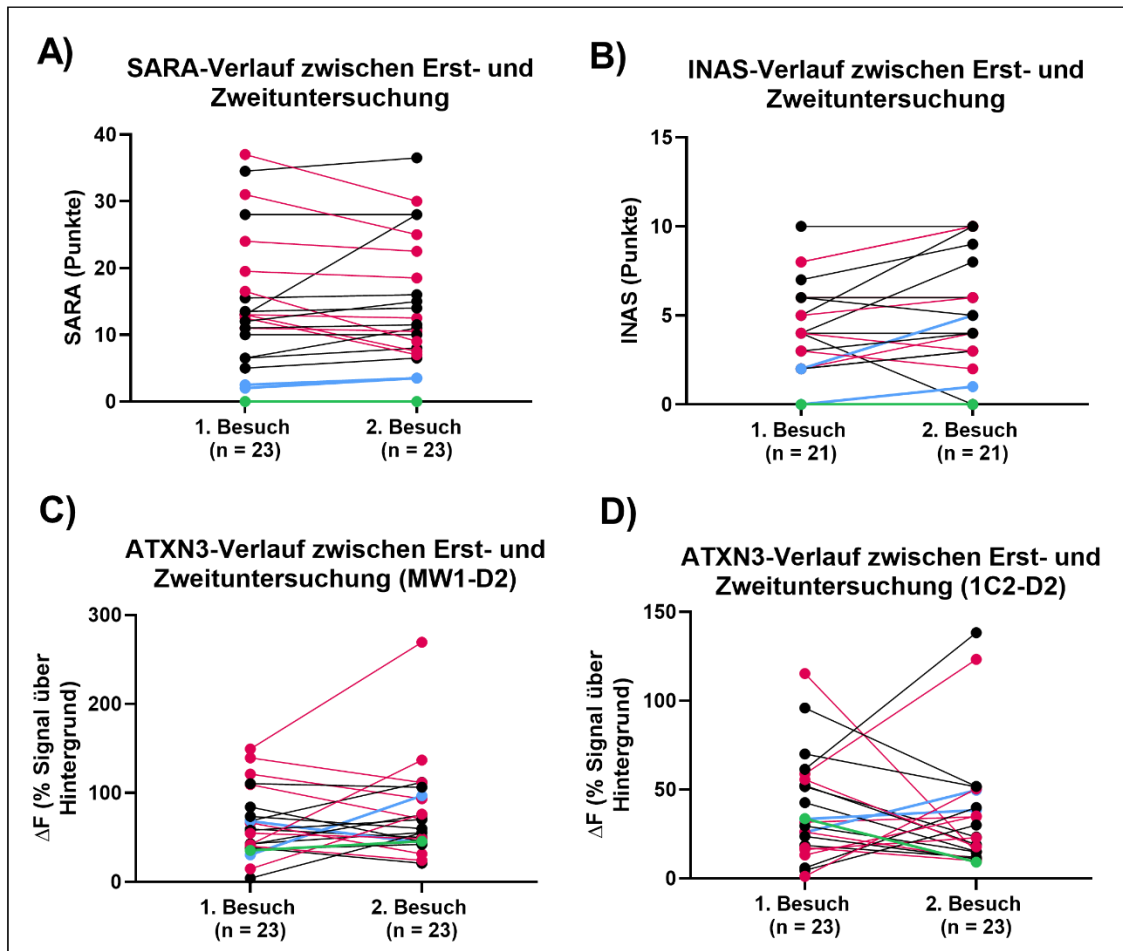
Um die Veränderung der ATXN3-Proteinlevel je nach Betroffenheitsgrad der 20 SCA3-Patienten weiter aufzuschlüsseln ist in Tabelle 39 der je nach  $\Delta$ SARA ermittelte Betroffenheitsgrad bzw. dessen Wechsel mit dazugehöriger Richtung der Veränderung des ATXN3-Proteinlevels getrennt für beide Antikörper-Assays aufgeführt.

**Tabelle 39: Übersicht zur Richtung der Änderung des ATXN3-Proteinlevels in PBMC-Proben von symptomatischen SCA3-Patienten zwischen Erst- und Zweituntersuchung in ESMI je nach klinischem Betroffenheitsgrad und Antikörper-Assay.** Die Betroffenheitsgrade wurden in Kooperation mit der Neurologie des Universitätsklinikums Tübingen folgendermaßen nach SARA-Punktzahl definiert: nicht betroffen (< 3 Punkte), leicht betroffen (3-12 Punkte), moderat betroffen (13-24 Punkte), schwer betroffen (> 24 Punkte). SARA = *Scale for the Assessment and Rating of Ataxia*.

Betroffenheitsgrad nach $\Delta$ SARA	Fälle insgesamt	Fälle mit gestiegenem ATXN3-Proteinlevel		Fälle mit gesunkenem ATXN3-Proteinlevel	
		MW1-D2	1C2-D2	MW1-D2	1C2-D2
<b>mild</b>	8	2	1	6	7
<b>moderat</b>	3	3	2	-	1
<b>schwer</b>	4	3	3	1	1
<b>mild zu moderat</b>	2	-	1	2	1
<b>moderat zu mild</b>	1	-	-	1	1
<b>moderat zu schwer</b>	1	1	-	-	1
<b>schwer zu moderat</b>	1	-	1	1	-

Vor der näheren Betrachtung ist dabei vor allem die kleine Fallzahl der einzelnen Betroffenheitsgrade zu erwähnen, die kaum eine globale und repräsentative Aussage zur Änderung der ATXN3-Proteinlevel erlaubte, allerdings Hinweise für mögliche Tendenzen abbilden konnte. In Tabelle 39 ist zu erkennen, dass für mild betroffene SCA3-Patienten in beiden Assays eher sinkende ATXN3-Proteinlevel, für moderat und schwer betroffene SCA3-Patienten eher steigende ATXN3-Proteinlevel gemessen wurden. Bei wechselndem Betroffenheitsgrad mit Beteiligung von moderat und schwer waren kaum Tendenzen auszumachen, denn beide Assays erbrachten hier entgegengesetzte Veränderungen des ATXN3-Proteinlevels. Lediglich im Wechsel von moderat zu mild ergaben sich mit dem MW1-D2 und dem 1C2-D2 Assay einheitlich sinkende

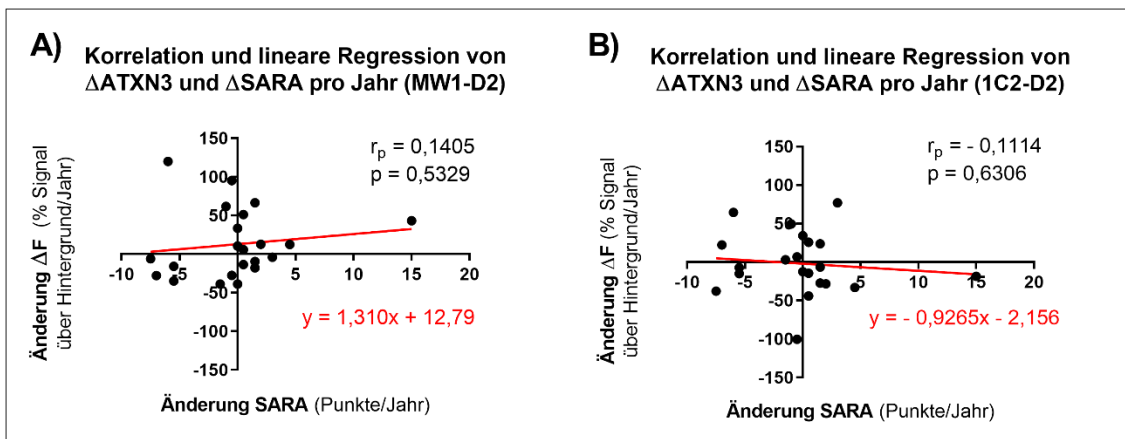
ATXN3-Proteinlevel. Eine mögliche Korrelation zwischen Nüchternzeit vor der Zweituntersuchung in ESMI und der Richtung der Änderung des ATXN3-Proteinlevels war für beide Antikörper-Assays nicht zu beobachten und wurde deshalb hier nicht graphisch dargestellt.



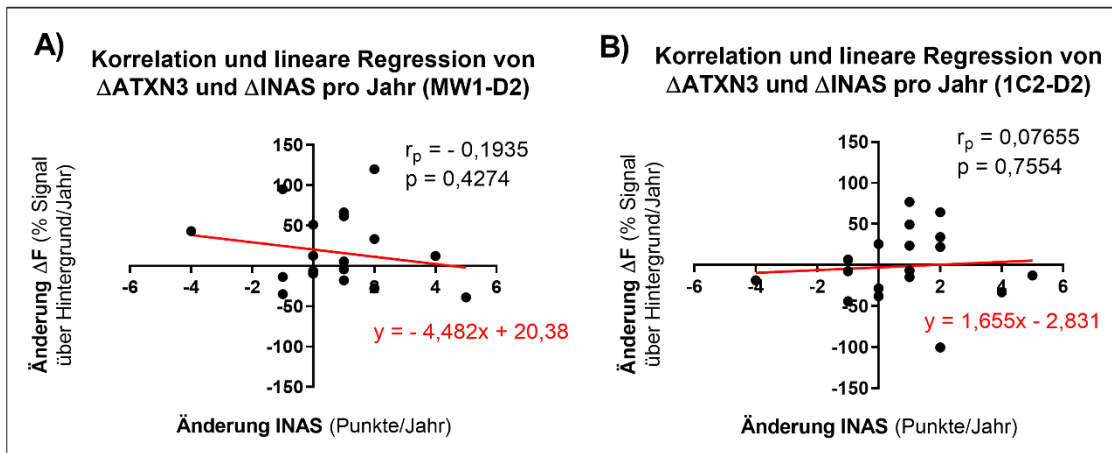
**Abbildung 36: Übersicht der Einjahresänderung der klinischen Parameter SARA und INAS und des ATXN3-Proteinlevels zwischen Erst- und Zweituntersuchung in ESMI im MW1-D2 und 1C2-D2 Assay für Kontrollen (grün), präsymptomatische Mutationsträger (blau) und symptomatische Mutationsträger mit steigendem SARA (schwarz) und sinkendem SARA (rot).** A)-D) Für symptomatische Mutationsträger wurde klar, dass die Richtung der SARA-Änderung nicht mit einer einheitlichen Richtung der Änderung von INAS oder ATXN3-Proteinlevel assoziiert war. Die Kontrollprobandin hatte sich innerhalb eines Jahres klinisch nicht verändert während das ATXN3 Proteinlevel im MW1-D2 Assay minimal angestiegen war. Beide präsymptomatischen Mutationsträger hatten sich innerhalb eines Jahres am SARA gemessen zu mild betroffenen SCA3-Patienten entwickelt, was auch am INAS-Anstieg sichtbar wurde. Im 1C2-D2 Assay waren die ATXN3-Proteinlevel auch für diese Probanden gestiegen. SARA = Scale for the Assessment and Rating of Ataxia, INAS = Inventory of Non-Ataxia Symptoms.

Im Kommenden soll mittels Korrelationsanalysen und linearen Regressionen auf den Zusammenhang zwischen der jährlichen Änderung des ATXN3-Proteinlevels und der klinischen Bewertungssysteme SARA und INAS eingegangen werden.

gangen werden. Dabei ist in Abbildung 37 und Abbildung 38 einheitlich zu sehen, dass die Änderung der SARA- und INAS-Punktzahl bei sehr niedrigen Korrelationskoeffizienten nach Pearson (MW1-D2:  $r_p = 0,1405$  (Abbildung 37A); 1C2-D2:  $r_p = -0,1114$  (Abbildung 37B)) und hohen Signifikanzwerten (MW1-D2:  $p = 0,5329$  (Abbildung 38A); 1C2-D2:  $p = 0,6306$  (Abbildung 38B)) weder im MW1-D2 noch im 1C2-D2 Assay mit der Änderung der ATXN3-Proteinlevel korrelierten. Auch die linearen Regressionen, die bei entsprechender Signifikanz einen Schluss von der Änderung des SARA oder INAS auf die Größe und Richtung der Änderung des Proteinlevels zulassen würden, waren nicht statistisch signifikant (SARA:  $p = 0,5329$  (MW1-D2),  $p = 0,6306$  (1C2-D2)); INAS:  $p = 0,4274$  (MW1-D2),  $p = 0,7554$  (1C2-D2)) und die Richtung zudem für beide Assays entgegengesetzt. Somit geben diese Ergebnisse in dieser kleinen Kohorte keine Hinweise auf mögliche Zusammenhänge zwischen Änderung der klinischer Symptomatik und der Konzentration von ATXN3 in PBMCs.

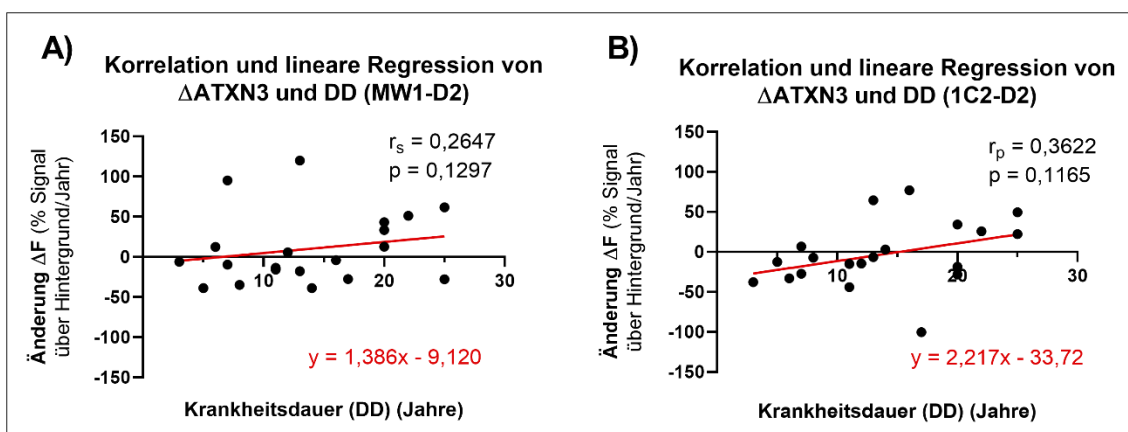


**Abbildung 37: Statistische Analyse der Änderung von SARA und der ATXN3-Proteinlevel symptomatischer Mutationsträger.** Für beide Antikörper-Assays war keine Korrelation der Einjahresänderung der beiden Parameter feststellbar. Die lineare Regressionsanalyse erbrachte für den MW1-D2 Assay einen positiv linearen Zusammenhang der Parameter, während der 1C2-D2 Assay hierfür einen negativ linearen Zusammenhang suggerierte. Beide Regressionsanalysen waren allerdings nicht statistisch signifikant ( $p = 0,5329$  (MW1-D2),  $p = 0,6306$  (1C2-D2)). SARA = *Scale for the Assessment and Rating of Ataxia*.



**Abbildung 38: Statistische Analyse der Änderung von INAS und der ATXN3-Proteinlevel symptomatischer Mutationsträger.** Die Korrelationsanalyse erbrachte für den MW1-D2 und den 1C2-D2 Assay keine statistisch signifikante Korrelation beider Parameter. Die entgegengesetzt gerichteten linearen Regressionsanalysen waren ebenfalls von keiner statistischen Relevanz ( $p = 0,4274$  (MW1-D2),  $p = 0,7554$  (1C2-D2)). INAS = *Inventory of Non-Ataxia Symptoms*.

Beim Zusammenhang der Krankheitsdauer und der Änderung des ATXN3-Proteinlevels zwischen Erst- und Zweituntersuchung in ESMI fiel vor allem für den 1C2-D2 Assay eine Korrelation ( $r_p = 0,3622$ ) von Erkrankungsdauer und Änderung des ATXN3-Proteinlevels auf, die zu 11,65 % durch Zufall entstanden war und somit leider nicht statistisch signifikant war (Abbildung 39B).



**Abbildung 39: Statistische Analyse der Änderung von DD und der ATXN3-Proteinlevel symptomatischer Mutationsträger.** Dabei ließen sich in beiden Antikörper-Assays nicht-signifikante Tendenzen von einer Korrelation zwischen beiden Parametern ermitteln. Mit längerer Krankheitsdauer stieg das ATXN3-Proteinlevel jährlich stärker an. Die lineare Regressionsanalyse ergab jeweils einen positiv linearen Zusammenhang von der Änderung des ATXN3-Proteinlevels und der DD. Dieser war aber nicht statistisch signifikant (MW1-D2:  $p = 0,3799$ ; 1C2-D2:  $p = 0,1165$ ). DD = Krankheitsdauer.

Trotzdem spiegeln diese Daten in der kleinen Kohorte die Tendenz wider, dass sich mit erhöhter Krankheitsdauer die ATXN3-Proteinlevel jährlich ver-

mehrt in positive Richtung veränderten. Auch mit dem MW1-D2 Assay war diese Tendenz auszumachen, wobei hier lediglich eine leichte Korrelation von  $r_s = 0,2647$  zu beobachten war ( $p = 0,1297$ ) (Abbildung 39A). Die lineare Regressionsanalyse zeigte in beiden Assays einen positiven, linearen Zusammenhang zwischen DD und Änderung des ATXN3-Proteinlevels.

Tabelle 40 fasst die Ergebnisse der statistischen Analyse der longitudinal erhobenen ATXN3-Proteinlevel und der klinischen Parameter zusammen.

**Tabelle 40: Zusammenfassung des Verlaufs klinischer Parameter und des ATXN3-Proteinlevels zwischen Erst- und Zweituntersuchung in ESMI.** AAO = Alter bei Krankheitsbeginn, CSDP = *Cross-sectional annual disease progression*, SARA = *Scale of the Assessment of Rating of Ataxia*, INAS = *Inventary of Non-Ataxia Symptoms*, DD = Krankheitsdauer.

Parameter	Änderung des ATXN3-Proteinlevels im MW1-D2 Assay	Änderung des ATXN3-Proteinlevels im 1C2-D2 Assay
<b>Δ SARA</b>	Keine Korrelation oder linearer Zusammenhang von Änderung im ATXN3-Proteinlevel und SARA.	Keine Korrelation oder linearer Zusammenhang von Änderung im ATXN3-Proteinlevel und SARA.
<b>Δ INAS</b>	Keine Korrelation oder linearer Zusammenhang von Änderung im ATXN3-Proteinlevel und INAS.	Keine Korrelation oder linearer Zusammenhang von Änderung im ATXN3-Proteinlevel und INAS.
<b>DD</b>	Tendenz einer Korrelation von Änderung des ATXN3-Proteinlevels mit DD ( $r_p = 0,2647$ ; $p = 0,1297$ ).	Tendenz einer Korrelation von Änderung des ATXN3-Proteinlevels mit DD ( $r_p = 0,3622$ ; $p = 0,1165$ ). Nicht-signifikante, positive, lineare Regression der beiden Parameter ( $p = 0,1165$ ). Validierung in größerer Kohorte empfehlenswert.

### 4.3 Analysen der drei Einzelnukleotidpolymorphismen im Gen *ATXN3*

Zunächst soll eine Begriffserklärung für die folgenden Abschnitte erfolgen: Immer wieder wird im Kommenden auf homozygote und heterozygote Mutations-träger Bezug genommen. Damit wird wie in den vorherigen Abschnitten auf die Homozygotie bzw. Heterozygotie für das polyQ-expandierte bzw. nicht-polyQ-expandierte *ATXN3*-Gen verwiesen, jedoch keine Aussage über Genotypen des jeweils analysierten Einzelnukleotidpolymorphismus (SNPs) gemacht.

#### **4.3.1 Etablierung der *High Resolution Melting Analysis* als Methode zur Genotypisierung der Einzelnukleotidpolymorphismen im Gen *ATXN3***

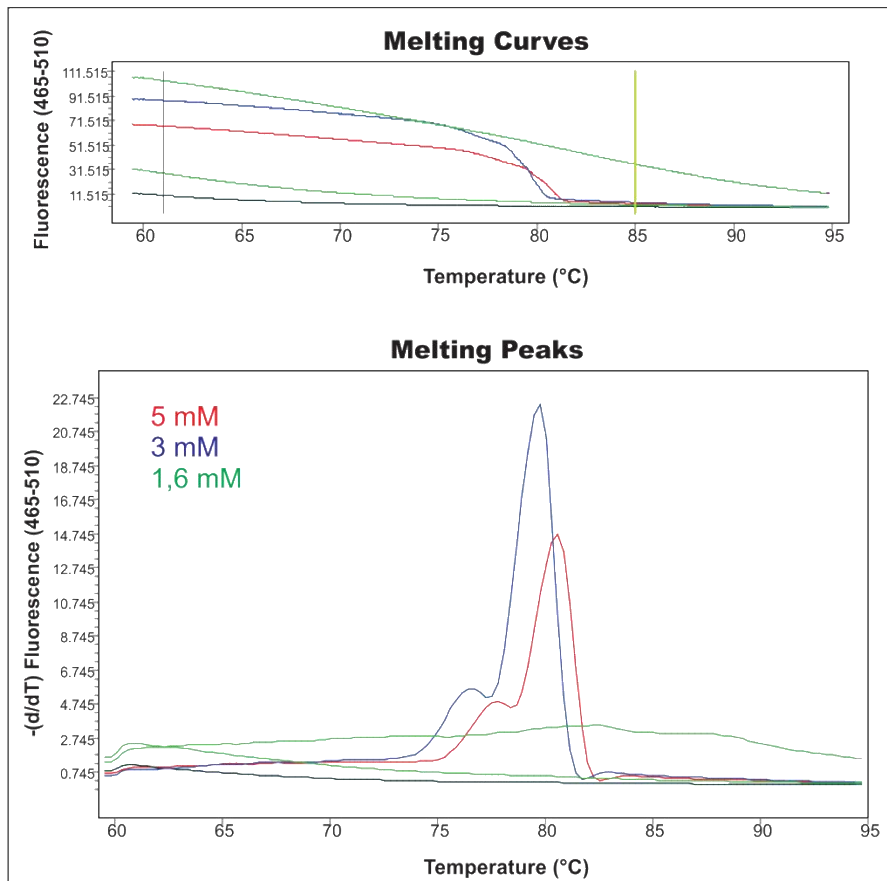
Im Rahmen der Verarbeitung der in ESMI erhaltenen Blutproben war von Dr. med. dent. Gabriele Anna Kaucher und Patrik Pelz für die Bestimmung des Genotyps der drei SNPs ATXN3 BP 669, ATXN3 BP 987 und ATXN3 BP 1118 auf eine zeitlich aufwendige, fehleranfällige und teure Sequenzierung nach Sanger zurückgegriffen worden. Um diese Genotypisierung zu vereinfachen und zu beschleunigen wurde im Verlauf dieser Promotion an der Etablierung der *High Resolution Melting Analysis* (HRMA) für diese SNPs gearbeitet.

Hierfür wurden zunächst mit Hilfe der *Primer-BLAST* Funktion der *Website* des *National Center of Biotechnology Information (NCBI)* zu den SNPs passende Primer entworfen und bei der Firma Metabion International AG nach Handbuch des *Light Cycler® 480 Real Time PCR Systems* (Version 7, September 2016) in HPLC-Aufreinigung bestellt. Für den SNP ATXN3 BP 669 konnten dabei die Sequenzen der bereits zuvor für die Sequenzierung nach Sanger verwendeten Primer genutzt werden. ATXN3 BP 987 und ATXN3 BP 1118 waren in der Sequenzierung nach Sanger in einer gemeinsamen PCR mit derselben Primer-Zielsequenz amplifiziert worden. Für eine getrennte Analyse beider SNPs mittels HRMA, musste für den SNP ATXN3 BP 987 der Rückwärtsprimer, für den SNP ATXN3 BP 1118 der Vorwärtsprimer neu entworfen werden. Beim Entwickeln von Vorwärts- und Rückwärtsprimer einer Zielsequenz wurde besonders auf einen ähnlichen Guanin- und Cytosin-Gehalt, sowie eine geringe Selbstkomplementarität beider Primersequenzen, eng beieinander liegende Schmelztemperaturen und *ATXN3* als ausschließliches Zielgen geachtet.

Das Prinzip der HRMA im *Light Cycler® 480 Real Time PCR System* beruhte grundsätzlich auf einer Amplifikation von DNA im Sinne einer PCR mit den drei Zyklusstufen Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation. Daran anknüpfend fand ein Schmelzvorgang (*Melting*) der DNA statt. Während diesem wurden Fluoreszenzverläufe des *High Resolution Melting Dyes*, das in die doppelsträngige DNA interkaliert war, hochauflösend aufgezeichnet, wobei die Fluoreszenzintensität bei steigenden Temperaturen im Rahmen des

Schmelzvorgangs bei Denaturierung beider DNA-Stränge sank. Für jede DNA-Probe erhielt man bei dieser Aufzeichnung in der Konsequenz eine Schmelzkurve, sowie die Angabe eines Schmelzmaximums. Beides waren Liniendiagramme, wobei bei ersterem die Fluoreszenz, beim letzterem die Fluoreszenzintensität  $[-(d/dT) \text{ Fluoreszenz}]$  über die Temperatur  $[\text{°C}]$  visualisiert wurden. Die Methode erlaubte es, kleinste Veränderungen der Basensequenz im Sinne eines Einzelnukleotidpolymorphismus als Formveränderungen der Liniendiagramme abzubilden. Um für die Analysen eine ideale Balance zwischen Enzymaktivität der Taq-Polymerase im *Light Cycler® 480 High Resolution Melting Master Mix* und Schmelzpunkt von doppelsträngiger DNA zu finden, wurde in einem ersten Experiment die optimale  $\text{MgCl}_2$ -Konzentration bestimmt. Hierfür wurden für sechs Proben mit bekanntem Genotyp am SNP ATXN3 BP 669 der Reaktionsansatz mit aufsteigenden  $\text{MgCl}_2$ -Konzentrationen (0 mM, 1,6 mM, 3 mM, 5 mM, 6,6 mM) pipettiert. Ohne den Zusatz von  $\text{MgCl}_2$  war die Amplifikation von DNA mittels PCR nicht möglich (Daten nicht gezeigt). Abbildung 40 zeigt die Schmelzkurven und -maxima für die  $\text{MgCl}_2$ -Konzentrationen von 1,6 bis 5 mM. Eine Konzentration von 1,6 mM  $\text{MgCl}_2$  im Reaktionsansatz führte, rein an der Fluoreszenz gemessen, zur Amplifikation der DNA, doch fiel die Menge an doppelsträngiger DNA beim Schmelzen stetig ohne Schmelzmaximum ab, sodass kein Genotyp-spezifisches Schmelzen der DNA möglich war. Für die Konzentrationen von 3 und 5 mM  $\text{MgCl}_2$  im Reaktionsansatz funktionierte sowohl die DNA-Amplifikation als auch das Generieren von Schmelzkurve und -maximum. Bei gleichförmigen Schmelzkurven und einheitlichen Temperaturen der Schmelzmaxima bei ca. 80 °C für 5 mM  $\text{MgCl}_2$  (Daten nicht gezeigt) wurde im weiteren Verlauf trotz höherer Fluoreszenzwerte beim Einsatz von 3 mM  $\text{MgCl}_2$  ein finaler Reaktionsansatz mit 5 mM  $\text{MgCl}_2$  gewählt.





**Abbildung 40: Etablierung der MgCl<sub>2</sub>-Konzentration im Reaktionsansatz für die High Resolution Melting Analysis.** Gezeigt wurden die Schmelzkurven und -maxima für Reaktionsansätze mit den Primern für den SNP ATXN3 BP 669 und den drei MgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen 1,6 mM, 3 mM und 5 mM. Die Schmelzkurven suggerierten, dass die DNA-Amplifikation in der PCR für alle drei Konzentrationen erfolgreich war. Die Negativkontrolle ist in schwarzer Farbe dargestellt. Eine Konzentration von 1,6 mM erlaubte kein Genotyp-spezifisches Schmelzen der DNA (grün). Mit Konzentrationen von 3 mM und 5 mM MgCl<sub>2</sub> gelang jeweils ein Genotyp spezifisches Schmelzen der DNA (blau, rot). Bei gleicher Kurvenform wurden beim Einsatz von 3 mM MgCl<sub>2</sub> höhere Fluoreszenzwerte gemessen. Insgesamt präsentierten sich aber die Schmelzkurven für 5 mM MgCl<sub>2</sub> bezüglich der Kurvenform und der Temperatur des Schmelzmaximums im Kollektiv (Daten hier nicht gezeigt) einheitlicher.

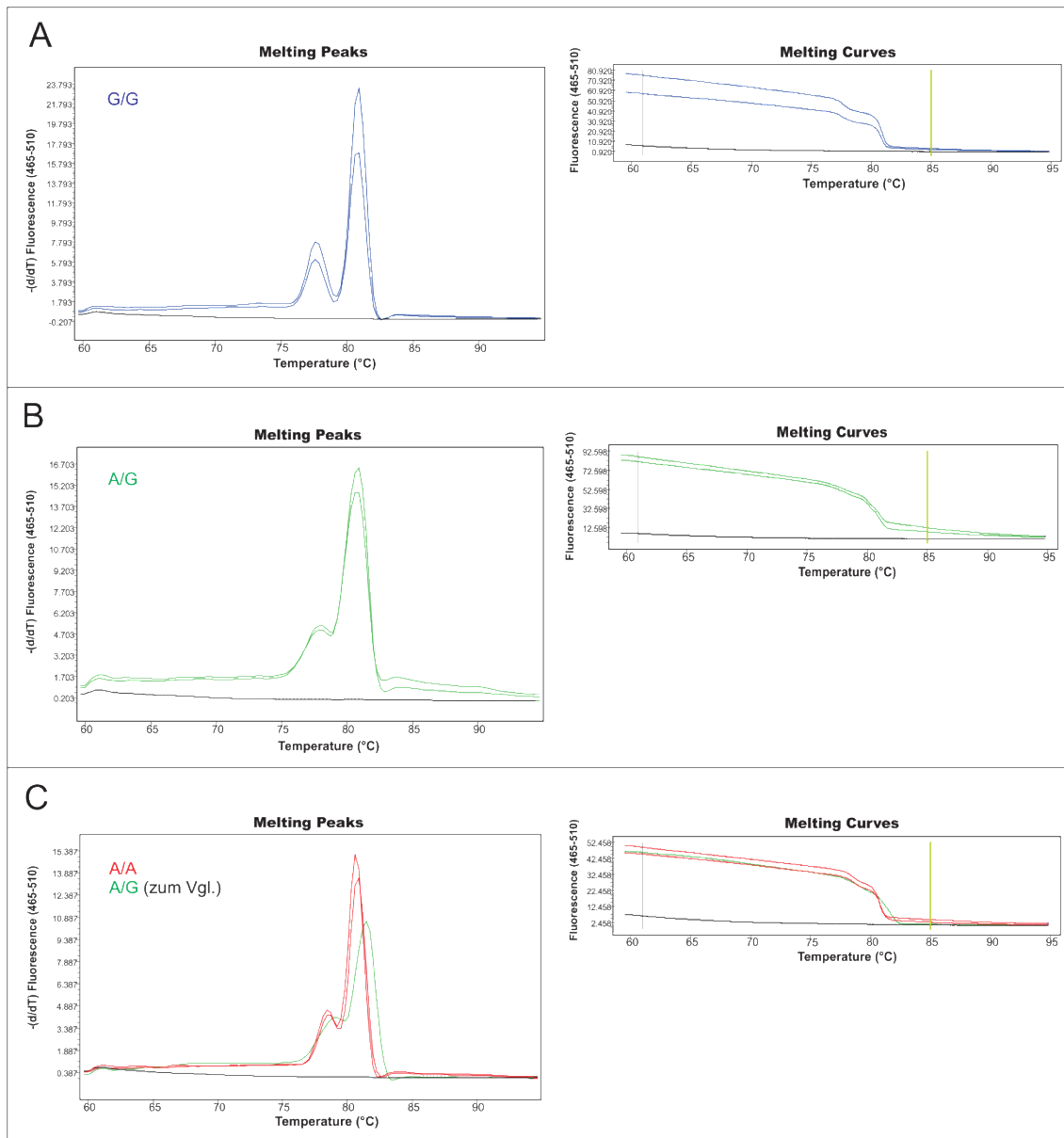
Um später bei Anwendung der Methode in hohem Durchsatz Reagenzien zu sparen, wurde in einem zweiten Experiment das Volumen des im Handbuch (LightCycler 480® High Resolution Melting Master (Version 07, September 2016)) vermerkten Reaktionsansatzes auf ein Volumen von 10 µl halbiert und das Ergebnis wiederum anhand der Form der Schmelzkurven evaluiert. Mit der Hälfte des Reaktionsansatzes konnten die gleichen Ergebnisse erzielt werden (Daten nicht gezeigt). Als Folge dieser ersten beiden Experimente ergab sich der in Tabelle 41 dargestellte Reaktionsansatz, der ein Gesamtvolumen von insgesamt 10 µl enthielt. Abweichend vom Handbuch wurde die DNA-Menge pro Probe auf 50 ng eingestellt, obwohl eine DNA-Menge von 5 - 30 ng empfoh-

len wurde. Dies ersparte bei Anwendung mit hohem Durchsatz später das Verdünnen vieler DNA-Proben und lieferte im Vergleich zu den Daten mit den empfohlenen DNA-Mengen ebenfalls einwandfrei auswertbare Schmelzkurven und -maxima.

**Tabelle 41: Reaktionsansatz der *High Resolution Melting Analysis* bei einer  $MgCl_2$ -Konzentration von 5 mM.**

<b>Reagenzien</b>	<b>Volumen [<math>\mu</math>l]</b>
<i>Light Cycler</i> ® 480 <i>High Resolution Melting Master Mix</i> , 2x konzentriert	5
Primer Mix, 20x konzentriert (4 $\mu$ M)	0,5
<i>Light Cycler</i> ® 480 <i>High Resolution Melting</i> $MgCl_2$ , 25 mM	1,5
<i>Light Cycler</i> ® 480 <i>High Resolution Melting</i> $H_2O$ , PCR-Grad	0,5
DNA (+ $H_2O$ PCR-Grad), 50 ng/ $\mu$ l	2,5

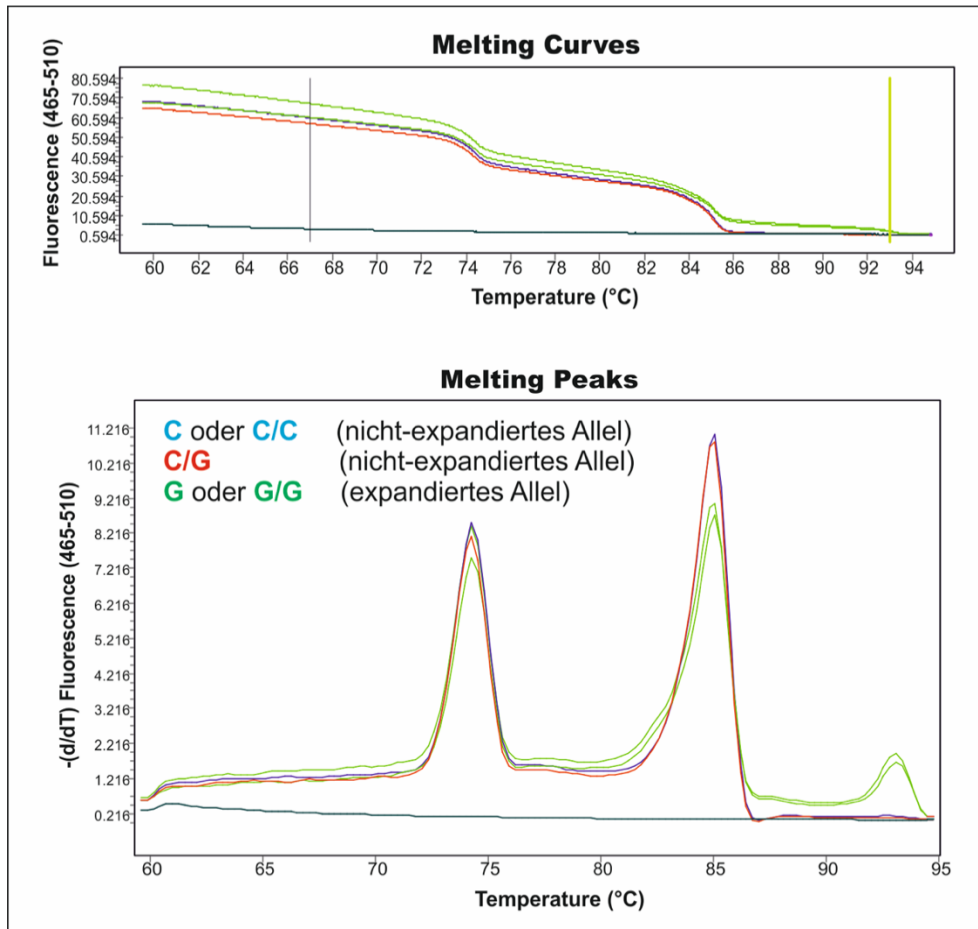
Um die einzelnen Schmelzkurven und -maxima einem SNP-Genotyp zuordnen zu können, wurde die Etablierung mit denjenigen ESMI-Proben durchgeführt, deren Genotyp bereits aus der Sequenzierung nach Sanger bekannt war. Die Etablierung wurde als erfolgreich gewertet, wenn eine gleiche Kurvenform zweier Proben in der HRMA auch denselben Genotyp nach Sanger erbracht hatte. Mit der Limitation, dass das PCR-Produkt für die HRMA maximal 300 bp lang sein durfte, war für den SNP ATXN3 BP 669 aufgrund der Position zum polyQ-Trakt des Gens leider keine allelspezifische SNP-Genotypisierung möglich. Es ergab sich damit die Unterscheidung zwischen drei möglichen Genotypen als Kombination aus zwei nicht-expandierten Allelen für Kontrollprobanden, aus einem nicht-expandiertem und einem expandiertem Allel für heterozygote Mutationsträger oder zwei expandierten Allelen für homozygote Mutationsträger: A/A, A/G, G/G. Die entsprechend etablierten Schmelzkurven und -maxima sind in Abbildung 41A-C dargestellt.



**Abbildung 41: Schmelzkurven und -maxima des Einzelnukleotidpolymorphismus SNP ATXN3 BP 669 in der High Resolution Melting Analysis.** A) Genotyp G/G. Der Schmelzvorgang begann bei 77 °C und endete bei ca. 83 °C. Die Kurve des Schmelzmaximums zeigte eine tiefe Einkerbung bei ca. 80 °C. B) Genotyp A/G. Die Kurve des Schmelzmaximums begann bei ca. 75 °C zu steigen. Bei 83 °C lag fast keine doppelsträngige DNA mehr vor. Im Schmelzmaximum zeigte sich eine leichte Einkerbung bei 78 °C. C) Genotyp A/A. Für den direkten Vergleich wurde in Grün der Genotyp A/G aufgetragen. Beide Schmelzmaxima unterschieden sich in der Steigung, wobei die Kurve für den Genotyp A/A steiler verlief. Obwohl die DNA für A/A später schmolz (ca. 77 °C), war der Schmelzvorgang früher beendet (ca. 82 °C). Die Negativkontrolle wurde in Schwarz eingezeichnet. A = Adenin, G = Guanin, BP = Basenpaar.

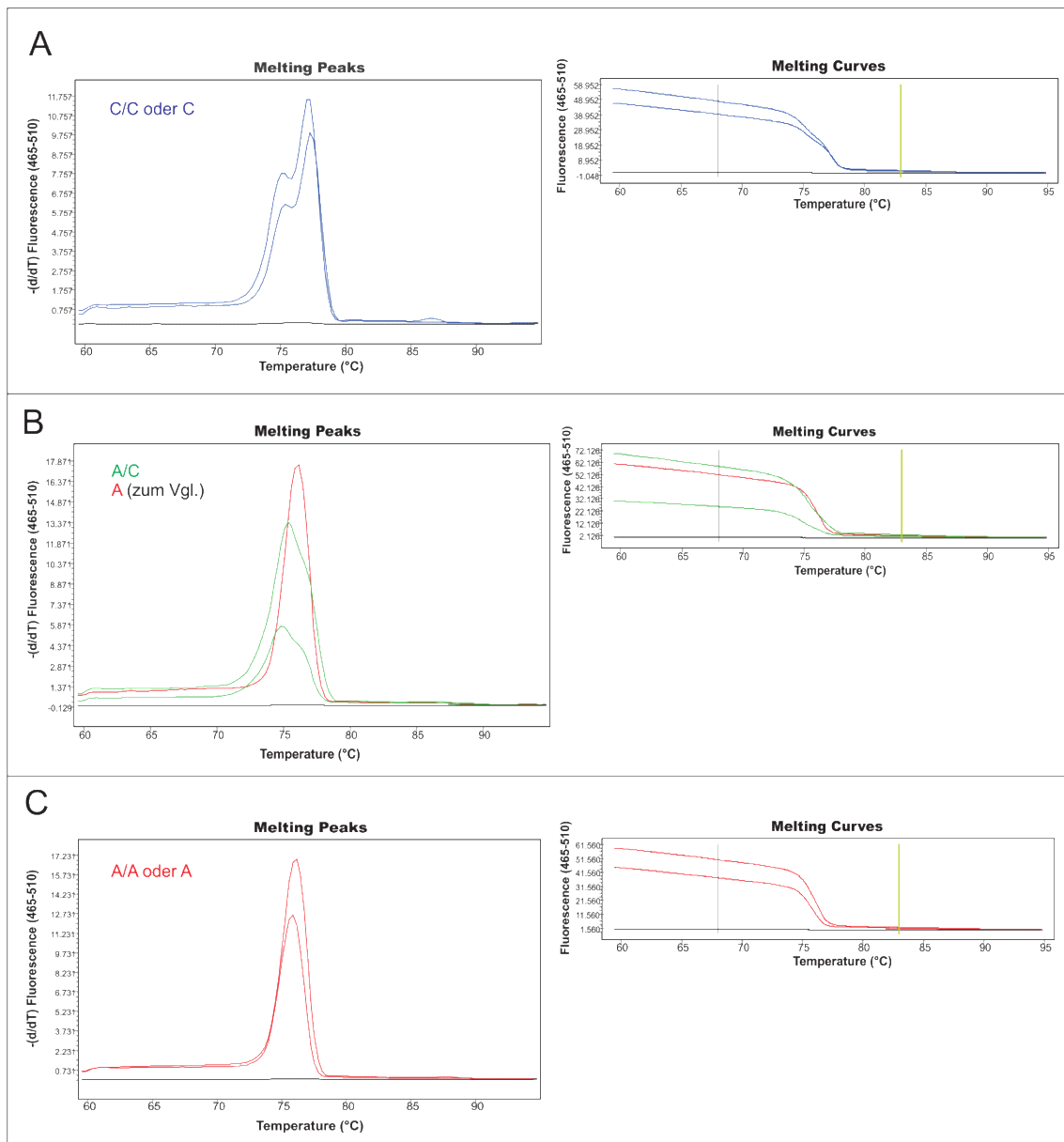
Aufgrund der örtlichen Nähe zu den CAG-Triplett-Wiederholungen in *ATXN3*, ergab sich für die SNPs ATXN3 BP 987 und ATXN3 BP 1118 die Möglichkeit einer allelspezifischen Genotypisierung. Dazu war im Vorfeld jedoch die Selektion des nicht-expandierten Allels und des expandierten Allels erforderlich. Dies wurde über die Durchführung einer vorbekannten PCR vor der HRMA garan-

tiert, in deren Primerzielsequenz beide SNPs einbezogen waren. Sowohl der Reaktionsansatz und die Thermozyklerbedingungen für diese PCR, als auch die Auftragung der PCR-Proben auf ein 1%iges Agarosegel und die Gelextraktion getrennt nach nicht-expandiertem und expandiertem Allel sind im Methodenteil unter 3.2.5.1 bereits beschrieben. Das aus dem Gel extrahierte allelspezifische PCR-Produkt wurde in den oben dargestellten Reaktionsansatz der HRMA mit dem dazu passenden Primerpaar (3.1.4) eingesetzt und analysiert. Für den SNP ATXN3 BP 987 war die Etablierung der HRMA zur Genotypisierung nicht erfolgreich. Es ist davon auszugehen, dass durch den in der Länge variierenden CAG-Trakt für den SNP ATXN3 BP 987 kein Genotypspezifisches PCR-Produkt generiert werden konnte. Bereits in der Schmelzkurvenanalyse wurden hier zwei Fluoreszenzabfälle beim Schmelzvorgang sichtbar, die sich in zwei hohen Schmelzmaxima bei ca. 75 °C und 85 °C widerspiegeln und sich für alle Proben jeglichen Genotyps gleich abbildeten. Unterschiede konnten lediglich zwischen expandierten und nicht-expandierten Allelen ausgemacht werden, wobei das expandierte Allel flächendeckend ein drittes, kleines Schmelzmaximum zwischen 90 und 95 °C aufwies (Abbildung 42).



**Abbildung 42: Schmelzkurven und -maxima des Einzelnukleotidpolymorphismus SNP ATXN3 BP 987 in der High Resolution Melting Analysis.** Die Etablierung der HRMA für diesen SNP gelang nicht. Alle möglichen Genotypen (C oder C/C, C/G, G oder G/G) zeigten die gleichen Formen für Schmelzkurven und -maxima mit zwei Fluoreszenzabfällen bei ca. 75 °C und 85 °C. Für expandierte Allele ergab sich ein weiteres, drittes Schmelzmaximum zwischen 90 und 95 °C. C = Cytosin, G = Guanin, BP = Basenpaar.

Der SNP ATXN3 BP 1118 konnte wiederum mittels HRMA etabliert und analysiert werden. Hierbei wurde zwischen der häufigeren Base C und der selteneren Base A an der Position des SNPs unterschieden. Für gesunde Kontrollprobanden und homozygote Mutationsträger konnte bei ähnlicher Allellänge nur eine Bande im Agarosegel extrahiert werden, worauf folglich in der HRMA nur eine gemeinsame Analyse beider Allele und damit drei Genotypen möglich waren: C/C, A/C oder A/A. Für die separate Extraktion von nicht-expandiertem und expandiertem Allel bei heterozygoten Mutationsträgern wurden in der HRMA beide Allele getrennt untersucht, wodurch eine allelspezifische Genotypisierung ermöglicht wurde. Die zwei möglichen Genotypen waren somit: C und A. In Abbildung 43 sind die für diesen SNP denkbaren Schmelzkurven und -maxima für jeden Genotyp dargestellt.



**Abbildung 43: Allelspezifische Schmelzkurven und -maxima des Einzelnukleotidpolymorphismus SNP ATXN3 BP 118 in der High Resolution Melting Analysis nach initialer PCR und Gelextraktion des allelspezifischen Genprodukts aus einem Agarosegel.** Für Kontrollprobanden und homozygote Mutationsträger wurden beide Allele gleichzeitig analysiert, wohingegen die Analyse des nicht-expandierten und expandierten Allels für heterozygote Mutationsträger getrennt stattfand. A) Genotyp C/C oder C. Beim Schmelzvorgang fiel die doppelstränge DNA-Menge bei ca. 75 °C stark ab, wobei bei 77 °C keine dsDNA mehr vorhanden war. Die Kurve des Schmelzmaximums wies eine leichte Einkerbung auf. B) Genotyp A/C. Die Kurve des Schmelzmaximums stieg zwischen 70 und 75 °C steil an und fiel dann zunächst flach ab. Der Schmelzvorgang war bei ca. 77 °C beendet. Zum direkten Vergleich wurden auch eine Kurve des Genotyps A/A aufgetragen. C) Genotyp A/A oder A. Der Schmelzhöhepunkt befand sich bei 75 °C. C = Cytosin, A = Adenin, BP = Basenpaar.

Tabelle 42 liefert einen Überblick der Ergebnisse zur Etablierung der HRMA für die drei im ATXN3-Gen untersuchten SNPs.

**Tabelle 42: Zusammenfassung der Etablierung der *High Resolution Melting Analysis* für drei SNPs im *ATXN3*-Gen.**

Etablierung		Ergebnisse
<b>MgCl<sub>2</sub> im Reaktionsansatz</b>		Beste Ergebnisse für 5 mM MgCl <sub>2</sub> .
<b>Reaktionsansatz</b>		Halbierung des Reaktionsansatzes auf 10 µl und Anpassung der DNA-Konzentration auf 50 ng/µl.
<b>ATXN3 BP 669</b>		Erfolgreiche Etablierung einer nicht-allelspezifischen Genotypisierung mit Differenzierung der Genotypen A/A, A/G und G/G anhand der Kurvenverläufe von Schmelzkurve und Schmelzmaxima.
<b>ATXN3 BP 987</b>		Keine Möglichkeit zur Differenzierung der verschiedenen Genotypen. Im Folgenden keine Analyse des SNPs mittels HRMA möglich.
<b>ATXN3 BP 1118</b>		Notwendigkeit einer initialen PCR und Extraktion des PCR-Produkts aus einem Agarosegel für Allelspezifität. Erfolgreiche Etablierung einer allelspezifischen Genotypisierung für heterozygote Mutationsträger mit Unterscheidung der Genotypen A und C. Für Kontrollprobanden oder homozygote Mutationsträger nicht-allelspezifische Genotypisierung mit Differenzierung der Genotypen A/A, A/C oder C/C.

### 4.3.2 Kohortenanalyse

Tabelle 43 liefert einen Überblick über insgesamt drei Kohorten für die statistische Analyse der drei untersuchten Einzelnukleotidpolymorphismen im Gen *ATXN3*. Dafür sind die SNPs mittels HRMA und Sanger-Sequenzierung im Vorfeld bestmöglich genotypisiert worden.

**Tabelle 43: Übersicht der Kohorte für die statistischen Analysen der Einzelnukleotidpolymorphismen im *ATXN3*-Gen.** G = Guanin, A = Adenin, C = Cytosin, T = Thymin, exp = expandiert.

Einzelnukleotid-Polymorphismus	Genotyp	Gesunde Kontrollprobanden	Heterozygote Mutationsträger	Homozygote Mutationsträger
<b>A<sup>669</sup>TG/G<sup>669</sup>TG</b> oder <b>ATXN3 BP 669</b>	Kohortenstärke	<b>56</b>	<b>166</b>	<b>2</b>
	G/G	33	38	0
	A/G	20	95	0
	A/A	3	33	2
<b>C<sup>987</sup>GG/G<sup>987</sup>GG</b> oder <b>ATXN3 BP 987</b>	Kohortenstärke	<b>13</b> (nicht-exp/nicht-exp)	<b>29</b> (nicht-exp/exp)	<b>1</b> (exp/exp)
	G/G	7	5	0
	G/C	5	14	1
	C/G		2	
	C/C	1	8	0

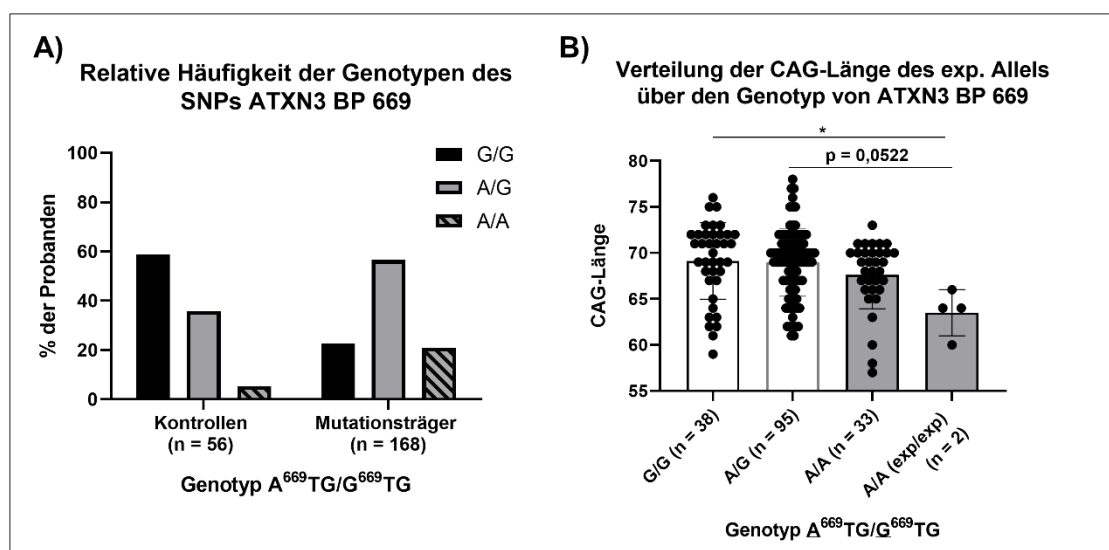
<b>TAA<sup>1118</sup>/TAC<sup>1118</sup> oder ATXN3 BP 1118</b>	Kohortenstärke	<b>30</b> (nicht-exp/nicht-exp)	<b>68</b> (nicht-exp/exp)	<b>1</b> (exp/exp)
	C/C	16	5	0
	C/A	10	39	0
	A/C	0	4	0
	A/A	4	20	1

Dr. med. dent. Gabriele Anna Kaucher und Annika Lambert analysierten bereits 37 (31 Mutationsträger, 6 Kontrollprobanden) Genotypen des SNPs ATXN3 669, 22 (16, Mutationsträger, 6 Kontrollprobanden) des SNPs ATXN3 BP 987 und 20 (15 Mutationsträger, 5 Kontrollprobanden) des SNPs ATXN3 BP 1118, während die übrigen Genotypisierungen im Rahmen der praktischen Laborarbeit für diese Promotion durchgeführt wurden.

Für die Analyse des SNPs ATXN3 BP 669 konnten insgesamt 56 Kontrollprobanden und 168 (prä-)symptomatische Mutationsträger, darunter 2 homozygote SCA3-Patienten, eingeschlossen werden. Dies entsprach nicht allen Studienprobanden aus ESMI. Für fünf Probanden war die Genotypisierung mittels Sequenzierung nach Sanger und HRMA nicht eindeutig gewesen, für sieben Probanden fehlten klinische Angaben und für fünf Probanden konnte in der CAG-Fragmentlängen-Analyse kein eindeutiges Ergebnis erzielt werden, so dass ein Einschluss in diese Kohorte bedauerlicherweise nicht möglich war. Bedauerlicherweise gelang für den SNP BP 669 keine allelspezifische Genotypisierung, weshalb für heterozygote Mutationsträger keine Zuordnung der Basen zu expandiertem und nicht-expandiertem Allel möglich war. Die relative Häufigkeitsverteilung in Abbildung 44A offenbarte für diese Kohorte, dass G/G unter den Kontrollprobanden den häufigsten Genotyp (61 %), A/A hingegen den seltensten Genotyp (3 %) darstellte. Unter den Mutationsträgern kam der Genotyp A/G anteilmäßig am häufigsten vor (57 %). Anteilmäßig bewegten sich die Genotypen A/A und G/G unter SCA3-Patienten mit 22 % und 21 % in ähnlicher Größenordnung. Auffallend war hier, dass beide homozygoten Patienten auf beiden expandierten Allelen die Genotyp-Variante mit der Base A aufwiesen. Bei der Untersuchung des Genotyps von heterozygoten Mutationsträgern mit der CAG-Länge des expandierten Allels (Abbildung 44B) ergaben sich mit dem Kruskal-Wallis-Test keine statistischen signifikanten Zusammenhänge.



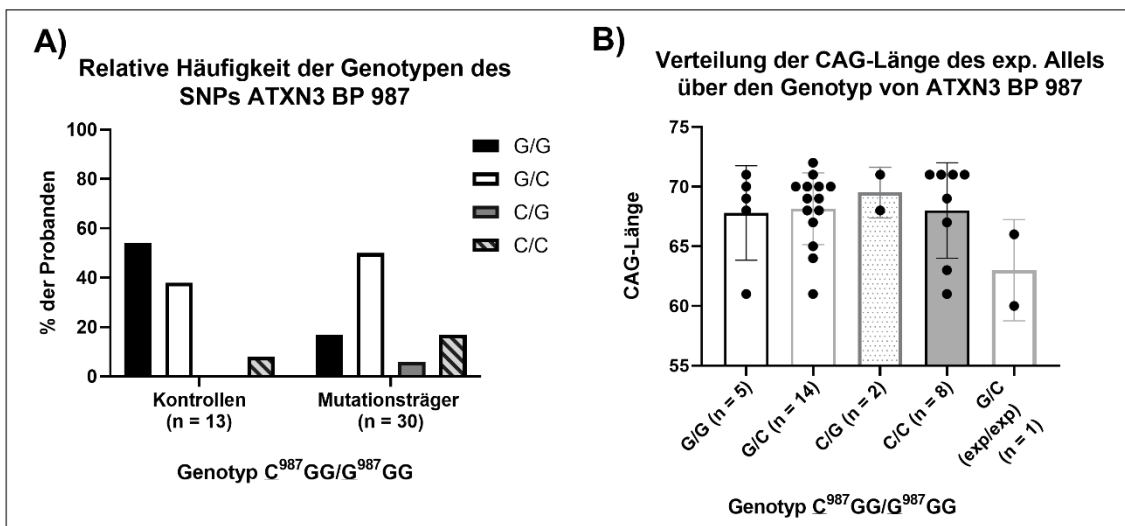
Tendenziell zeigten diejenigen Mutationsträger mit dem Genotyp G/G (Median: 70,5 CAGs; SD = +/- 4,17) jedoch mehr CAG-Triplets auf dem expandiertem Allel als Mutationsträger mit dem Genotyp A/G (Median: 69,0 CAGs; SD = +/- 3,6) und A/A (Median: 69,0 CAGs; IQA = 3,7). Die beiden homozygoten SCA3-Patienten wiesen mit 60/64 und 64/66 CAG-Triplets (Median: 64,0 CAGs; IQA = 4,5) auf den expandierten Allelen weniger Wiederholungen auf als die Mediane der expandierten CAG-Trakte der heterozygoten Mutationsträger jedes Genotyps. Für den Genotyp G/G der heterozygoten Mutationsträger war dieser CAG-Längenunterschied zu den homozygoten SCA3-Patienten sogar statistisch signifikant ( $p = 0,0284$ ), für den Genotyp A/G beinahe statistisch signifikant ( $p = 0,0522$ ). Zur Beurteilung der Aussagekraft der Ergebnisse sollte allerdings die kleine Gruppengröße der homozygoten Mutationsträger beachtet werden.



**Abbildung 44: Relative Häufigkeitsverteilung und statistische Analyse des SNPs ATXN3 BP 669.** A) Unter den Kontrollprobanden war der Genotyp G/G am häufigsten, während der Genotyp A/A nur selten vorkam. Bei den Mutationsträgern konnte am häufigsten der Genotyp A/G nachgewiesen werden. G/G und A/G kamen hier circa gleich häufig vor. B) Bei alleiniger Betrachtung des expandierten Allels der heterozygoten Mutationsträger ging der Genotyp G/G im Median mit dem längsten und A/A mit dem kürzesten CAG-Trakt einher. Die homozygoten Mutationsträger hatten im Verhältnis beide sehr kurze CAG-Trakte mit nur 60/64 und 64/66 CAG-Triplets. A = Adenin, G = Guanin, T = Thymin, CAG = Basensequenz für die Aminosäure Glutamin.

Die Genotypisierung für den SNP ATXN3 BP 987 am 3'-Ende des CAG-Trakts war für 13 Kontrollprobanden und 30 (prä-)symptomatische Mutationsträger erfolgreich. Unter letzteren befand sich auch ein homozygoter SCA3-Patient.

Diese recht niedrige Anzahl an analysierten Probanden lag empirisch an der Fehleranfälligkeit der PCR zur DNA-Amplifikation und an zu niedrigen DNA-Konzentration im Verlauf des Prozesses der Genotypisierung nach Sanger, so dass die SNP-Analyse im *CEQ<sup>TM</sup>8000 Genetic Analysis System* scheiterte. Gelingt die Genotypisierung, so war für heterozygote Mutationsträger eine allelspezifische Analyse der Genotypen möglich. Für Kontrollprobanden und homozygote Mutationsträger gelang diese differenzierte Analyse jedoch nicht allelspezifisch. In der relativen Häufigkeitsverteilung imponierte G/G als der häufigste Genotyp (54 %) unter den Kontrollprobanden, während C/C am seltensten (8 %) vorkam (Abbildung 45A).

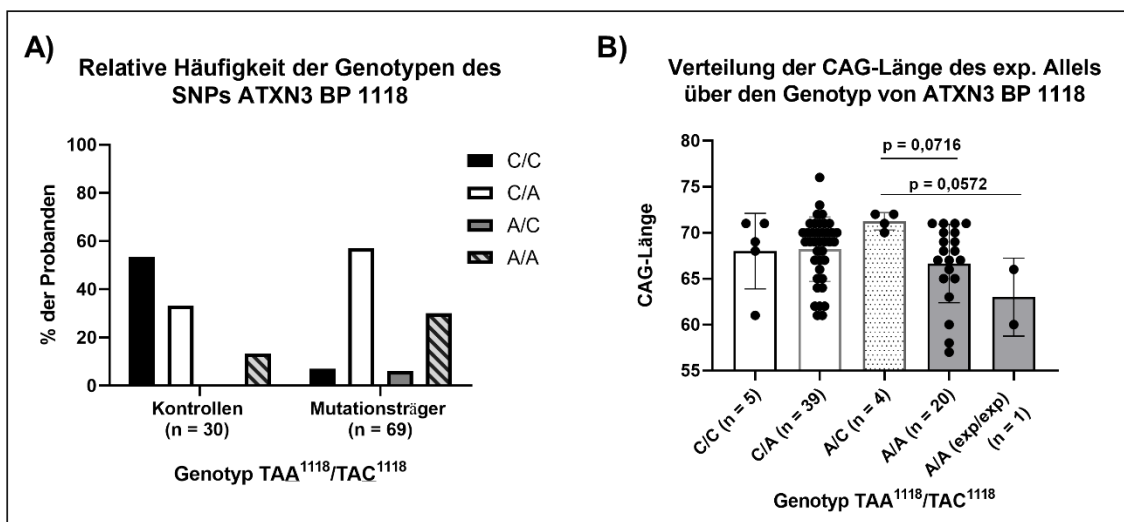


**Abbildung 45: Relative Häufigkeitsverteilung und statistische Analyse des SNPs ATXN3 BP 987.** A) Unter den Kontrollprobanden war der Genotyp G/G am häufigsten, während die heterozygoten Mutationsträger am häufigsten den Genotyp G/C zeigten. Der einzige homozygote SCA3-Patient wies ebenfalls den Genotyp G/C bzw. C/G auf. B) In der statistischen Analyse ging der Genotyp C/G tendenziell mit dem längsten CAG-Trakt einher. Die CAG-Trakte des homozygoten SCA3-Patienten waren mit 60 und 66 Glutaminen deutlich kürzer als die der heterozygoten Mutationsträger. Die Unterschiede in der CAG-Länge zwischen den Genotypen waren aber mit dem Kruskal-Wallis-Test nicht statistisch signifikant. G = Guanin, C = Cytosin, CAG = Basensequenz für die Aminosäure Glutamin.

Bei der nicht-allelspezifischen Analyse der Kontrollprobanden waren die Genotypen C/G und G/C nicht zu unterscheiden und wurden deshalb als G/C zusammengefasst. Dieser Genotyp machte 38 % der Kontrollprobanden aus. Unter den Mutationsträgern war der Genotyp G/C am häufigsten (50 %). Der einzige homozygote SCA3-Patient der Analysen wies ebenfalls den Genotyp G/C bzw. C/G auf. Sowohl der Genotyp G/G als auch C/C waren hier anteilmäßig mit 17 % gleich häufig. In der Verteilung der CAG-Länge des expandier-

ten Allels von Mutationsträgern über den Genotyp des Polymorphismus (Abbildung 45B) bildeten sich mit dem Kruskal-Wallis-Test keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen ab. Tendenziell ging der Genotyp C/G mit der größten CAG-Länge einher (Median: 68,5 CAGs; IQA = 3), wobei nur zwei Patienten mit diesem Genotyp eingeschlossen waren. Der homozygote SCA3-Patient (Median: 63 CAGs) zeigte im Verhältnis zu den heterozygoten Mutationsträgern einen kurzen CAG-Trakt auf beiden seiner expandierten Allele.

Für den dritten im *ATXN3*-Gen analysierten SNP konnten 30 Kontrollprobanden und 69 SCA3-Mutationsträger erfolgreich analysiert werden. Wie für den vorausgegangenen SNP gelang für heterozygote Mutationsträger eine allelspezifische Genotypisierung, während dies für Kontrollprobanden und homozygote SCA3-Patienten nicht möglich war, sodass die Genotypen C/A und A/C hier nicht zu differenzieren waren. Unter den Kontrollprobanden kam der Genotyp C/C am häufigsten (53 %) vor, der Genotyp A/A hingegen am seltensten (13,3 %) (Abbildung 46A).



**Abbildung 46: Relative Häufigkeitsverteilung und statistische Analyse des SNPs ATXN3 BP 1118.** A) Kontrollprobanden zeigten beim analysierten SNP am häufigsten den Genotyp C/C, die Mutationsträger den Genotyp C/A. Der homozygote SCA3-Patient zählte mit A/A zur zweithäufigsten Gruppe der Mutationsträger. B) Der Genotyp A/C ging beinahe statistisch signifikant mit dem längsten CAG-Trakt einher. Probanden mit dem Genotyp A/A zeigten tendenziell den kürzesten CAG-Trakt. C = Cytosin, A = Adenin, T = Thymin, CAG = Basensequenz für die Aminosäure Glutamin.

Im Gegensatz dazu war unter den heterozygoten Mutationsträgern der Genotyp C/A mit einem Anteil von 57 % am prominentesten. Danach folgte der Genotyp A/A (30 %), der auch dem einzigen homozygoten SCA3-Patienten dieser Analyse zuzuordnen war. Betrachtete man die Verteilung der CAG-Länge der SCA3-Patienten (Abbildung 46B) mit dem Kruskal-Wallis-Test über den Genotyp des SNPs, so fiel auf, dass der Genotyp A/C mit dem längsten CAG-Trakt aller Genotypen einherging (Median: 71,5 CAGs; SD = ± 0,96). Dies war gegenüber dem Genotyp A/A der heterozygoten Mutationsträger (Median: 67,5 CAGs; IQA = 5) und des homozygoten SCA3-Patienten (Median: 63 CAGs; IQA = 6) sogar beinahe statistisch signifikant ( $p = 0,0716$ ;  $p = 0,0572$ ).

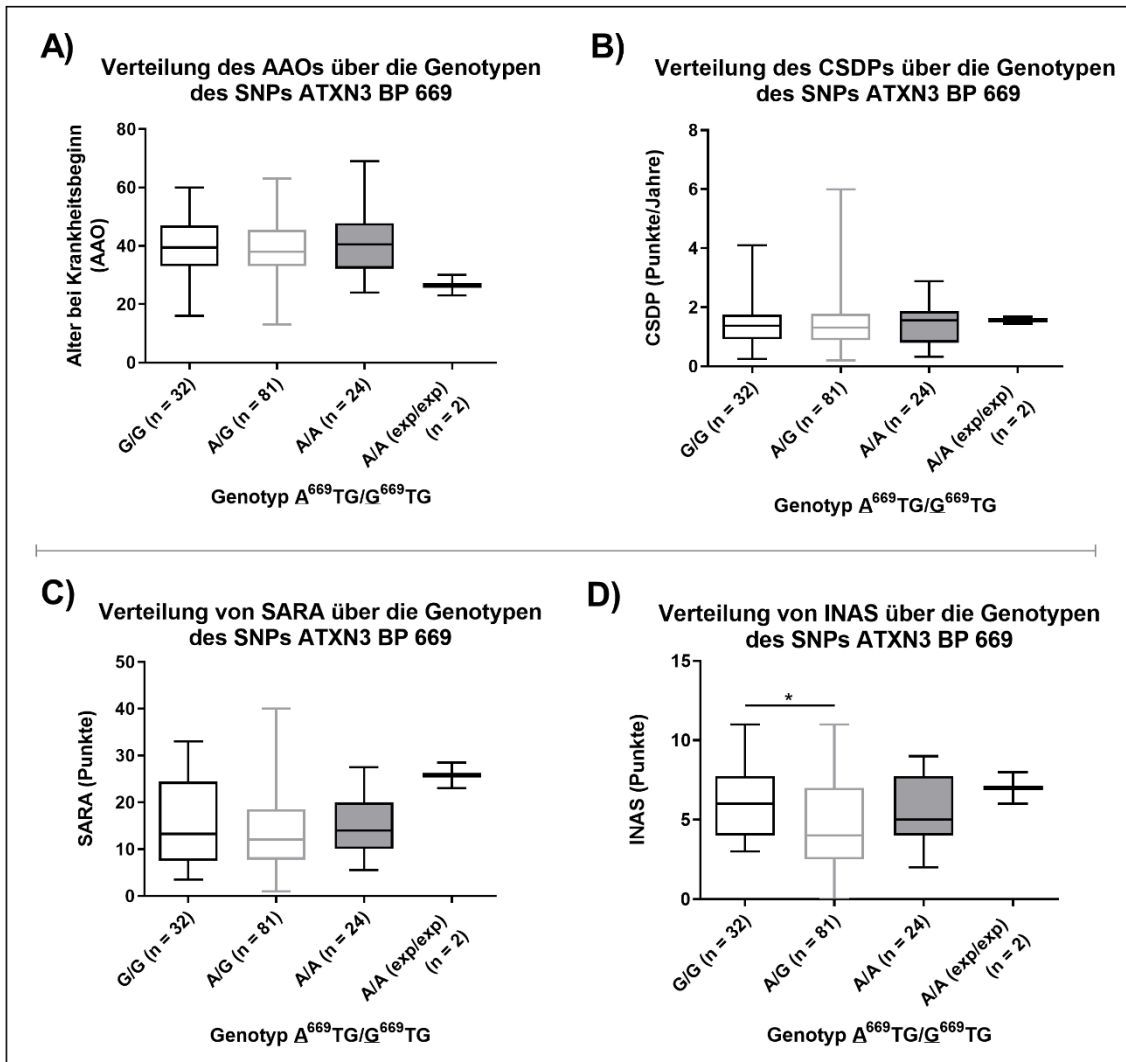
Tabelle 44 präsentiert eine Übersicht der Ergebnisse der Kohortenanalyse für die drei SNPs im *ATXN3*-Gen.

**Tabelle 44: Zusammenfassung der Kohortenanalyse für drei SNPs im *ATXN3*-Gen.** SNP = Einzelnukleotidpolymorphismus, G = Guanin, A = Adenin, C = Cytosin, T = Thymin, CAG = Basensequenz für die Aminosäure Glutamin.

Einzelnukleotid-polymorphismus	Relative Häufigkeit des SNPs		Verteilung der CAG-Länge	
	Kontrollprobanden	SCA3-Patienten	Kontrollprobanden	SCA3-Patienten
<b>ATXN3 BP 669</b>	häufigster Genotyp G/G	häufigster Genotyp A/G, homozygoter SCA3-Patient mit Genotyp A/A	Genotyp A/A des homozygoten SCA3-Patienten statistisch signifikant kürzere CAG-Länge als G/G und A/G der heterozygoten Mutationsträger;	tendenziell Genotyp G/G mit dem längsten CAG-Trakt.
<b>ATXN3 BP 987</b>	häufigster Genotyp G/G	häufigster Genotyp G/C, homozygoter SCA3-Patient mit Genotyp G/C bzw. C/G	Genotyp C/G tendenziell mit der größten CAG-Länge;	homozygoter SCA3-Patient mit deutlich kürzeren CAG-Trakten auf beiden expandierten Allelen.
<b>ATXN3 BP 1118</b>	häufigster Genotyp C/C	häufigster Genotyp C/A; homozygoter SCA3-Patient mit Genotyp A/A	Genotyp A/C mit der größten CAG-Länge und tendenziell längerem CAG-Trakt als Mutationsträger mit dem Genotyp A/A;	homozygoter SCA3-Patient mit deutlich kürzeren CAG-Trakten auf beiden expandierten Allelen.

### 4.3.3 Statistische Analyse des Genotyps und klinischer Parameter

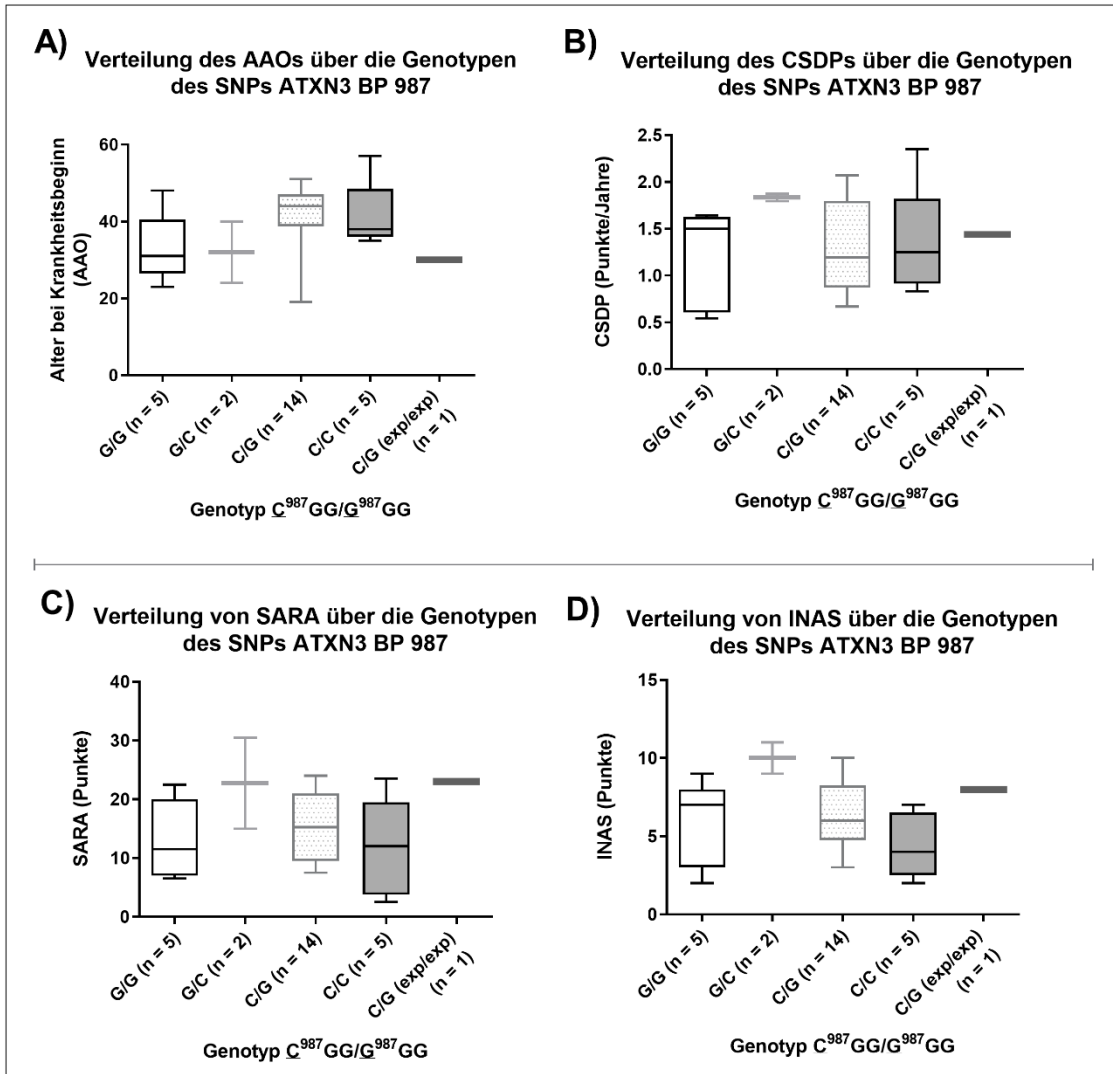
Die statistischen Analysen des Genotyps des SNPs ATXN3 BP 669 mit klinischen Parametern wurden für insgesamt 139 Mutationsträger im symptomatischen Stadium mittels Kruskal-Wallis-Test durchgeführt und die Ergebnisse im Folgenden dargestellt (Abbildung 47). Betrachtete man zunächst das Alter bei Krankheitsbeginn (AAO) waren zwischen den heterozygoten Mutationsträgern verschiedener Genotypen keine statistisch signifikanten Unterschiede zu erkennen (Abbildung 47A). Bei gleichem Genotyp A/A erkrankten homozygote SCA3-Patienten (Median: 26,5 Jahre; IQA = 7) wesentlich früher im Leben als die entsprechenden heterozygoten SCA3-Patienten (Median: 40,5 Jahre; SD =  $\pm 10,49$ ). Unter dem Gesichtspunkt der Schwere der ataktischen Symptome waren die heterozygoten Mutationsträger zum Zeitpunkt der Erstvorstellung im Rahmen von ESMI unabhängig vom Genotyp des SNPs ATXN3 BP 669 mit einem medianem SARA von 14 Punkten ähnlich schwer erkrankt (Abbildung 47C). Die beiden homozygoten SCA3-Patienten zeigten hingegen eine ausgeprägtere ataktische Symptomatik mit einem medianen SARA von 25,75 Punkten. Wurde der entsprechende SARA-Punktwert in Form des CSDPs auf die bereits erkrankte Zeit nivelliert, ergab sich für alle heterozygoten Mutationsträger eine ähnlich rapide Krankheitsprogression von ca. 1,4 SARA-Punkten/Jahr. Interessant war, dass die homozygoten SCA3-Patienten zwar deutlich früher als die entsprechenden heterozygoten Mutationsträger mit dem Genotyp A/A erkrankten, der Median der Krankheitsprogression jedoch den gleichen CSDP-Wert lieferte (Median: 1,56 SARA-Punkte/Jahr) (Abbildung 47B). Bei den Analysen des INAS ergab sich, dass Mutationsträger mit dem Genotyp G/G statistisch signifikant verstärkt nicht-ataktische Symptome zeigten als diejenigen Mutationsträger mit dem Genotyp A/G ( $p = 0,0282$ ) (Abbildung 47D). Die homozygoten SCA3-Patienten waren gemessen am INAS tendenziell stärker betroffen als die heterozygoten Mutationsträger des gleichen Genotyps.



**Abbildung 47: Statistische Analyse des SNPs ATXN3 BP 669 mit klinischen Parametern.** A), B) Alle Gruppen der heterozyoten SCA3-Patienten zeigten ein ähnliches Erkrankungsalter und Krankheitsprogression. C), D) Bezüglich der Symptomatik waren mit ca. 14 SARA-Punkten in allen drei Gruppen keine Unterschiede zwischen den Genotypen auszumachen, während beim INAS die Gruppe mit dem Genotyp G/G nach Kruskal-Wallis-Test statistisch signifikant höhere Werte präsentierte als die Gruppe mit dem Genotyp A/G. Die Patienten mit heterozyoten Genotyp des SNPs erkrankten später als diejenigen mit homozygotem Genotyp. Die Symptomatik schritt aber im Folgenden nicht schneller voran. Die SARA- und INAS-Werte fielen bei den homozygoten SCA3-Patienten deutlich höher aus, aber auch dieser Unterschied war nicht von statistischer Signifikanz. AAO = Alter bei Krankheitsbeginn, CSDP = Cross-sectional annual disease progression, SARA = Scale for the Assessment and Rating of Ataxia, INAS = Inventory of Non-Ataxia Symptoms, G= Guanin, A = Adenin.

Auch für den SNP ATXN3 BP 987 (Abbildung 48A) wurden wie für den zuvor analysierten Polymorphismus keine statistisch signifikanten Unterschiede im Krankheitsbeginn zwischen den Genotypen G/G, G/C, C/G und C/C der heterozyoten Mutationsträger und C/G bzw. G/C des homozygoten Mutationsträgers gefunden. Auffallend war dennoch die Tendenz der Genotypen C/G (Median: 44,0 Jahre; IQA = 8,25) und C/C (Median: 38,0 Jahre; IQA 12,5) erst später im

Leben zu erkranken. Interessanterweise zeigten eben diese Gruppen im Median, passend zu den insgesamt niedrigeren SARA- und INAS-Werten (Abbildung 48C, D) zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung im Rahmen von ESMI im Vergleich zu den anderen Genotypen, die langsamste Krankheitsprogression (Abbildung 48B). Die zwei heterozygoten Mutationsträger mit dem Genotyp G/C waren hingegen recht früh im Leben erkrankt. Dieser Genotyp ging zusätzlich mit einer raschen medianen Krankheitsprogression von 1,83 SARA-Punkten pro Jahr einher. Beide Probanden waren zum Zeitpunkt der Untersuchung in ESMI die am schwersten erkrankten Patienten in der rekrutierten Kohorte (SARA: Median: 22,75 Punkte; IQA = 15,5; INAS: Median: 10,0 Punkte; IQA = 2). Der einzig homozygote SCA3-Patient mit dem Genotyp C/G bzw. G/C erkrankte mit nur 30 Lebensjahren ebenfalls früh im Leben. Mit einer eher zügigeren Krankheitsprogression von 1,4 SARA-Punkten pro Jahr zeigte er zum Zeitpunkt der Untersuchung bereits deutlich ataktische (SARA: 23 Punkte) und nicht-ataktische (INAS: 8 Punkte) Symptome. Mit der kleinen Probandenzahl konnten hier mit dem Kruskal-Wallis-Test jeweils nur Tendenzen abgebildet werden, nicht jedoch statistisch signifikante Ergebnisse.

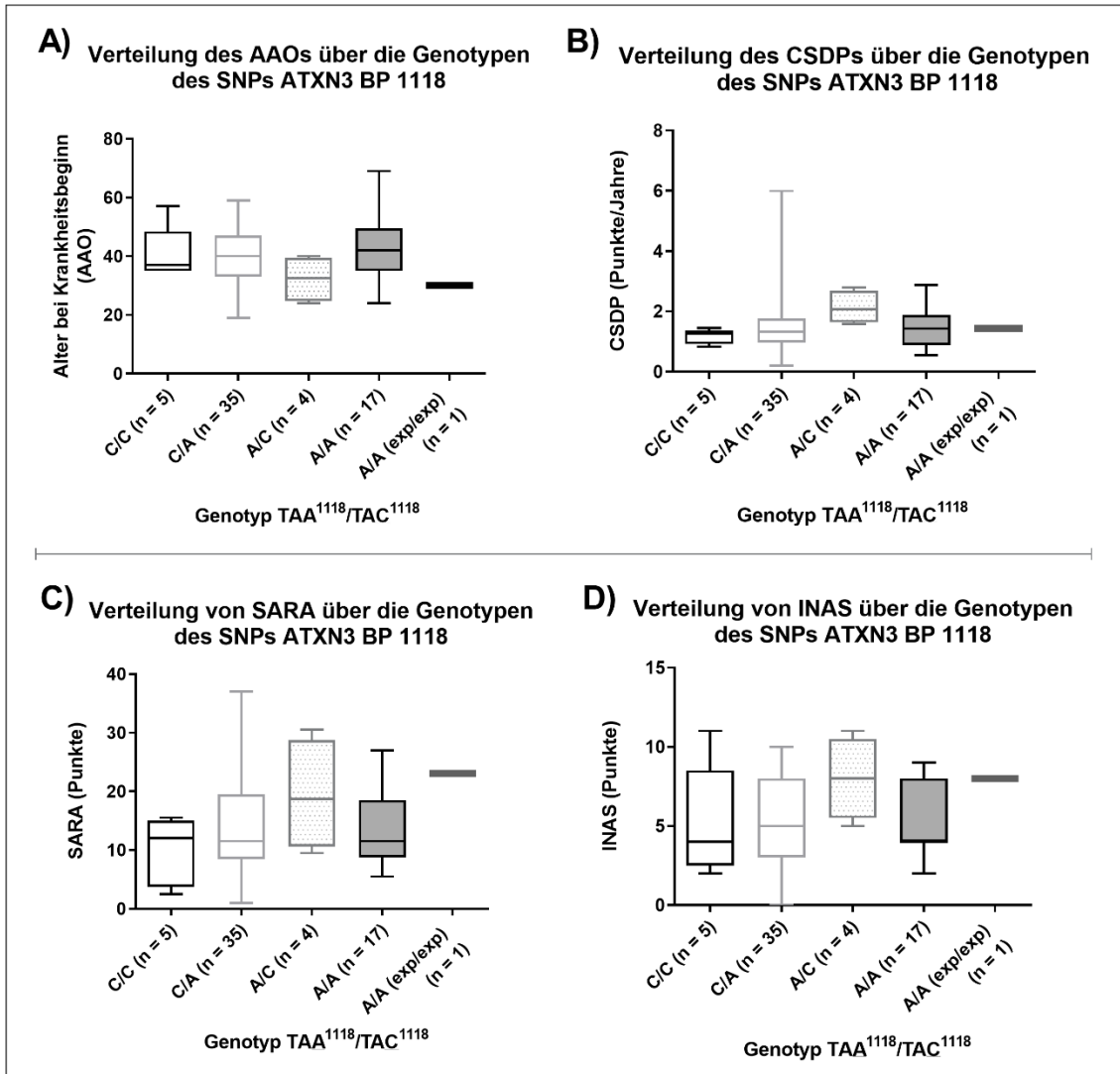


**Abbildung 48: Statistische Analyse des SNPs ATXN3 BP 987 mit klinischen Parametern.** A)-D) Unter den heterozygoten Mutationsträgern bildeten sich die Genotypen C/G und C/C mit dem spätesten Krankheitsbeginn, im Folgenden mit der langsamsten Krankheitsprogression und im Vergleich mit niedrigen SARA- und INAS-Punktwerten ab. Die Genotypen G/G und G/C hingegen präsentierten sich ähnlich wie der einzige homozygote Mutationsträger mit frühem Krankheitsbeginn mit ca. 30 Jahren, einer schnellen Krankheitsprogression von ca. 1,8 bzw. 1,4 SARA-Punkten/Jahr und zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung in ESMI gemessen am Punktwert der klinischen Bewertungssysteme mit fortgeschrittener Symptomatik. Mittels Kruskal-Wallis-Test zeigten sich diese Beobachtungen nicht statistisch signifikant. AAO = Alter bei Krankheitsbeginn, CSDP = *Cross-sectional annual disease progression*, SARA = *Scale for the Assessment and Rating of Ataxia*, INAS = *Inventory of Non-Ataxia Symptoms*, G = Guanin, C = Cytosin.

Die Kohorte für die statistischen Analysen des Genotyps des SNPs ATXN3 BP 1118 mit klinischen Parametern umfasste 69 Mutationsträger. Unter den heterozygoten Mutationsträgern waren es bei diesem SNP die vier Probanden mit dem Genotyp A/C, die am frühesten (Median: 32,5 Jahre; SD = ± 7,93) erkrankten (Abbildung 49A) und bei denen die Krankheitssymptomatik am zügigsten voranschritt (CSDP Median: 2,07 SARA-Punkte/Jahr; IQA = 1,05) (Abbildung



49B). Betrachtete man die Genotypen C/C, C/A und A/A der heterozygoten Mutationsträger ergab sich für alle drei Gruppen ein ähnliches, späteres medianes Erkrankungsalter von ca. 40 Jahren. Auch im Median des CSDP, SARA oder INAS waren hier kaum Unterschiede zwischen diesen Genotypen auszumachen, wobei die Probanden relativ einheitlich eine langsamere Krankheitsprogression zeigten als der Genotyp A/C und sich zur Erstuntersuchung im Rahmen von ESMI in ähnlichem Symptomstatus befanden. Trotzdem muss erwähnt werden, dass innerhalb der Genotyp-Gruppe C/A eine große Streuung vor allem der CSDP- und SARA-Werte aufgefallen war. So hatte ein Proband mit einer SARA-Punktzahl von 12 Punkten eine auffallend schnelle Krankheitsprogression von 6 SARA-Punkten pro Jahr gezeigt, wohingegen ein anderer in der Untersuchung eine SARA-Punktzahl von 37 Punkte erreichte, aber bereits 24 Jahre erkrankt war und damit ein niedrigen CSDP aufwies. Homozygotie im expandierten *ATXN3*-Gen prädisponierte im Gegensatz zu heterozygoten Mutationsträgern bei gleichem Genotyp A/A zu sehr frühem Krankheitsbeginn (hier 30 Jahre). Bei der Krankheitsprogression bildete sich im Folgenden jedoch kein Unterschied zu den entsprechend heterozygoten Mutationsträgern ab. Zum Zeitpunkt seiner Untersuchung in ESMI war der homozygote Mutationsträger am SARA und INAS gemessen jedoch schwerer erkrankt. Bei ebenfalls kleiner Kohortengröße galt für diesen SNP die Tatsache, dass mittels Kruskal-Wallis-Test jeweils nur Tendenzen abgebildet, jedoch keine statistisch signifikanten Ergebnisse erzielt wurden.



**Abbildung 49: Statistische Analyse des SNPs ATXN3 BP 1118 mit klinischen Parametern.** A)-D) Unter den heterozygoten Mutationsträgern erkrankten Patienten mit dem Genotyp A/C am frühesten mit folgender zügiger Krankheitsprogression mit ca. 2,07 SARA-Punkten/Jahr und ausgeprägtester Symptomatik bei Erstuntersuchung im Rahmen von ESMI. Der homozygote SCA3-Patient erkrankte ähnlich früh wie die heterozygoten Mutationsträger des Genotyps A/C, seine Krankheitsprogression war hingegen vergleichbar mit denen der heterozygoten Mutationsträger der Genotypen C/C, C/A und A/A. Mittels Kruskal-Wallis-Test waren diese Beobachtungen nicht statistisch signifikant. AAO = Alter bei Krankheitsbeginn, CSDP = *Cross-sectional annual disease progression*, SARA = *Scale for the Assessment and Rating of Ataxia*, INAS = *Inventory of Non-Ataxia Symptoms*, A= Adenin, C = Cytosin.

Tabelle 45 präsentiert einen Überblick über die Ergebnisse zur Korrelation der SNP-Genotypen mit klinischen Parametern.

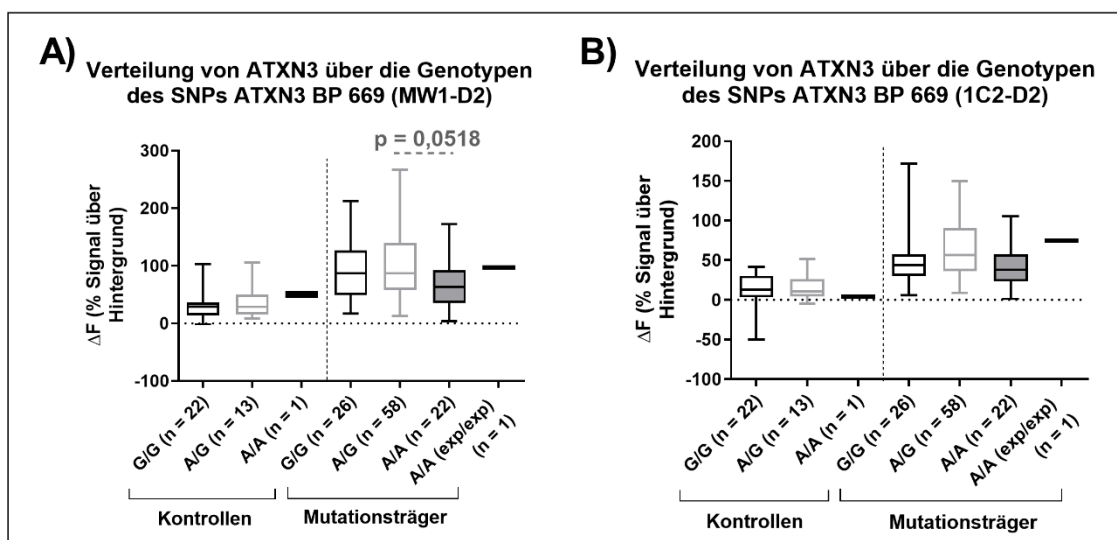
**Tabelle 45: Zusammenfassung der klinischen Parameter für drei SNPs im ATXN3-Gen.** G = Guanin, A = Adenin, C = Cytosin, T = Thymin, AAO = *Age at onset*, CSDP = *Cross-sectional annual disease progression*, SARA = *Scale of the Assessment of Rating of Ataxia*, INAS = *Inventory of Non-Ataxia Symptoms*.

SNP	AAO, CSDP, SARA, INAS
<b>ATXN3 BP 669</b>	Keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen dem AAO, CSDP und SARA der Genotypen G/G, A/G und A/A. Bei der Erstuntersuchung in ESMI G/G mit statistisch signifikant höherer INAS-Punktzahl als A/G (p = 0,0282). Homozygote SCA3-Patienten mit deutlich früherem Krankheitsbeginn bei gleichem Genotyp A/A wie die heterozygoten Mutationsträger, dennoch ähnlicher CSDP.
<b>ATXN3 BP 987</b>	Keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen G/G, G/C, C/G und C/C. SCA3-Patienten mit G/C zeigten einen frühen Krankheitsbeginn mit hohem CSDP. Probanden mit Genotyp C/G und G/G erkrankten tendenziell spät im Leben mit im Folgenden langsamer Krankheitsprogression.
<b>ATXN3 BP 1118</b>	Keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen C/C, C/A, A/C und A/A. SCA3-Patienten mit A/C tendenziell mit frühestem AAO und schnellster Krankheitsprogression. Homozygote SCA3-Patienten mit deutlich früherem Krankheitsbeginn bei gleichem Genotyp A/A wie die heterozygoten Mutationsträger, dennoch ähnlicher CSDP.

#### 4.3.4 Statistische Analyse der Genotypen und des ATXN3-Proteinlevels

In einem nächsten Schritt wurden die ATXN3-Proteinlevel von Kontrollprobanden und (prä-)symptomatischen, heterozygoten und homozygoten Mutationsträgern, aufgeschlüsselt nach dem vorliegenden Genotyp des SNPs ATXN3 BP 669, analysiert (Abbildung 50). Für diese Kohorte waren die ATXN3-Proteinlevel von insgesamt 36 Kontrollprobanden und 107 Mutationsträgern erfolgreich bestimmt worden. Da wie in 4.3.4 gezeigt, sowohl mittels Nutzung des MW1-D2 als auch des 1C2-D2 Assays nicht zwischen präsymptomatischen und symptomatischen SCA3-Mutationsträgern unterschieden werden konnten, wurden diese im Folgenden als eine gemeinsame Kohorte den Kontrollprobanden gegenübergestellt. Wie zu erwarten war, konnte im Allgemeinen ein statistisch signifikanter Unterschied im ATXN3-Proteinlevel zwischen Kontrollprobanden und Mutationsträgern der Genotypen G/G und A/G nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Für den Kontrollprobanden mit dem Genotyp A/A, war dies nicht der Fall, wobei hier auf die Tatsache verwiesen werden sollte, dass nur ein Kontrollproband überhaupt diesen Genotyp aufwies. Innerhalb der Mutationsträger erbrachte der Genotyp A/G für beide Antikörper-

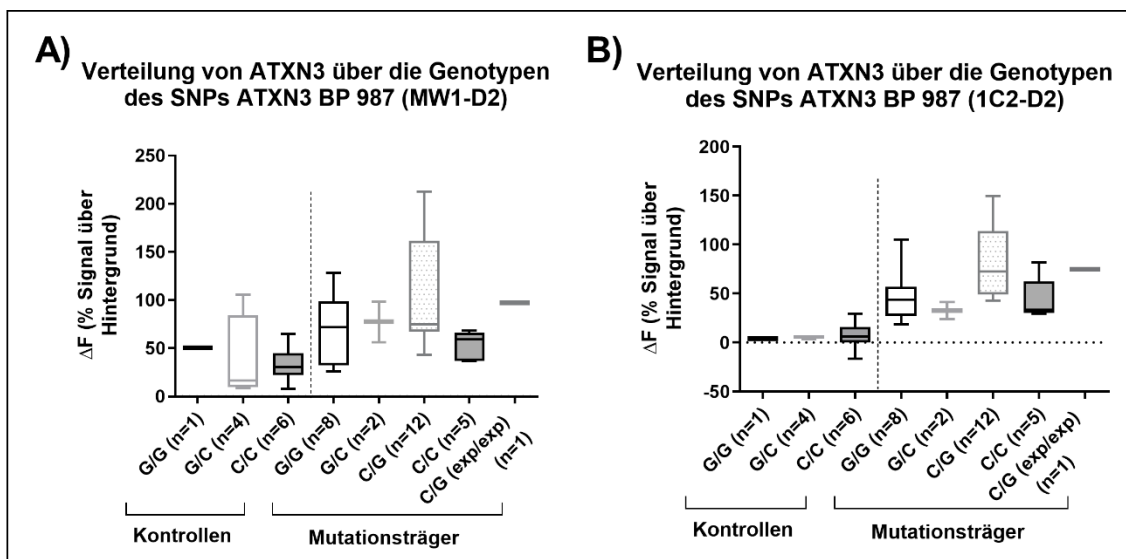
Assays tendenziell ein erhöhtes ATXN3-Proteinlevel, dies war aber im Kruskal-Wallis-Test mit korrigierten p-Werten nicht statistisch signifikant. Analysierte man für den MW1-D2 Assay die Mutationsträger mittels Kruskal-Wallis-Test gesondert, waren die ATXN3-Proteinlevel der Mutationsträger mit dem Genotyp A/G beinahe statistisch signifikant höher als die der Mutationsträger mit dem Genotyp A/A ( $p = 0,0518$ ; gestrichelte Linie) (Abbildung 50A). Im 1C2-Assay war dieser Unterschied im ATXN3-Proteinlevel zwischen den Genotypen mit einem Signifikanzwert von  $p = 0,1147$  ebenfalls nicht statistisch signifikant (Abbildung 50B). Der homozygote SCA3-Patient präsentierte in beiden Assays höhere ATXN3-Proteinlevel (MW1: 96,9; 1C2: 74,7) als die heterozygoten Mutationsträger mit äquivalentem Genotyp (MW1: Median: 63,6; SD =  $\pm 39,1$ ; 1C2: Median: 38,2; SD =  $\pm 26,88$ ).



**Abbildung 50: Statistische Analyse des SNPs ATXN3 BP 669 und der ATXN3-Proteinlevel von Mutationsträgern und Kontrollprobanden im MW1-D2 und 1C2-D2 Assay.** A), B) In beiden Assays waren mittels Kruskal-Wallis-Test die ATXN3-Proteinlevel der Kontrollprobanden der Genotypen G/G und A/G statistisch signifikant niedriger als die der entsprechenden Mutationsträger, welche sowohl heterozygote als auch homozygote Mutationsträger unabhängig vom Symptomstatus eingeschlossen (Daten nicht gezeigt). Unter den Mutationsträgern, war der Genotyp A/G im MW1-Assay beinahe statistisch signifikant mit höheren ATXN3-Proteinleveln assoziiert als der Genotyp A/A, im 1C2-Assay konnte diese Tendenz ebenfalls beobachtet werden. Für den einzigen homozygoten SCA3-Patienten war ein erheblich höheres ATXN3-Proteinlevel bestimmt worden, als für die entsprechend heterozygoten Mutationsträger mit demselben Genotyp. A = Adenin, G = Guanin.

Die Kohorte für die Analysen des SNPs ATXN3 BP 987 (Abbildung 51) umfasst elf Kontrollprobanden und 28 Mutationsträger, darunter auch ein homozygoter Mutationsträger mit dem Genotyp C/G bzw. G/C. In beiden Assays waren mittels Kruskal-Wallis-Test im Allgemeinen die ATXN3-Proteinlevel für die Mu-

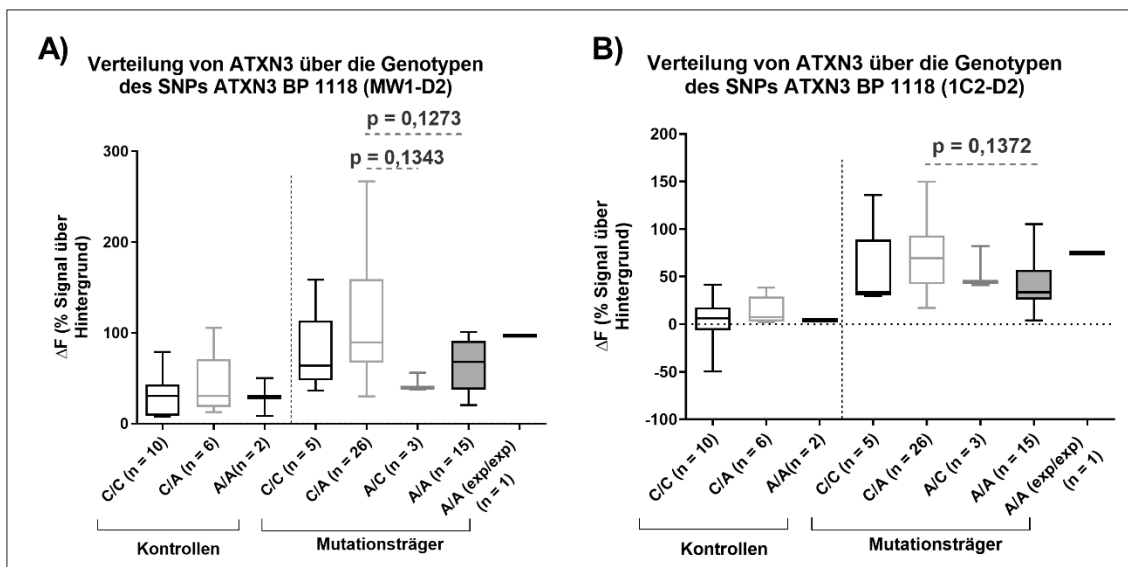
tationsträger höher als die der Kontrollprobanden (4.1.3). Besonders die Mutationsträger mit dem Genotyp C/G stachen mit den höchsten ATXN3-Proteinleveln unter den Mutationsträgern heraus. Allerdings war innerhalb dieser Gruppe auch eine große Streuung der ATXN3-Proteinlevel zu verzeichnen. Im MW1-D2-Assay waren bei ausschließlicher Betrachtung der Mutationsträger die ATXN3-Proteinlevel des Genotyps C/G im Median (Median: 74,7; SD =  $\pm 57,03$ ) letztendlich aber ähnlich hoch wie die der Genotypen G/G (Median: 71,7; SD =  $\pm 36,41$ ) und G/C (Median: 77,3; IQA = 42,2) (Abbildung 51A). Der homozygote SCA3-Patient mit dem Genotyp C/G bzw. G/C zeigte im 1C2-Assay ein ähnlich hohes ATXN3-Proteinlevel wie der Median der heterozygoten Mutationsträger mit dem Genotyp C/G (Abbildung 51B), während das ATXN3-Proteinlevel im MW1-D2-Assay für den homozygoten SCA3-Patienten tendenziell höher ausfiel.



**Abbildung 51: Statistische Analyse des SNPs ATXN3 BP 987 und der ATXN3-Proteinlevel von Mutationsträgern und Kontrollprobanden im MW1-D2 und 1C2-D2 Assay.** A), B) Mittels Kruskal-Wallis-Test waren innerhalb der Mutationsträger keine statistisch signifikanten Unterschiede feststellbar. Trotzdem schien der Genotyp C/G vor allem im 1C2-Assay mit tendenziell höheren ATXN3-Proteinleveln assoziiert zu sein. Der homozygote SCA3-Patient mit dem Genotyp C/G bzw. G/C zeigte in eben diesem Assay ähnlich hohe ATXN3-Proteinlevel wie der entsprechend heterozygote Mutationsträger. G = Guanin, C = Cytosin.

Im Vorfeld zu den statistischen Analysen des SNPs ATXN3 BP 1118 lagen für 18 Kontrollprobanden und 50 (prä-)symptomatische Mutationsträger, unter ihnen ein homozygoter SCA3-Patient, gleichzeitig die genetische Analyse des Genotyps und das mittels TR-FRET bestimmte ATXN3-Proteinlevel vor. Die

Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests sind in Abbildung 52 dargestellt. Von Interesse war vor allem die Tendenz des Genotyps C/A unter den heterozygoten Mutationsträgern zu höheren ATXN3-Proteinleveln. Zwar erreichte dies im MW1-D2 Assay keine Signifikanz, trotzdem war der Unterschied im ATXN3-Proteinlevel zum Genotyp A/C nur zu 13,43 %, zum Genotyp A/A nur zu 12,73 % per Zufall entstanden (gestrichelte Linien) (Abbildung 52A). Ähnliches konnte auch im 1C2-D2 Assay reproduziert werden. Hier betrug der entsprechende p-Wert zwischen den Genotypen C/A und A/A  $p = 0,1372$  (Abbildung 52B). Der einzige homozygote SCA3-Patient mit dem Genotyp A/A präsentierte sich in beiden Assays vergleichbar hoch wie das mediane ATXN3-Proteinlevel des Genotyps C/A der heterozygoten Mutationsträger, jedoch deutlich höher als der gleichnamige Genotyp A/A der heterozygoten Mutationsträger für polyQ-expandiertes ATXN3. Der Unterschied im ATXN3-Proteinlevel zwischen Kontrollprobanden und Mutationsträgern des Genotyps C/A war im 1C2-Assay statistisch deutlich signifikant ( $p = 0,0063$ ) (Daten zugunsten der Übersichtlichkeit nicht gezeigt).



**Abbildung 52: Statistische Analyse des SNPs ATXN3 BP 1118 und der ATXN3-Proteinlevels von Mutationsträgern und Kontrollprobanden im MW1-D2 und 1C2-D2 Assay.** A, B) Bei einer statistischen Analyse unter den Mutationsträgern mittels Kruskal-Wallis-Test stachen vor allem die hohen ATXN3-Proteinlevel des Genotyps C/A der heterozygoten Mutationsträger ins Auge, die im Median ähnlich hoch ausfielen wie die ATXN3-Proteinlevel des einzigen homozygoten SCA3-Patienten mit dem Genotyp A/A. A = Adenin, C = Cytosin.

Tabelle 46 präsentiert die Ergebnisse der Korrelationen zwischen dem ATXN3-Proteinlevel im TR-FRET und den Genotypen der SNPs im ATXN3-Gen.

**Tabelle 46: Zusammenfassung des Einflusses der drei SNPs im ATXN3-Gen auf das ATXN3-Proteinlevel.** G = Guanin, A = Adenin, AAO = *Age at onset*, CSDP = *Cross-sectional annual disease progression*, SARA = *Scale of the Assessment of Rating of Ataxia*, INAS = *Inventory of Non-Ataxia Symptoms*.

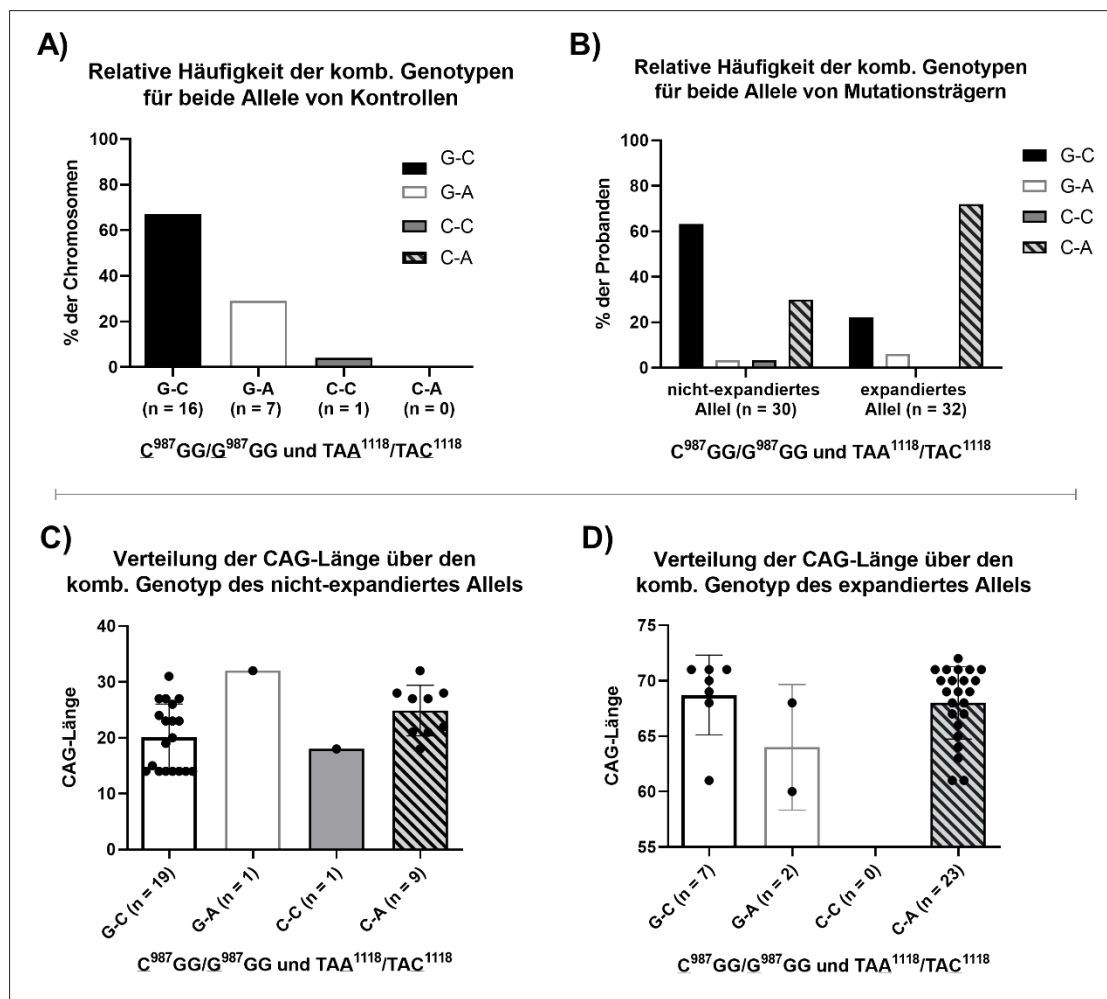
SNP	ATXN3-Proteinlevel
<b>ATXN3 BP 669</b>	<p>Statistisch signifikant höhere ATXN3-Proteinlevel unter den heterozygoten Mutationsträgern mit dem Genotyp G/G und A/G im Vergleich zu entsprechenden Kontrollprobanden.</p> <p>Im MW1-Assay war eine beinahe statistisch signifikante (<math>p = 0,0518</math>), im 1C2-Assay tendenzielle Beobachtungen des Genotyp A/G mit höheren ATXN3-Proteinleveln als die Genotypen A/A bzw. G/G zu verzeichnen. Homozygoter SCA3-Patient mit deutlich höherem ATXN3-Proteinlevel als entsprechend heterozygoter Mutationsträger mit gleichem Genotyp.</p>
<b>ATXN3 BP 987</b>	<p>Statistisch signifikant höhere ATXN3-Proteinlevel unter allen Mutationsträgern im Vergleich zu Kontrollprobanden.</p> <p>Genotyp C/G vor allem im 1C2-D2 Assay mit deutlich höheren ATXN3-Proteinleveln als die anderen heterozygoten Mutationsträger jedoch ohne statistische Relevanz. Im 1C2-D2 Assay war dessen ATXN3-Proteinlevel damit ähnlich hoch wie das des homozygoten SCA3-Patienten mit gleichem Genotyp.</p>
<b>ATXN3 BP 1118</b>	<p>Statistisch signifikant höhere ATXN3-Proteinlevel unter den heterozygoten Mutationsträgern im Vergleich zu Kontrollprobanden beim Genotyp C/A.</p> <p>Genotyp C/A mit deutlich höheren ATXN3-Proteinleveln als die anderen heterozygoten Mutationsträger, aber vergleichbarem ATXN3-Proteinlevel wie der homozygote SCA3-Patient mit dem Genotyp A/A. Beides blieb jedoch ohne statistische Relevanz.</p>

#### 4.3.5 Statistische Analysen des kombinierten Genotyps ATXN3 BP 987 und ATXN3 BP 1118

In Abbildung 53 sind die Ergebnisse eines kombinierten Genotyps aus den beiden SNPs ATXN3 BP 987 und ATXN3 BP 1118 dargestellt. Der SNP ATXN3 BP 669 konnte bedauerlicherweise nicht in diese Analysen eingeschlossen werden, da die ermittelten Nukleotide des SNPs aufgrund der fehlenden Allelspezifität nicht dem jeweiligen Allel zugeordnet werden konnten. Insgesamt wurden zwölf Kontrollprobanden mit insgesamt 24 nicht-expandierten Allelen eingeschlossen (Abbildung 53A). Unter ihnen war G-C mit 67 % der häufigste und G-A mit 29 % der zweithäufigste Genotyp. Im Gegensatz dazu wurde unter

ihnen der Genotyp C-A nicht registriert (0 %). Zusätzlich konnten insgesamt 30 heterozygote Mutationsträger mit jeweils einem expandierten und einem nicht-expandierten Allel in die Analysen eingeschlossen werden. Der einzige homozygote SCA3-Patient wies naturgemäß zwei expandierten Allele auf (Genotyp G-A und C-A), weshalb insgesamt 32 expandierte Allele bei 31 Mutationsträgern untersucht worden waren (Abbildung 53B). Auf dem nicht-expandierten Allel der heterozygoten Mutationsträger war ähnlich wie bei den Kontrollprobanden der Genotyp G-C am häufigsten (63,3 %) vertreten, während dieser auf dem expandierten Allel mit 22 % nur den zweithäufigsten Genotyp darstellte. Stattdessen präsentierte sich für die expandierten Allele der Genotyp C-A mit 72 % als der häufigste Genotyp. Auf dem nicht-expandierten Allel trat dieser mit 30 % vor allem im direkten Vergleich mit den Allelen der Kontrollprobanden dennoch häufig auf. Bei SCA3-Mutationsträgern kam der Genotyp G-A mit 7 % bzw. 3,3 % sowohl auf dem nicht-expandierten als auch auf dem expandierten Allel selten vor. Der Genotyp C-C war auf expandierten Allelen gar nicht vertreten. Wurde der kombinierte Genotyp beider SNPs der SCA3-Mutationsträger in Bezug auf deren CAG-Länge im *ATXN3* analysiert, erhielt man folgende Ergebnisse (Abbildung 53C, D): Auffällig war, dass der Genotyp G-C auf dem nicht-expandiertem Allel mit dem zweitkürzesten (Median: 20,0 CAGs; SD =  $\pm$  5,9), auf dem expandierten Allel hingegen mit dem längsten CAG-Trakt einherging (Median: 70,0 CAGs; IQA = 3). Genau entgegengesetzte Ergebnisse erhielt man für den Genotyp G-A, der unter den nicht-expandierten Allelen den längsten CAG-Trakt mit 32 CAG-Tripletts präsentierte, unter den expandierten Allelen jedoch den kürzesten CAG-Trakt (Median: 64 CAGs; IQA = 8). Dabei ist zu beachten, dass unter den zwei analysierten expandierten Allelen mit dem Genotyp G-A, ein Allel vom homozygoten SCA3-Patienten stammte. Das einzige nicht-expandierte Allel mit dem Genotyp C-C wies einen sehr kurzen CAG-Trakt von nur 18 CAG-Tripletts auf. Beim zugehörigen Probanden lag auf dem expandierten Allel der häufigsten Genotyp C-A zugrunde, der wiederum einen für diesen Genotyp verhältnismäßig kurzen CAG-Trakt mit nur 61 CAG-Tripletts lieferte.

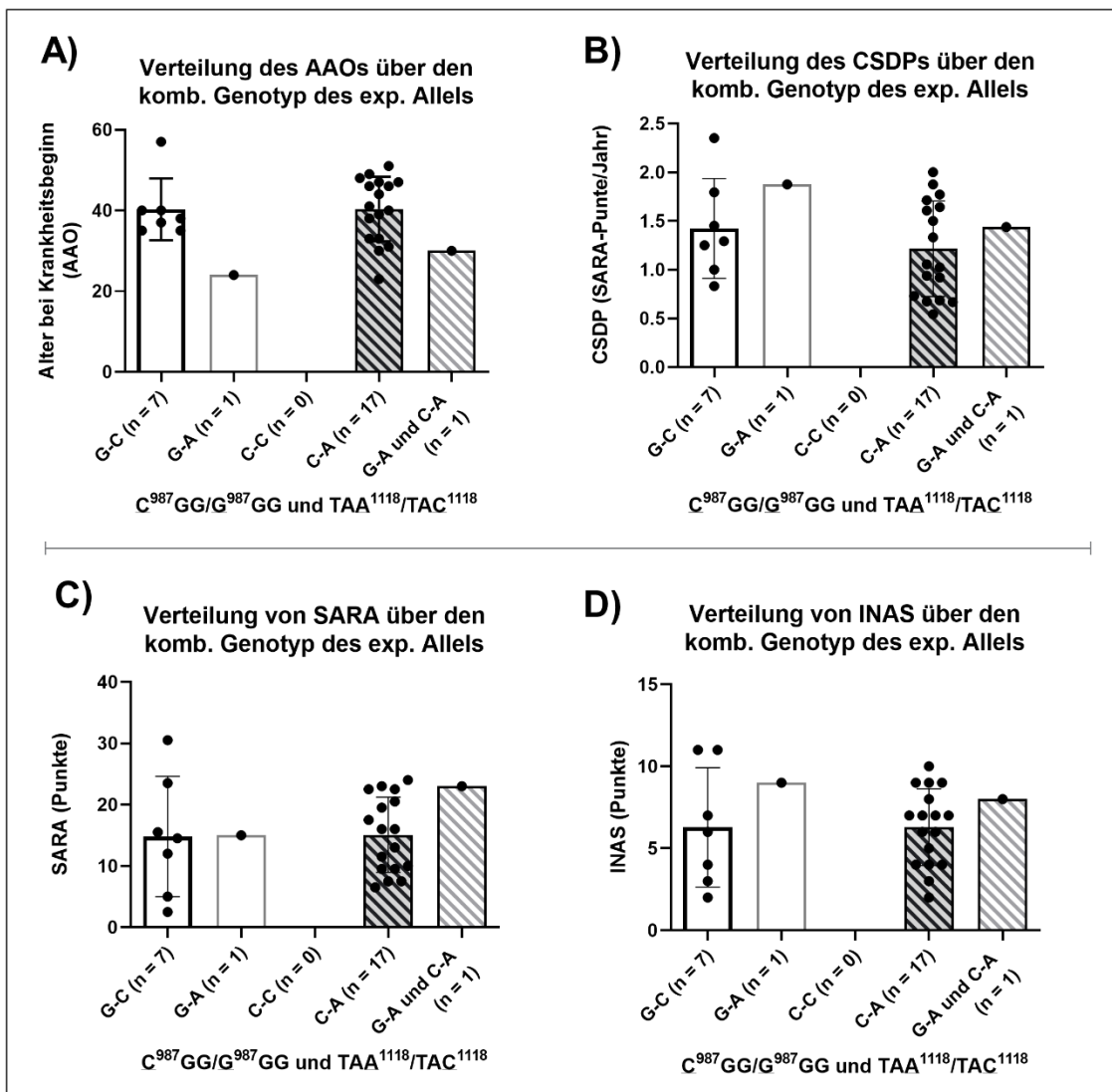




**Abbildung 53: Häufigkeitsverteilung des kombinierten Genotyps der SNPs ATXN3 BP 987 und ATXN3 BP 1118 für Kontrollprobanden und SCA3-Mutationsträger und statistische Korrelation der Genotypen mit der CAG-Länge für beide Allele der SCA3-Mutationsträger.** A), B) Unter den Kontrollprobanden und nicht-expandierten Allelen der Mutationsträger war der Genotyp G-C am häufigsten, während dies auf dem expandierten Allel der Genotyp C-A darstellte. C), D) G-C führte auf dem nicht-expandierten Allel zu einem besonders kurzen, auf dem expandierten Allel zum längsten CAG-Trakt. Der Genotyp C-C war nur auf einem nicht-expandierten Allel zu finden. G = Guanin, C = Cytosin, A = Adenin, T = Thymin, CAG = Basensequenz für die Aminosäure Glutamin.

Die Genotypen C-A und G-C der expandierten Allele von heterozygoten Mutationsträgern hatten zwar den längsten CAG-Trakt zugrunde liegen, waren aber am spätesten im Leben erkrankt (Abbildung 54A). Der homozygote SCA3-Patient (G-A und C-A) entwickelte mit 30 Jahren früh im Leben Symptome. Erstaunlicherweise traten beim einzigen heterozygoten SCA3-Mutationsträger mit dem Genotyp G-A noch früher (24 Jahre) Symptome der Erkrankung auf. Die drei Genotypen G-C, G-A und C-A wiesen zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung im Rahmen von ESMI im Median einen ähnlichem SARA (ca. 15 Punkte) auf, während der homozygote SCA3-Patient mit 23 SARA-Punkten bereits deutlich

schwerer erkrankt war (Abbildung 54C). Allerdings deuteten sich hier Unterschiede in der bisherigen Krankheitsprogression an (Abbildung 54B).



**Abbildung 54: Statistische Korrelation des kombinierten Genotyps der SNPs ATXN3 BP 987 und ATXN3 BP 1118 mit AAO, CSDP, SARA und INAS für die expandierten Allele der SCA3-Mutationsträger.** A) Die Genotypen C-A und G-C erkrankten am spätesten im Leben. Der heterozygote SCA3-Patient mit dem Genotyp G-A erkrankte am frühesten. B) Bei Patienten mit frühem AAO schritten die Krankheitssymptome im Median schneller voran. C) Zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung im Rahmen von ESMI waren die SCA3-Patienten mit Genotyp G-C, G-A und C-A ataktisch ähnlich schwer erkrankt, der homozygote SCA3-Patient zeigte die schwersten ataktischen Symptome. D) Bezüglich des INAS waren G-A und der homozygote SCA3-Patient die Probanden mit den deutlichsten nicht-ataktischen Symptomen. G = Guanin, C = Cytosin, A = Adenin, T = Thymin, AAO = Age at onset, SARA = Scale for the Assessment and Rating of Ataxia, INAS = Inventory of Non-Ataxia Symptoms, CSDP = Cross-sectional annual disease progression.

Gemessen am CSDP war die Erkrankung beim Genotyp G-A und beim homozygoten SCA3-Patienten bei jeweils frühem AAO am schnellsten vorangeschritten. Nach späterem AAO war sie beim Genotyp C-A eher langsam

progredient, wobei hier in den CSDP-Werten eine deutliche Streuung erkennbar war (Median: 1,06 SARA-Punkte/Jahr; SD = ± 0,49). Bezüglich der nicht-ataktischen Symptome entsprach die Schwere des Krankheitsbildes sehr dem SARA-Punktwert (Abbildung 54D). Die Genotypen G-C und C-A waren zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung am wenigsten stark von nicht-ataktischen Symptomen betroffen. Insgesamt ergaben die unter 4.3.5 aufgeführten Beobachtungen bei kleiner Gruppengröße mittels Kruskal-Wallis-Test keine statistisch signifikanten Unterschiede. Lediglich die beschriebenen Tendenzen waren ersichtlich.

Für die ATXN3-Proteinlevel der verschiedenen Genotypen ergaben sich weder statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen noch Tendenzen, weshalb an dieser Stelle auf eine bildliche Darstellung dieser Analyse verzichtet wurde.

Sowohl Tabelle 47 als auch Tabelle 48 präsentieren die Ergebnisse der Korrelationen zwischen dem ATXN3-Proteinlevel im TR-FRET und den kombinierten Genotypen der SNPs ATXN3 BP 987 und ATXN3 BP 1118.

**Tabelle 47: Zusammenfassung der Genotyp-Häufigkeit und CAG-Länge getrennt für Allele von Kontrollprobanden und SCA3-Mutationsträgern.** G = Guanin, A = Adenin, C = Cytosin.

SNP	Relative Häufigkeit und CAG-Länge
nicht-expandiertes Allel von Kontrollprobanden	G-C als häufigster Genotyp (62 %). Kein Vorkommen von C-A.
nicht-expandiertes Allel von Mutationsträgern	G-C als häufigster Genotyp (63,3 %) mit kurzem CAG-Trakt (Median 20,2 CAGs). C-A mit erhöhtem Vorkommen von 30 % im Gegensatz zu den Kontrollprobanden. G-A (n = 1) mit dem längsten CAG-Trakt. C-C mit dem kürzesten CAG-Trakt.
expandiertes Allel von Mutationsträgern	C-A als häufigster Genotyp (72 %) mit langem CAG-Trakt (Median 68,0). G-C mit deutlich seltenerem Vorkommen als auf nicht-expandierten Allelen (22 %) und dem längsten CAG-Trakt (Median: 68,7). Kein Vorkommen von C-C.

**Tabelle 48: Zusammenfassung des Einflusses des kombinierten Genotyps der SNPs ATXN3 BP 987 und ATXN3 BP 1118 auf klinische Parameter.** G = Guanin, A = Adenin, C = Cytosin.

<b>Expandiertes Allel der SCA3-Mutationsträger</b>	
<b>Genotyp</b>	<b>AAO, SARA, CSDP, INAS</b>
<b>G-C</b>	Später Krankheitsbeginn, mit anschließend langsamer Krankheitsprogression.
<b>G-A</b>	Früher Krankheitsbeginn mit sehr schnellster Krankheitsprogression. Zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung in ESMI ähnlich schwer erkrankt wie G-C und C-A.
<b>C-C</b>	Kein Vorkommen auf dem expandierten Allel.
<b>C-A</b>	Später Krankheitsbeginn, mit anschließend langsamer Krankheitsprogression.
<b>Homozygoter SCA3-Patient (G-A; C-A)</b>	Früher Krankheitsbeginn (30 Jahre), zügige Krankheitsprogression. Zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung in ESMI deutliche ataktische und nicht-ataktische Symptomatik.

## 5 Diskussion

Die Spinocerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3) ist eine autosomal-dominant vererbte, neurodegenerative Erkrankung (Alves, et al., 2008). Auf molekulargenetischer Ebene steht das *ATXN3*-Gen mit einer CAG-Expansion und ein daraus folgendes krankheitsverursachendes, Polyglutamin-expandiertes Protein ATXN3 im Mittelpunkt (Matos, et al., 2011). Dieses führt durch Aggregationen ab einer Expansion von über 47 Qs im Protein vor allem in Neuronen von Kleinhirn und Hirnstamm zur Neurodegeneration und in der Folge zur überwiegend ataktischen Symptomatik der Erkrankung (D'Abreu, et al., 2010). Bis heute stehen weder suffiziente symptomatische noch kausale Therapien zur Verfügung (Coarelli, et al., 2018). Um den Erfolg zukünftiger, potenzieller Therapien optimal beurteilen zu können, wurden im Rahmen dieser Promotion molekulare Biomarker untersucht und auf ihre Tauglichkeit geprüft. Als Traitmarker boten sich hier besonders die Anzahl der CAG-Triplett-Wiederholungen und das Vorliegen dreier in der Literatur vorbeschriebenen Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) *ATXN3* BP 669, *ATXN3* BP 987 und *ATXN3* BP 1118 (Maciel, et al., 1999) an. Weiterhin wurde das *ATXN3*-Proteinlevel in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) als potenzieller Statemarker untersucht.

### 5.1 Kohortenanalyse

Die Grundlage der in dieser Promotion durchgeführten Studien bildete die ESMI-Kohorte (*European Spinocerebellar Ataxia Type3/Machado-Joseph-Disease Initiative*), deren großer Vorteil in der Rekrutierung und Probenverarbeitung durch hochstandardisierte Protokolle lag. Insgesamt wurden in die Analysen der 39 Kontrollprobanden, 17 präsymptomatische Mutationsträger und 102 manifest erkrankte SCA3-Patienten eingeschlossen, unter letzteren auch ein homozygoter SCA3-Patient. Diese stammten ausschließlich aus europäischen Ländern (Deutschland, Großbritannien, Niederlande, Portugal). Mit 158 Probanden und davon 119 SCA3-Mutationsträgern war die Kohorte damit im Vergleich zu anderen Biomarker-Studien verhältnismäßig groß (Jacobi, et al. (2015):  $n = 122$  SCA3-Patienten; Wilke, et al. (2018):  $n = 65$  Probanden (davon 20 SCA3-Patienten); Wilke et al. (2020):  $n_{\text{Kohorte1}} = 83$ ,  $n_{\text{Kohorte2}} = 41$ ) mit einem

relativ ausgeglichenen Geschlechterverhältnis, wobei der Frauenanteil zwischen 41 % und 58 % schwankte. Da der Altersunterschied in dieser Kohorte zwischen Kontrollprobanden und manifesten SCA3-Patienten sogar statistisch signifikant war ( $p = 0,0112$ ), wäre es für die Zukunft wünschenswert, eine Kontrollgruppe zu schaffen, die sich vom Alter entsprechend wie die manifesten SCA3-Patienten verhält, um Einflüsse dieses Parameters definitiv ausschließen zu können. Im Vergleich zu den präsymptomatischen Mutationsträgern waren die Kontrollprobanden im Durchschnitt sogar statistisch signifikant älter ( $p = 0,0217$ ). Da im Leben erst ab der dritten bis vierten Lebensdekade der Krankheitsbeginn eintritt (Coarelli, et al., 2018), lag der statistisch höchst signifikante Altersunterschied zwischen präsymptomatischen und symptomatisch Mutationsträgern auf der Hand. Um beide Gruppen mit altersentsprechenden Kontrollgruppen abdecken zu können, sollte über die Rekrutierung einer zweiten zu den präsymptomatischen Mutationsträgern altersentsprechenden Kontrollgruppe nachgedacht werden.

Eine Zweituntersuchung in ESMI nach einem Jahr mit theoretischer Möglichkeit einer Krankheitsprogression lag zum Zeitpunkt der Auswertung nur für eine Kontrolleprobandin, zwei präsymptomatische Mutationsträger und 20 manifeste SCA3-Patienten vor, sodass die Kohorte für diese Analysen im Vergleich sehr klein ausfiel und Ergebnisse hier vor allem als Tendenzen verstanden werden sollten, wobei eine Validierung derer in größeren Kohorten in der Zukunft zu empfehlen ist.

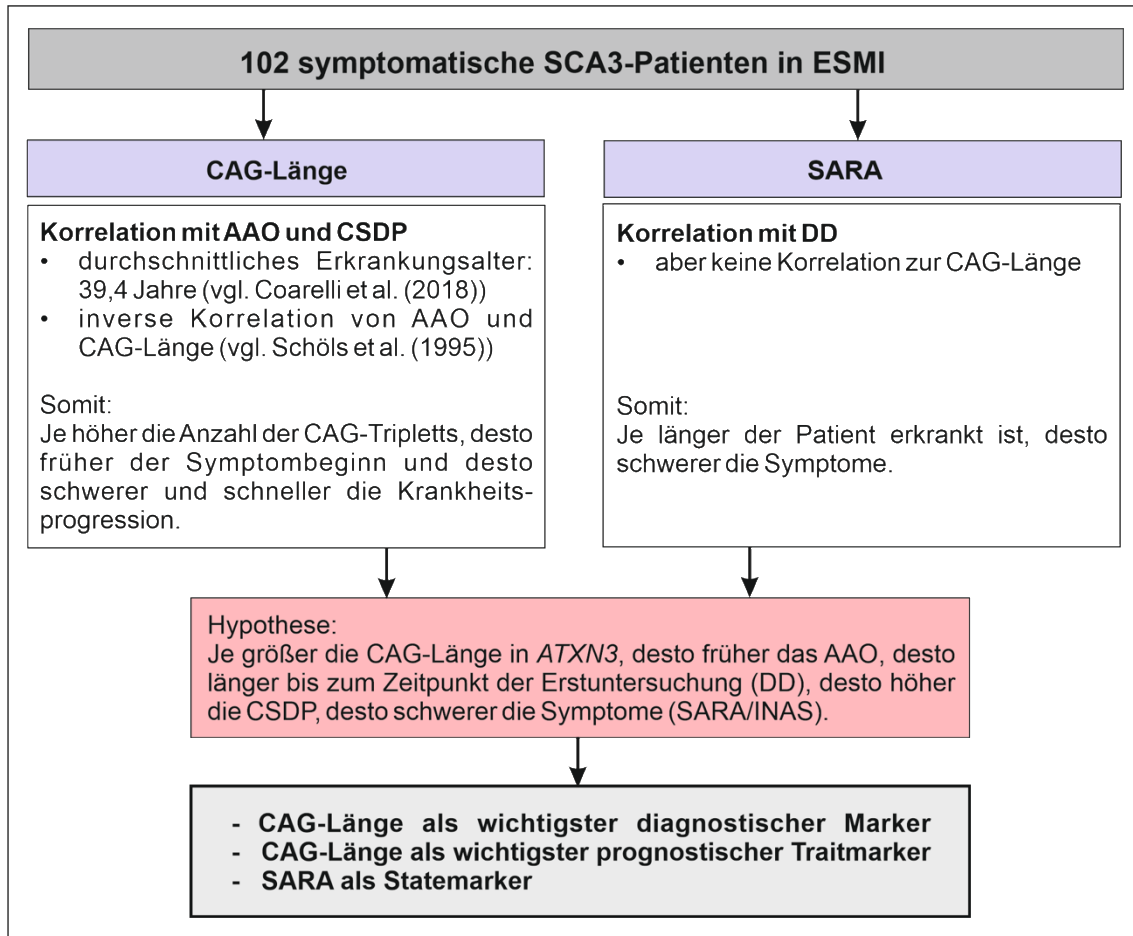
Der Nachweis einer CAG-Expansion im *ATXN3*-Gen dient heute als Diagnostikum zum Nachweis einer SCA3 und ist somit der wichtigste Traitmarker der Erkrankung. Mit den Ergebnissen in dieser Promotion ließen sich mittels CAG auch Angaben zu AAO und CSDP im Sinne eines prognostischen Biomarkers machen: Die SCA3-Patienten erkrankten im Durchschnitt mit 39,4 Jahren ( $SD = \pm 10,9$ ). Dieser Wert war somit vergleichbar mit dem Erkrankungsbeginn anderer europäischer Kohorten in der dritten bis fünften Lebensdekade (Coarelli, et al., 2018). Außerdem wurde die Beobachtung von de Mattos et al. (2018) bestätigt, dass männliche Mutationsträger früher im Leben erkranken als weibliche Mutationsträger. In der ESMI-Kohorte bestand eine statistisch höchst signifikante

te, inverse Korrelation ( $r_p = - 0,6085$ ) zwischen Anzahl der CAG-Triplets im *ATXN3*-Gen und dem Krankheitsbeginn (AAO). Auch dieser Zusammenhang ist in der Literatur bereits gut bekannt (Schöls, et al., 1995; de Mattos, et al., 2018). Dies lässt vermuten, dass die Länge des polyQ-Traktes im expandierten Protein auf molekularer Ebene bedeuteten Einfluss auf das Voranschreiten der Pathologie und letztendlich den Symptombeginn hat. Laut de Mattos et al. (2018) kann die CAG-Länge sogar 55,2 % der Variabilität des AAOs erklären, wobei für die restlichen Prozentpunkte weitere genetische und umweltbedingte Faktoren verantwortlich gemacht werden bzw. noch unbekannt sind (de Mattos, et al., 2018). Im Allgemeinen erkrankte der homozygote SCA3-Patient früher (AAO bei 30 Jahren) als die heterozygoten SCA3-Patienten, sodass wie Lang et al. (1994) und Rieß et al. (2008) berichten, die doppelte Gendosis einen früheren AAO begünstigte. Zusätzlich wurde im Folgenden in ESMI und von Li et al. (2020) eine besondere Schwere des Phänotyps beobachtet.

Zum Zeitpunkt der Untersuchung in ESMI war keine Korrelation der CAG-Länge zu den klinischen Bewertungssystemen SARA (*Scale of the Assessment of Rating of Ataxia*) und INAS (*Inventory of Non-Ataxia Symptoms*) erkennbar. Hierbei muss bedacht werden, dass dabei Probanden mit unterschiedlichem Krankheitsbeginn und bereits durchlebter Krankheitsdauer betrachtet wurden. Es ergibt also Sinn, die aktuelle SARA-Punktzahl auf die bisherige Krankheitsdauer (DD) eines jeden Patienten zu beziehen. Grundlage dafür ist eine statistisch höchst signifikante Korrelation von SARA und DD, die auch in die Literatur vorbeschrieben ist (Klockgether, et al., 2019). Der Wert nennt sich CSDP (*Cross-sectional annual disease progression*) und war in der Kohorte tatsächlich statistisch höchst signifikant mit der CAG-Länge assoziiert ( $r_s = 0,3847$ ,  $p < 0,0001$ ). Dies bedeutet, dass eine längere CAG-Expansion im *ATXN3*-Gen in der Kohorte zu schnellerer und schwererer Krankheitsprogression führte. In der Literatur herrscht hierrüber bisher keine Einigkeit. Wo Jacobi et al. (2015) in ihrer europäischen Kohorte keinen Zusammenhang zwischen CAG-Länge und Krankheitsprogression beobachteten, berichteten Rodríguez-Labrada et al. (2019) in einer brasilianischen Kohorte von eben einer solchen Korrelation. Der CSDP der ESMI-Kohorte betrug rückblickend über die gesamte

Krankheitsdauer betrachtet pro Jahr 1,5 SARA-Punkte. Damit präsentierte sich die Krankheitsprogression dieser Kohorte ähnlich schnell zu Beschreibungen von Jacobi et al. (2015). Ihre SCA3-Kohorte hatte über einen medianen Beobachtungszeitraum einen fast linearen, jährlichen SARA-Anstieg um 1,56 Punkte gezeigt, was die Forscher als mittlere Krankheitsprogression werteten. Die Linearität des SARA-Anstiegs lässt laut ihnen auf pathologischer Ebene auf einen stetig voranschreitenden Prozess der Neurodegeneration rückschließen (Jacobi, et al., 2015). In der ESMI-Kohorte bestand bei retrospektiv erhobener Krankheitsgeschichte nur die Möglichkeit eine bisherige mittlere Krankheitsprogression als CSDP aus der aktuellen SARA-Punktzahl und der bisher angegebenen DD zu errechnen. Damit gelang also keine genaue Abbildung der Krankheitsdynamik, sodass eine jährliche Aufzeichnung der SARA-Punktzahl über die Erkrankungsdauer sinnvoll wäre. Im Jahr der longitudinalen Beobachtung der kleinen ESMI-Kohorte mit 20 SCA3-Patienten betrug die SARA-Differenz -0,3 Punkte (IQA = 6), was aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse nicht zu erwarten war und gegen eine stetig voranschreitende Pathologie spricht. Hier müssen die Grenzen dieses klinischen Biomarkers bedacht werden. Laut Berechnungen von Jacobi et al. (2015) und Furtado et al (2019) benötigt man eine Kohorte von 142 bis 328 SCA3-Patienten, um eine 50%-ige SARA-Reduktion innerhalb eines Krankheitsjahres zu detektieren. Diese Kohortengröße konnte ESMI zu diesem Zeitpunkt der Studie nicht ermöglichen, sodass longitudinale Analysen zu späterem Zeitpunkt wiederholt werden sollten. In dieser Kohorte eignete SARA sich somit nur bedingt als Statemarker. Forscher stufen die Sensitivität des nicht-ataktischen klinischen Scores INAS für Veränderungen in SCA3 noch geringer ein als die von SARA (Jacobi, et al., 2015), weshalb es sinnvoll ist, ATXN3 im Folgenden als potenziellen Statemarker der Erkrankung zu erörtern. Abbildung 55 fasst die Diskussion der Kohortenanalyse nochmals zusammen.





**Abbildung 55: Zusammenfassung der Biomarkerstudien in der ESMI-Kohorte für CAG-Länge und SARA.** Unter den 102 SCA3-Patienten der ESMI-Kohorte wurden die Parameter CAG-Länge und SARA als potenzieller Trait- und State-Biomarker untersucht. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass eine längere CAG-Expansion zu frühem AAO führt (Schöls, et al., 1995). Bei zusätzlicher Korrelation von CAG-Länge zum CSDP, eignete sich die CAG-Länge als Diagnostikum und als wichtigster diagnostischer Traitmarker. SARA korrelierte mit der Krankheitsdauer und war damit ein Statemarker. CAG = Basensequenz für die Aminosäure Glutamin, AAO = Alter bei Krankheitsbeginn, DD = Krankheitsdauer, CSDP = Cross-sectional annual disease progression, SARA = Scale of the Assessment of Rating of Ataxia.

## 5.2 ATXN3-Proteinlevel

Aus Gründen der einfachen und sicheren Zugänglichkeit und geringen Invasivität wurde in dieser Promotion/ESMI das ATXN3-Proteinlevel in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) bestimmt. ATXN3, sowohl in seiner nicht-expandierten als auch expandierten Form, als potenziellen Trait- und Statemarker in Betracht zu ziehen ergibt durchaus Sinn, da die Mutation im Gen *ATXN3* ursächlich für veränderte Proteineigenschaften und daraus folgend für die Erkrankung ist. Im Gedankenspiel würde ein perfekter Biomarker für SCA3 zwischen Kontrollenprobanden und Mutationsträgern unterscheiden können,

den Übergang vom präsymptomatischen ins symptomatische Stadium erkennen können, um möglichst frühzeitig supportive oder präventive Therapien einzuleiten, mit der Krankheitsdauer korrelieren und über veränderte Proteinlevel Therapieerfolge darstellen können.

Ob ATXN3-Proteinlevel in PBMCs direkte Rückschlüsse auf die in SCA3 hauptsächlich stattfindende Neurodegeneration zulassen, ist bisher ungewiss. Die Bedeutung der Aktivierung des peripheren Immunsystems, das PBMCs bekanntermaßen einschließt, als Reaktion auf neuronale Dysfunktion im ZNS und Neurodegeneration, wird in letzter Zeit vermehrt in den Fokus gerückt (Weiss, et al., 2012). Ähnlich wie bei Chorea Huntington (HD) gibt es in SCA3 dazu passend Hinweise für eine vermehrte Aktivierung des peripheren Immunsystems durch gesteigerte Level an Zytokinen (Weiss, et al., 2012; Coarelli, et al., 2018). In HD-Patienten korrelierte die Proteinkonzentration des mutierten Huntingtins (mHTT) in PBMCs mit dem TR-FRET gemessen mit der Länge der CAG-Expansion im *Huntingtin* Gen, mit der Krankheitsprogression und der Gehirnatrophie. Die Forscher führten als Versuch einer Erklärung die Akkumulation von mHTT N-terminalen Fragmenten als Ursache für die progressive Erhöhung der mHTT-Level in PBMCs an. Sie schlagen somit eine Assoziation der Pathologie in peripheren Zellen und strukturellen Gehirnveränderungen im Rahmen der Neurodegeneration vor (Weiss, et al., 2012). Denkbar wäre ein analoges Verhaltensmuster von ATXN3 in SCA3 als krankheitsverursachendes Protein der Erkrankung, sodass seine Proteinlevel in PBMCs zumindest einen Einblick in Pathologie und Krankheitsausprägung geben könnten.

In dieser Promotion wurden die Proteinlevel von ATXN3 aus lysierten PBMCs unter Verwendung zwei verschiedener Akzeptor-Antikörper im *Time-resolved fluorescence energy transfer* (TR-FRET) gemessen, die jeweils ein anderes Detektionsspektrum aufwiesen. Die Antikörperkombination aus 1H9-Tb und MW1-D2 detektierte ATXN3-Proteine mit einem polyQ-Trakt von mehr als sechs Glutaminen (Q), also sowohl nicht-expandiertes als auch expandiertes ATXN3 (Ko, et al., 2001), wobei laut Nguyen, et al. (2013) vorzugsweise expandiertes ATXN3 detektiert wird. Eine zweite Antikörperkombination aus 1H9-Tb und 1C2-D2 detektierte vor allem ATXN3 mit polyQ-Trakten mit mindestens

37 Qs (Trottier, et al., 1995). Dies wäre theoretisch auch bei Kontrollprobanden möglich, wobei der längste polyQ-Trakt eines Kontrollprobanden in der ESMI-Kohorte bei lediglich 29 Qs lag. Dazu passend fielen die im MW1-D2 Assay gemessenen ATXN3-Proteinlevel der Probanden im Allgemeinen höher aus als die im 1C2-D2 Assay, da sowohl nicht-expandiertes als auch expandiertes ATXN3 detektiert wurde. Trotzdem präsentierten sich bei beiden Assays ähnliche Ergebnisse für die Unterschiede im ATXN3-Proteinlevel zwischen Kontrollprobanden und SCA3-Mutationsträgern unabhängig vom Symptomstatus. Der 1C2-D2 Assay zeichnete sich durch statistisch hoch signifikante Unterschiede zwischen Kontrollprobanden und präsymptomatischen Mutationsträgern aus ( $p = 0,0004$ ), während diese im MW1-D2 Assay nur deutlich signifikant ausfielen ( $p = 0,0057$ ). Insbesondere die statistisch hoch bis höchst signifikant höheren Proteinlevel der SCA3-Mutationsträger gegenüber den Kontrollprobanden waren zu erwarten, da expandiertes ATXN3 nur von Mutationsträgern exprimiert wurde. Zusätzliche ROC-Analysen zeigten, dass ein Proband im 1C2-D2 Assay allein anhand eines ATXN3-Messwertes zu 88,8 % korrekt zur Gruppe der Kontrollprobanden und Mutationsträger zugeordnet werden konnte. Der MW1-D2 Assay schnitt hier mit 84,36 % ähnlich ab. Somit präsentierte sich ATXN3 als potenzieller Kandidat für einen die Diagnostik unterstützenden Traitmarker für die Erkrankung SCA3, der allerdings nicht vermochte, die bisherige Bestimmung der Anzahl der CAG-Triplets im Gen *ATXN3* zu ersetzen.

Im Bezug auf ATXN3 als Statemarker zeigten sich teils widersprüchliche Ergebnisse. Zunächst waren in beiden Assays keine statistisch relevanten Unterschiede im ATXN3-Proteinlevel zwischen präsymptomatischen und symptomatischen SCA3-Mutationsträgern erkennbar, was erstmal gegen die Nutzung von ATXN3 als Verlaufsparemeter in SCA3 sprach. Zu bedenken ist hier die eingeschränkte Homogenität der präsymptomatischen Mutationsträger, von denen sich zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung einige ohne Symptome präsentierten, andere sich aber bereits kurz vor dem AAO befanden. Auch Wilke et al. (2020) beschrieben in ihren Biomarkerstudien zu Neurofilament-Leichtketten (NfL) zwei SCA3-Kohorten mit differenten Ergebnissen zur Unterscheidung von präsymptomatischen und symptomatischen Mutationsträgern. In

einer ihrer Kohorten war ein statistisch signifikanter Unterschied der NFL-Proteinlevel zwischen den Mutationsträgern mit unterschiedlichem Symptomstatus zu finden, in der anderen jedoch nicht (Wilke, et al., 2020). Auch dieses Beispiel spricht für Inhomogenität oder zu geringe Größe der Kohorten. Darüber hinaus korrelierte ATXN3 sowohl im MW1-D2 als auch im 1C2-D2 Assay nicht statistisch relevant mit den Parametern CAG-Länge, AAO und DD, sodass weder ein längerer polyQ-Trakt, noch ein früher Krankheitsbeginn, noch die Krankheitsdauer für einheitlich gerichtete ATXN3-Proteinlevel zu sorgen schienen. In der statistischen Analyse der einzelnen Parameter mittels Kruskal-Wallis-Test wurde jedoch sichtbar, dass ein früher Krankheitsbeginn insbesondere vor dem 40. Lebensjahr tendenziell zu erhöhtem ATXN3-Proteinlevel prädisponierte. Diese Ergebnisse erreichten aber ebenfalls keine statistische Signifikanz. Zu bedenken ist hier insbesondere, dass SCA3-Patienten in Gruppen nach ähnlichem Krankheitsbeginn aber bis zur Erstuntersuchung in ESMI differierender Krankheitsdauer verglichen wurden, sodass keine homogenen Gruppen vorlagen. Eine Erhebung des ATXN3-Proteinlevels zum Zeitpunkt des AAOs wäre aussagekräftiger und empfehlenswert. Allgemein wäre Folgendes vorstellbar: Je größer die CAG-Expansion in *ATXN3*, desto früher der einsetzende Krankheitsbeginn eines SCA3-Patienten (AAO) und desto schneller die Krankheitsprogression (CSDP), desto länger war dieser bis zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung in ESMI erkrankt (DD), desto länger konnten sich die Symptome entwickeln (SARA/INAS), desto höher fiel das ATXN3-Proteinlevel aus. Vor allem im MW1-D2 Assay waren tendenziell für längere polyQ-Trakte auch höhere ATXN3-Proteinlevel messbar, wobei eine hohe Anzahl an CAG-Tripletts in *ATXN3* wie in 5.1 beschreiben ebenfalls mit frühem AAO einherging. Neben diesen tendenziellen Beobachtungen bildeten sich für die klinischen Maße der Symptomstärke SARA und INAS vor allem für mild bis moderat betroffene SCA3-Patienten (3 - 24 SARA-Punkte) statistisch signifikant bis deutlich signifikante positive Korrelationen mit dem ATXN3-Proteinlevel ab. Für schwer betroffene SCA3-Patienten mit > 24 SARA-Punkten sank im Mittel das ATXN3-Proteinlevel wieder. Eine Tendenz von verringerten ATXN3-Proteinlevel mit fortschreitender Krankheitsprogression beschrieben auch Nguyen et al. (2013)

allerdings im Kleinhirn von SCA3 transgenen Mäusen und, wie in dieser Promotion, ohne statistische Signifikanz. Die sinkenden Proteinlevel im SCA3-Tiermodell waren dabei invers mit Aggregatbildung und Symptomschwere korreliert, sodass man vom Einschluss des löslichen ATXN3 bzw. der durch Enzyme gespaltene Proteinf Fragmente in die Aggregate ausging. Interessanterweise konnten sie dieses Phänomen nur im Kleinhirn, nicht jedoch in Lysaten des gesamten Gehirns nachweisen. Andere Forscher beschrieben eine Beschränkung der Aggregate auf Gehirnregionen, die von der Pathologie betroffen sind und zur charakteristischen Symptomatik führen, beispielsweise in der *Pons* (Paulson, et al., 1997). Deshalb ist es fraglich, ob in PBMCs überhaupt Aggregate vorkommen und durch eben diese der Abfall des ATXN3-Proteinlevels in diesen Zellen erklärt werden kann. Die Korrelation der beiden Parameter gibt Hinweise, dass ATXN3 ebenso wie SARA Krankheitsschwere misst. Für zukünftige Therapiestudien könnte diese Korrelation von ATXN3 und SARA bedeuten, dass eine Reduktion des ATXN3-Proteinlevels in PBMCs als Marker für Therapieerfolg ebenso genutzt werden könnte, wie die Reduktion von SARA, das bisher als wichtigster *Readout*-Parameter in Studien herangezogen wird (Klockgether, et al., 2019). Dies gilt natürlich, wie bei SARA, nur unter Beachtung der erforderlichen Mindestgrößen einer Studienkohorte, die die Detektion einer relevanten Reduktion im ATXN3-Proteinlevel oder SARA überhaupt zulässt (Jacobi, et al., 2015; Furtado, et al., 2019).

Denkbar wäre auch, dass jedes Individuum von Natur aus ein personenspezifisches Level an Expression von löslichem ATXN3 mit sich bringt, was besonders durch stark variierende ATXN3-Proteinlevel im MW1-D2 Assay der Kontrollprobanden bestärkt wurde. Somit wäre eine regelmäßige Bestimmung des ATXN3-Proteinlevels bei Symptombeginn bzw. bereits im präsymptomatischen Krankheitsstadium zu empfehlen, um intraindividuelle Änderungen des ATXN3 abzubilden. Eventuell ließen Änderungen des Proteinlevels Rückschlüsse auf die Krankheitsprogression im Sinne eines dynamischen Statemarkers zu.

Wurde die SARA-Punktzahl im nächsten Schritt auf die bisherige Krankheitsdauer angepasst (CSDP), so ergab sich keine Korrelation mit dem ATXN3-

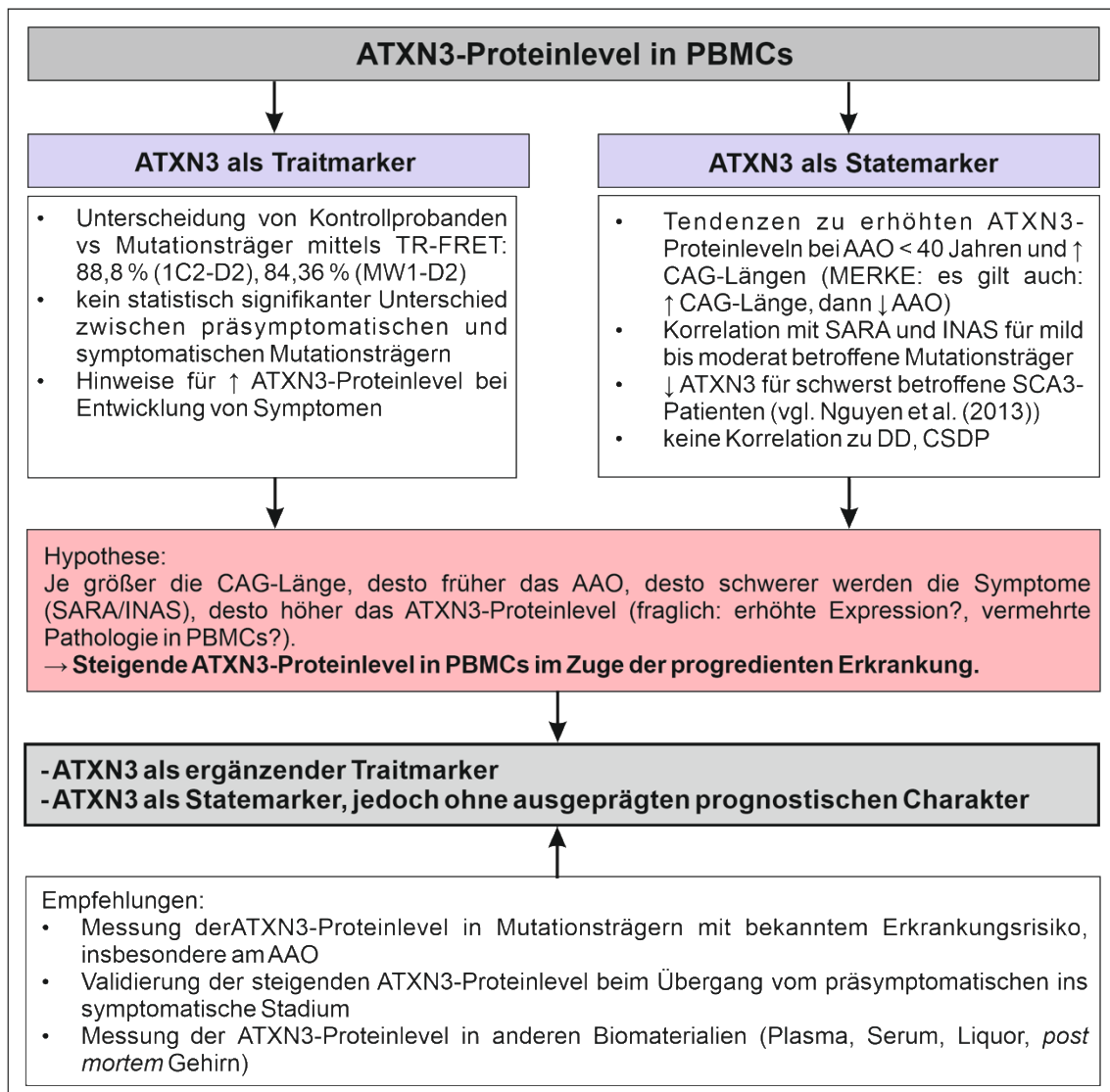
Proteinlevel. Dies ist sehr spannend, da ATXN3 statistisch signifikant mit dem stark von der DD abhängigen SARA korrelierte, in den Querschnittsstudien aber selbst keine Korrelation zu DD oder CSDP aufwies. In der kleinen Kohorte der longitudinalen Daten deutete sich wiederum eine Korrelation von ATXN3 und DD an, sodass hier für die Zukunft noch Klärungsbedarf besteht. Vorstellbar wäre die Auswertung einer Multivarianzanalyse mit Klärung der Frage, ob im Falle von größerer CAG-Länge auch das ATXN3-Proteinlevel pro Zeiteinheit schneller ansteigt, wenn dies für SARA in Form des CSDPs bereits gezeigt wurde und SARA und ATXN3 außerdem korrelierten.

ATXN3 schien zumindest in dieser Promotion, ähnlich wie SARA, aber eher eine Momentaufnahme der Erkrankungsschwere abzubilden, nicht jedoch als eindeutiger Verlaufsparemeter zu dienen. Unterstützt wurde diese Annahme durch die restlichen longitudinal erhobenen Daten. In ihnen ergab sich keine Korrelation zwischen Änderung der SARA- oder INAS-Punktzahl und Änderung des ATXN3-Proteinlevels im Jahr der Beobachtung. Die Änderung der Parameter verhielt sich nicht immer gleichgerichtet. Im Allgemeinen sanken die ATXN3-Proteinlevel bei mild betroffenen Mutationsträgern tendenziell innerhalb des Beobachtungszeitraumes, während sie bei moderat und schwer Betroffenen stiegen. Dies war nach vorheriger Beobachtung bei tendenziell geringeren ATXN3-Proteinleveln bei SARA > 24 Punkte nicht zu erwarten. Für beide präsymptomatischen Mutationsträger, die sich anhand der SARA-Punktzahl im Beobachtungsjahr zu symptomatischen SCA3-Patienten entwickelten, ergaben sich mittels 1C2-D2 Assay steigende ATXN3-Proteinlevel, im MW1-D2 Assay differierten die Richtungen der Änderung des Proteinlevels. In dieser kleinen Kohorte gab es zwei SCA3-Patienten, die sich in ihrer klinischen Symptomatik verbesserten und im Folgejahr zur Gruppe der milder Erkrankten gehörten. Informationen über angewendete Therapien bzw. Maßnahmen lagen für diese Promotion jedoch nicht vor. Um falsche Ergebnisse bei klinischen Beurteilungen zu minimieren, sollte die Symptomschwere der Probanden in Zukunft bei ihrer Zweituntersuchung in ESMI im besten Fall von demselben Untersucher beurteilt werden, um interindividuelle Beurteilungsdiskrepanzen auszuschalten. Bezüglich des SCA3-Patienten, dessen Gruppierung sich von moderat zu mild änder-

te, sanken die ATXN3-Proteinlevel wie zu erwarten war in beiden Assays. Gleichzeitig sanken allerdings auch die Proteinlevel für zwei Probanden, die in ihrer Gruppierung von mild zu moderat wechselten, im MW1-Assay und für einen Probanden auch im 1C2-Assay. Auch die Daten bei moderat zu schwer bzw. schwer zu moderat Erkrankten waren nicht eindeutig und daher nicht verwertbar. Als Zusammenfassung der longitudinalen Daten ergaben sich bei Mutationsträgern innerhalb einer Gruppierung Tendenzen einer einheitlichen ATXN3-Proteinlevel Veränderung, für Probanden mit Übergang in eine andere Gruppe liesen sich keine einheitlichen Angaben machen. Insgesamt war die Aussagekraft der longitudinalen Daten aufgrund der kleinen Probandenzahl eingeschränkt und sollte in einer größeren SCA3-Kohorte validiert werden, so dass anhand ihnen Aussagen zu ATXN3 als Verlaufsparemeter getroffen werden können. Eine Empfehlung für oder gegen einen Antikörper-Assay war ohne einheitliche Ergebnisse schwierig.

An dieser Stelle soll zum Schluss eine signifikante, negative Korrelation ( $p = 0,0379$ ) des Alters der präsymptomatischen Patienten mit dem ATXN3-Proteinlevel (MW1-D2) aufgegriffen werden. Dort zeigte sich: je jünger die präsymptomatischen Mutationsträger waren, desto höher war das gemessene ATXN3-Proteinlevel. Außerdem wiesen präsymptomatische Mutationsträger mit größerer CAG-Länge ein tendenziell höheres ATXN3-Proteinlevel auf. Bei bekanntem Wissen, dass Mutationsträger mit größerer CAG-Länge früher im Leben erkrankten (Abbildung 20), wäre denkbar, dass die jüngeren präsymptomatischen Mutationsträger mit hoher Anzahl an CAGs-Triplets bereits früher im Leben kurz vor dem AAO standen und bei bereits vor Symptombeginn einsetzender Neurodegeneration hohe ATXN3-Proteinlevel aufwiesen. Danach hätten diejenigen präsymptomatischen Mutationsträger mit weniger CAG-Triplets auch in höherem Alter noch keine Symptome entwickelt, einen geringeren Grad an Neurodegeneration erfahren und deshalb niedrigere ATXN3-Proteinlevel im peripheren Blut. Das etwaige zukünftige AAO der präsymptomatischen Mutationsträger konnte in dieser Kohorte mittels der Formel  $y = -1,637x + 152,1$  errechnet werden. Inwiefern Neurodegeneration sich zum Beispiel durch vermehrte Aktivierung des peripheren Immunsystems oder

erhöhte Expression von ATXN3 in PMBCs auswirkt, ist allerdings noch Gegenstand der Forschung.



**Abbildung 56: Zusammenfassung der Biomarkerstudien in der ESMI-Kohorte für expandiertes ATXN3.** Ob die Bestimmung von ATXN3 in PMBCs die Pathologie der Neurodegeneration hinreichend gut darstellt ist unbekannt. Trotzdem gab es Hinweise für die mögliche Nutzung von ATXN3 aus PMBCs als Trait- und Statemarker. Dazu gehört die Unterscheidbarkeit von Kontrollprobanden und Mutationsträgern mit einer Treffsicherheit von 88,8 % (1C2-D2). Des Weiteren korrelierte ATXN3 statistisch signifikant mit SARA und INAS, die beide selbst als Statemarker einzustufen waren. Vermuten ließ sich deshalb, dass die ATXN3-Proteinlevel in PMBCs mit zunehmender Erkrankung steigen. Dies sollte in Biomaterialien wie Liquor oder Plasma/Serum validiert werden. Außerdem wäre es sinnvoll in einer größeren longitudinalen Kohorte zu überprüfen, ob beim Übergang vom präsymptomatischen ins symptomatische Stadium die ATXN3-Proteinlevel steigen. PMBC = mononukleäre Zellen des peripheren Blutes, CAG = Basensequenz für die Aminosäure Glutamin, AAO = Alter bei Krankheitsbeginn, DD = Krankheitsdauer, CSDP = *Cross-sectional annual disease progression*, SARA = *Scale of the Assessment of Rating of Ataxia*, INAS = *Inventry of Non-Ataxia Symptoms*, TR-FRET = *Time-resolved fluorescence energy transfer*.

Das initiale Gedankenspiel zu perfekten Biomarkern ergab für SCA3 und ATXN3 folgende Ergebnisse: Insbesondere die Messung von expandiertem



ATXN3 könnte in Zukunft als ergänzender Traitmarker genutzt werden. Es gab erste Hinweise, dass ein Übergang vom präsymptomatischen ins symptomatische Krankheitsstadium mit einer Erhöhung des ATXN3-Proteinlevels einherging, dies ist aber unbedingt in größeren Kohortenstudien und möglicherweise in alternativen Biomaterialien wie Liquor oder Plasma und mittels sensitiveren Detektionsmethoden zu überprüfen. Zur Beurteilung des Krankheitsverlaufs lieferte diese Promotion widersprüchliche Daten. Einerseits imponierte eine signifikante Korrelation des ATXN3-Proteinlevels mit SARA und INAS, andererseits zeigten sich bei relativ großer Kohortengröße nur angedeutete Tendenzen zur Korrelation mit AAO und CAG-Länge. Insbesondere von einer Korrelation mit der Krankheitsdauer konnte anhand der Daten nicht ausgegangen werden. Über die Senkung von ATXN3 in PBMCs durch Therapien kann erst in entsprechenden Therapiestudien eine Aussage gemacht werden. Eine zukünftige Nutzung von ATXN3 als Statemarker ist also weiterhin fraglich. Abbildung 56 fasst die Diskussion der Ergebnisse zu ATXN3 als potenzieller Biomarker zusammen.

### **5.3 Einzelnukleotidpolymorphismen im Gen *ATXN3***

Für die Genotypisierung der drei im *ATXN3*-Gen untersuchten Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) standen die Methoden Sanger-Sequenzierung und *High Resolution Melting Analysis* (HRMA) zur Verfügung, wobei letztere erst im Rahmen dieser Promotion für diese SNPs etabliert wurde. Die Methode der HRMAs erlaubte einen hohen Durchsatz der Proben und war zudem schneller in der Durchführung und preiswerter als die Reagenzien einer herkömmlichen Sanger-Sequenzierung. Für den SNP ATXN3 BP 669 gelang mittels HRMA eine schnelle, leider aber keine allelspezifische Genotypisierung. Für die Analysen der am 3'-Ende des CAG-Traktes gelegenen Polymorphismen war mittels initialer PCR und Gelextraktion des nicht-expandierten und expandierten Allels für heterozygote Mutationsträger eine allelspezifische Genotypisierung möglich. Die weiterführende Analyse mittels HRMA gelang lediglich für den ATXN3 BP 1118, sodass der SNP ATXN3 BP 987 im Anschluss weiterhin mittels empirisch fehleranfälliger Sanger-Sequenzierung genotypisiert werden musste. Die Fehlerquelle in der HRMA für diesen SNP war vermutlich in der differierenden

Länge der CAG-Wiederholungen im PCR-Produkt zu sehen, das die Entstehung eines Genotyp-spezifischen Produkts verhinderte. In der Konsequenz ergaben sich für die Kohorten der drei SNPs unterschiedliche Größen, wobei jeweils die größtmögliche Anzahl an genotypisierten Probanden eingeschlossen wurde, um die Aussagekraft für jeden SNP zu maximieren. Im Allgemeinen wären für die SNP-Analysen in Zukunft größere Gruppengrößen und ein ausgeglicheneres Verhältnis von Kontrollen und SCA3-Mutationsträgern wünschenswert. Da die ESMI-Kohorte vor allem für Studien zu Biomarkern, die später Einblick in Krankheitsstatus und Therapieerfolge geben sollen, ausgelegt ist, sollten für die Zukunft die methodischen Barrieren zur Bestimmung des Genotyps beseitigt oder die Rekrutierung der Probanden in eine eigenständige SNP-Studie in Betracht gezogen werden.

Der direkte Vergleich der Häufigkeit der Genotypen der Probanden mit denjenigen Kohorten der Literatur gestaltete sich schwierig, da beispielsweise Maciel et al. (1999) für Mutationsträger lediglich den Genotyp des expandierten Allels angaben, nicht jedoch den Genotyp beider Allele, so wie es in dieser Promotion vorgenommen wurde. Insbesondere die Unmöglichkeit der Allelspezifität für den SNP ATXN3 BP 669 in dieser Promotion erforderte diese Art von Angabe jedoch. Auffällig waren bei allen SNPs die unterschiedliche Häufigkeitsverteilung der Genotypen zwischen Kontrollen und Mutationsträgern.

Trotz eingeschränkter Aussagekraft durch fehlende Allelspezifität wurde für den SNP ATXN3 BP 669 (auch  $\underline{A}^{669}\text{TG}/\underline{G}^{669}\text{TG}$ ) deutlich, dass bei den Kontrollen der größte Anteil der Allele mit der Base G einherging, da G/G den häufigsten Genotyp darstellte (61 %), A/G den zweithäufigsten. Unter den Mutationsträgern nahm die Base A eine zentralere Rolle ein, da 30 % den Genotyp A/A vorwiesen und der Anteil am Genotyp A/G auf 57 % stieg. Auch der homozygote SCA3-Patient trug den Genotyp A/A, was einen Hinweis auf die tragende Rolle der Base A auf expandierten Allelen sein könnte. Es kann festgehalten werden, dass in ESMI die Base A auf expandierten Allelen in häufigerer Frequenz vorkam, auf nicht-expandierten Allelen jedoch die Base G. In der Literatur wurden die Angaben für das nicht-expandierte Allel bestätigt, für das expandierte Allel hingegen wurde widersprüchlich zu dieser Arbeit eine leichte

Dominanz der Base G postuliert (Maciel, et al., 1999). Eindeutige Zusammenhänge eines Genotyps und bestimmten CAG-Längen waren nicht auszumachen, was auch Maciel et al. (1999) bestätigten. Tendenziell war G/G mit einer erhöhten Anzahl an CAG-Tripletts des expandierten Allels assoziiert. Für diesen SNP waren keine Unterschiede in AAO oder CSDP auszumachen. Lediglich der Genotyp A/G war beinahe mit signifikant höheren ATXN3-Proteinleveln als A/A assoziiert ( $p = 0,0518$ ). Diese Beobachtung ist aufgrund der fehlenden Allelspezifität jedoch schwierig im Kontext zu interpretieren.

Für den SNP ATXN3 BP 987 (auch  $\underline{C}^{987}GG/\underline{C}^{987}GG$ ) war für die Kontrollen G/G der häufigste Genotyp (54 %), wohingegen dies bei Mutationsträgern der Genotyp G/C (50 %) darstellte und der Genotyp G/G verhältnismäßig selten vorkam. Ein eindeutiger Hinweis, dass bestimmte Genotypen zu besonders kurzen oder langen CAG-Trakten führten, ergab sich nicht. Auch der homozygote SCA3-Patient präsentierte den Genotyp G/C bzw. C/G. Da er der einzige homozygote Mutationsträger in dieser kleinen Kohorte war, konnte auch hier über den Einfluss des Genotyps auf die CAG-Länge keine Aussage gemacht werden. In der Literatur ist Guanin als der häufigste Genotyp auf expandierten Allelen angegeben, Cytosin hingegen für die nicht-expandierten Allele (Maciel, et al., 1999). Auch in der ESMI-Kohorte war auf dem expandierten Allel in einer Mehrzahl der Fälle (67 %) die Base G gefunden worden, sodass dieser Genotyp mit höheren CAG-Expansionen assoziiert zu sein schien. In der Literatur und in ESMI war es jedoch die Base C, die letztendlich zu größeren CAG-Längen führte, auch wenn diese Assoziation nicht exklusiv war (Maciel, et al., 1999). Trotz kleiner Probandenzahl traten für diesen SNP durchaus Unterschiede zwischen den Genotypen in den Vordergrund. Widersprüchlich zu den langen CAG-Trakten im Zusammenhang mit der Base C auf dem expandierten Allel, erkrankten C/G und C/C spät im Leben mit anschließend langsamer Krankheitsprogression, was auch zu den niedrigen SARA- und INAS-Punktzahlen zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung passte. Trotzdem wurden für den Genotyp C/G die höchsten ATXN3-Proteinlevel bestimmt. Die Analysen lieferten somit keine einheitlichen Zusammenhänge zwischen Genotyp, AAO, CSDP und ATXN3-Proteinlevel.

Bezüglich des SNPs ATXN3 BP 1118 (auch TAA<sup>1118</sup>/TAC<sup>1118</sup>) war unter den Kontrollen der Genotyp C/C am dominantesten (57 %). Die Literatur bestätigte die ausgeprägte Häufung der Base C unter Kontrollprobanden (Maciel, et al., 1999). Die Erkenntnisse von Maciel et al. (1999) für die expandierten Allele von Mutationsträger, die die Base A als die häufigste postulierten, konnten in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Zwar war der Genotyp A/A mit 30 % häufiger als bei den Kontrollen und auch beim homozygoten Patienten nachzuweisen, so war dennoch der Genotyp C/A mit 57 % der häufigste auf dem expandierten Allel. Auffällig war, dass der Genotyp A/C zu den längsten CAG-Trakten führte, die Kombination A/A jedoch zu den kürzesten, sodass ein potenzieller Einfluss der Base C auf dem nicht-expandierten Allel auf die Länge der Expansion des CAG-Traktes im Raum steht. Maciel et al. (1999) machten zwar die Beobachtung, dass die Base C in *trans* zu erhöhter intergenerationalen Instabilität führte, konnten aber ebenfalls keine exklusive Assoziation einer Allel-Variante mit höherer CAG-Expansion nachweisen.

Erst der kombinierte Haplotyp aus den SNPs ATXN3 987 und 1118 lies einen besseren Vergleich zwischen der ESMI-Kohorte und der Kohorte der weltweiten Haplotypstudie von Gaspar et al. (2001) zu. Bei der Kombination der Genotypen der drei auch in dieser Promotion in den Fokus gerückten SNPs, waren theoretisch acht Haplotypen denkbar, die bei Kontrollen alle nachgewiesen werden konnten, bei SCA3-Patienten jedoch lediglich vier von ihnen (Gaspar, et al., 2001). In dieser Arbeit musste die Analyse bedauerlicherweise auf die Kombination der SNPs ATXN3 BP 987 und 1118 reduziert werden, weil für ATXN3 BP 669 keine Allelspezifität gelang und somit der Genotyp dessen expandierten Allels nicht zugeordnet werden konnte. Zwischen ESMI-Kohorte und der weltweiten Kohorte konnten trotzdem mehrere Parallelen gezogen werden. Für expandierte Allele der Mutationsträger wurde in der Literatur der Genotyp A-C-A mit 72 % angegeben (Gaspar, et al., 2001). Diese Prozentzahl konnte in ESMI reproduziert werden, wobei beim Genotyp C-A nicht zwischen A-C-A und G-C-A unterschieden werden konnte. Da Gaspar et al. (2001) letzteren Genotyp nicht unter Mutationsträgern beobachteten, ist davon auszugehen, dass es sich auch in ESMI vor allem um den häufigsten Genotyp A-C-A handelte. Unter den

Kontrollen war dieser Genotyp in ESMI nicht nachzuweisen und in der Haplotypstudie sehr selten, weshalb der Genotyp C-A vermehrt mit expandierten Allelen assoziiert zu sein schien. Interessanterweise lag die Häufigkeit von C-A auf dem nicht-expandierten Allel der Mutationsträger mit 30 % fast in der Mitte der Häufigkeit von Kontrollen und der expandierten Allele. Die Relevanz des Genotyps C-A für die Erkrankung SCA3 wird weiterhin durch ein Kopplungsungleichgewicht unterstrichen, das Maciel et al. (1999) beschrieben. Auf den klinischen Verlauf hatte der Genotyp keinen signifikanten Einfluss. Das durchschnittliche Erkrankungsalter war mit ca. 40 Jahren nicht besonders früh, die anschließende Krankheitsprogression nur mittelmäßig.

Auch die Frequenz des zweithäufigsten Genotyps G-G-C wurde in der Studie von Gaspar et al. (2001) mit 22 % gleich hoch bestimmt wie G-C in ESMI. Dieser Genotyp stellte unter den Kontrollen in beiden Studien sogar den häufigsten Genotyp dar (67 %). Dies ist sehr interessant, denn auch auf den nicht-expandierten Allelen der Mutationsträger war G-C ebenfalls besonders häufig (63,3 %). G-C wurde somit vor allem auf nicht-expandierten Allelen exprimiert. Auf diesen sorgte es für tendenziell sehr kurze CAG-Trakte, während es auf den expandierten Allelen im Median mit den längsten CAG-Trakten einherging. Diese Ergebnisse waren aber nicht von statistischer Signifikanz. Dazu passend wurde in der Literatur ein Kopplungsungleichgewicht für den Genotyp G-C in *trans* beschreiben, der zur vermehrten Variation der CAG-Expansionslänge führte (Maciel, et al., 1999). Martins et al. (2008) hingegen informierten über eine vermehrte Kontraktionstendenz des CAG-Traktes beim Genotyp G-G-C, während A-C-A zur höchsten Expansionstendenz des CAG-Traktes führte. Sie beschrieben weiterhin eine statistisch signifikante positive Korrelation zwischen Alter des Vaters und Expansionsumfang, der in dieser Promotion aufgrund fehlender Daten zur Intergenerationalität nicht überprüft werden konnte. Klinisch verhielt sich der Genotyp G-C ähnlich wie C-A mit einem Erkrankungsalter von ca. 40 Lebensjahren und mittelmäßiger Krankheitsprogression. Auch für den Genotyp G-A zeigten sich in ESMI ähnliche Ergebnisse zur Haplotypstudie, die ein etwas häufigeres Vorkommen des Genotyps bei Kontrollen postulierten, aber nicht exklusiv bei ihnen zu finden war (Gaspar, et al., 2001). Der einzige

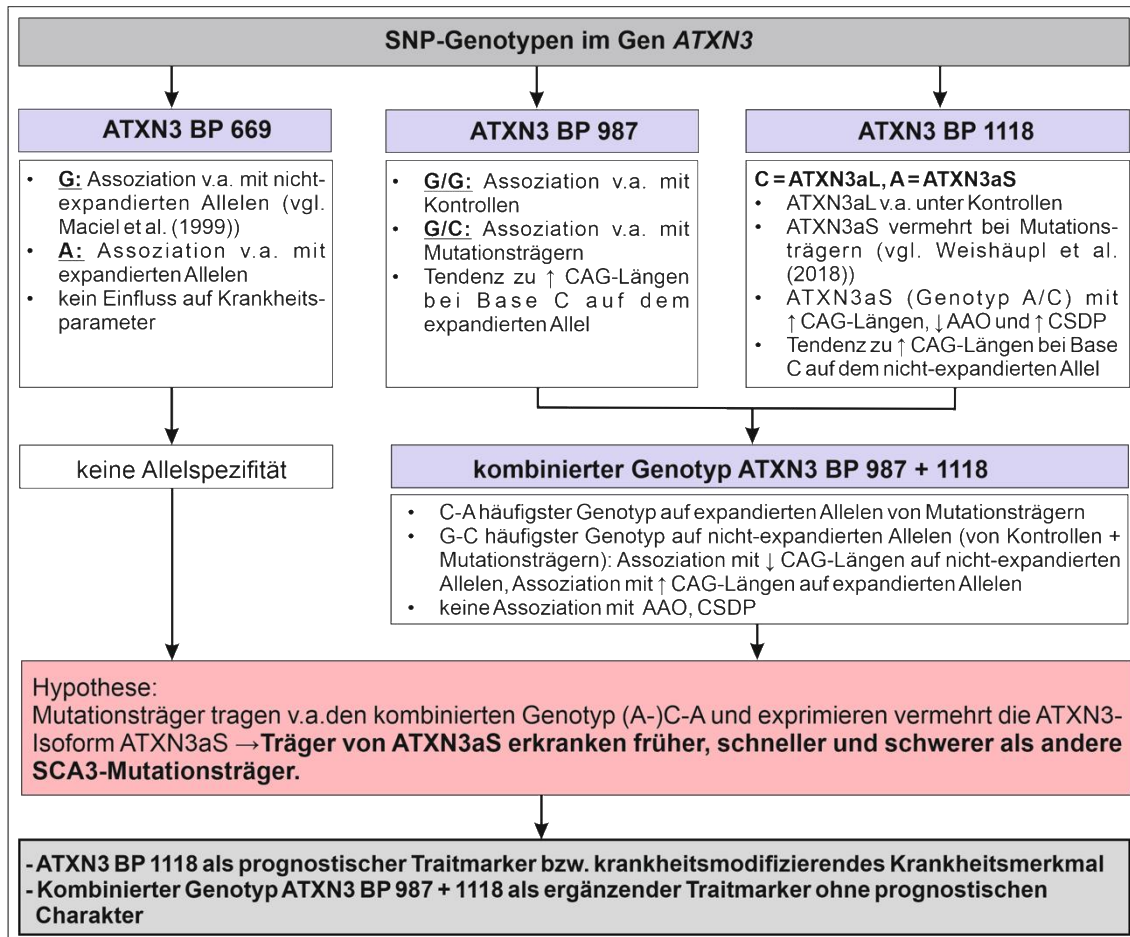
Proband mit diesem Genotyp erkrankte besonders früh und zeigte im Anschluss eine schnelle Krankheitsprogression mit 1,9 SARA-Punkten/Jahr. Somit präsentierte sich die ESMI-Kohorte im direkten Vergleich zu einer weltweiten Haplotypstudie von der Allelfrequenz sehr ähnlich zu anderen Kohorten und war trotz kleiner Gruppengröße in dieser Hinsicht repräsentativ. Insgesamt waren die relevanten Häufigkeitsunterschiede der kombinierten Genotypen zwischen Kontrollen und Mutationsträgern, die in der Literatur vorbeschrieben sind, also reproduzierbar. Trotzdem wirkten sich diese im Folgenden kaum auf klinische Parameter wie AAO und CSDP aus. Somit präsentierte sich der kombinierte Genotyp am ehesten als ergänzender Traitmarker ohne prognostischen Charakter.

Insbesondere dem SNP ATXN3 BP 1118 kommt eine besondere Bedeutung im Bezug auf die Bildung verschiedener ATXN3-Isoformen zu. Er ist an der Entstehung der kurzen Form der *full-length* Isoform ATXN3a beteiligt (ATXN3aS), (Abbildung 4), die durch die Base A am Ort des SNPs entsteht (Weishäupl, et al., 2019). In gesunden Personen wird im Gehirn vornehmlich die *full-length* Isoform ATXN3c exprimiert. Dies ändert sich bei Vorliegen der SCA3-Mutation, bei der zwar nicht exklusiv, aber hauptsächlich die Isoform ATXN3aS exprimiert wird. Sie ist zumindest *in vitro* mit vermehrtem nukleärem Auftreten, schlechterer Löslichkeit und erhöhter Aggregationstendenz verbunden, die neuropathologische Krankheitstheorien für SCA3 unterstützen (Weishäupl, et al., 2019). Da Aggregate als Mitwirkende für Neuronenuntergang in betroffenen Hirnregionen und die SCA3-Symptomatik gelten (Paulson, et al., 1997; Nguyen, et al., 2013), wäre eine aggravierte Symptomatik unter SCA3-Patienten mit der Isoform ATXN3aS durch den SNP ATXN3 BP 1118 denkbar. In der ESMI-Kohorte konnte zwar ein vermehrtes Auftreten der Base A auf expandierten Allelen und somit die Expression der Isoform ATXN3aS bei Mutationsträgern nachgewiesen werden, jedoch war der Genotyp C/A und somit die Isoform ATXN3aL deutlich häufiger. Dies war widersprüchlich zu den Ergebnissen von Weishäupl et al. (2019). Die Forscher suggerierten ebenso eine Fülle von Interaktionspartnern für die verschiedenen Isoformen, die ebenfalls für die Pathologieausprägung relevant sein könnten. Spezielle Forschungen hierzu fehlen aber noch. Trotz

des Widerspruchs beider Studien war der Genotyp A/C in ESMI mit den längsten CAG-Trakten assoziiert, mit entsprechend frühem AAO und mit dem höchsten CSDP-Wert verbunden. Die vier Probanden den Genotyps A/C zeigen bei ähnlichem AAO sogar sehr einheitlich eine schnellere Krankheitsprogression als der homozygote SCA3-Patient, dessen CSDP denen der Mutationsträger mit der Base C auf dem expandierten Allel ähnelte. Erstaunlicherweise lieferten die Assays einheitlich niedrige ATXN3-Proteinlevel für den Genotyp A/C. Dies ist zunächst verwunderlich, insbesondere da A/C die zum Zeitpunkt der Erstuntersuchung schwerst erkrankten Probanden waren und SARA bzw. INAS und das ATXN3-Proteinlevel in dieser Arbeit korrelierten. Die Spanne von SARA reichte unter den Probanden von ca. 9,5 bis 30,5 SARA-Punkte. Da bekanntermaßen ATXN3-Proteinlevel für SARA > 24 Punkte wieder sanken, wurde ein signifikanter Effekt des Genotyps auf das Proteinlevel eventuell verdeckt. Zusammenfassend erkrankten in ESMI die Mutationsträger mit der Isoform ATXN3aS früher, schneller und schwerer als andere SCA3-Mutationsträger, wobei im Widerspruch zu Weishäupl et al. (2019) nicht die Mehrheit der Mutationsträger diese Isoform exprimierten.

Insgesamt blieb der SNP ATXN3 BP 669 in dieser Kohorte ohne Einfluss auf Krankheitsparameter, während sich ATXN3 BP 987 mit uneindeutigen Ergebnissen präsentierte. Beide eigneten sich somit nicht als Biomarker für die Erkrankung SCA3. Besondere Bedeutung sollte dem SNP ATXN3 1118 mit der Bildung verschiedener ATXN3-Isoformen zukommen. Auch Weishäupl et al. (2019) appellierten in ihrer Veröffentlichung die ATXN3-Isoformen als modifizierende Krankheitsmerkmale in Erwägung zu ziehen. Auch diese Promotion macht Hoffnung auf eine zukünftige Nutzung des SNPs als prognostischen Traitmarker, der nach Bestimmung des Genotyps eine tendenzielle Prognose zum Krankheitsverlauf erlauben würde (Abbildung 57). Nicht zu vergessen ist ebenso die Relevanz der SNPs für zukünftige allelspezifischer Therapien, wie Alves et al. sie bereits 2008 im Tiermodell vorstellten. Die Nutzung von *Short hairpin RNAs* (shRNAs) mit integriertem SNP ATXN3 BP 987 erlaubte es den Forschern expandiertes ATXN3 im Sinne einer Genexpressionshemmung selektiv abzuschalten und eine Verminderung von ATXN3-Aggregaten hervorzu-

rufen (Alves, et al., 2008). Eine weitere Validierung der SNPs und ihrer Bedeutung für die Erkrankung in einer SCA3-Kohorte, die speziell für die Ermittlung des Einflusses des Einzelnukleotidpolymorphismus ausgelegt ist, wäre somit in Hinsicht auf Diagnostik und Therapie erstrebenswert.



**Abbildung 57: Zusammenfassung der Biomarkerstudien in der ESMI-Kohorte für die Genotypen der Einzelnukleotidpolymorphismen.** Analysiert wurden drei SNPs im ATXN3-Gen, von denen ATXN3 BP 669 keinen Einfluss auf Krankheitsparameter zu nehmen schien. Vor allem ATXN3 BP 1118 war mit seinem Genotyp an der Expression der *full-length* Isoformen ATXN3aS und ATXN3aL beteiligt, wobei erstere vor allem mit Mutationsträgern assoziiert war und zu schnellerer und schwererer Krankheitsprogression führte. ATXN3 BP 987 hatte vor allem im kombinierten Genotyp mit ATXN3 BP 1118 Potential als Traitmarker, wobei sich klinisch keine Unterschiede zwischen den kombinierten Genotypen ergaben. Aufgrund kleiner Kohortenzahlen sollten die Ergebnisse in Zukunft validiert bzw. eine eigene SNP-Studie zu SCA3 in der ESMI-Kohorte durchgeführt werden. SNP = Einzelnukleotidpolymorphismus, BP = Basenpaar, CAG = Basensequenz für die Aminosäure Glutamin, AAO = Alter bei Krankheitsbeginn, CSDP = *Cross-sectional annual disease progression*, C = Cytosin, A = Adenin, G = Guanin.



#### 5.4 Fehleranalyse und Schwächen der Promotion

Ziel dieser Promotion war die Validierung von expandiertem ATXN3 als potenzieller Biomarker für die Erkrankung SCA3. Außerdem sollte ein möglicher Einfluss dreier Einzelnukleotidpolymorphismen im *ATXN3*-Gen auf Krankheitsparameter und das ATXN3-Proteinlevel eruiert werden. Mit 158 Probanden war die ESMI-Kohorte für die Analysen der ATXN3-Proteinlevel in PBMCs zwar relativ groß, allerdings mussten aufgrund von fehlenden PBMCs insgesamt 72 weitere Probanden für die Analysen aus der ursprünglichen Kohorte ausgeschlossen werden, obwohl ihr genetisches Profil im Bezug auf *ATXN3* bekannt war. Insgesamt wäre ein erhöhter Anteil von präsymptomatischen Mutationsträgern in der Kohorte wünschenswert, da eben diese Kohorte in Zukunft von intensiver Forschung zu prädiktiven Statemarkern und frühzeitig eingeleiteten Therapien profitieren würde. Longitudinale Analysen über die Dauer des präsymptomatischen und symptomatischen Stadiums über mehrere Jahre könnten einen ATXN3-Grenzwert identifizieren, der ein Auftreten der Symptome vor allem in expandierten polyQ-Trakten mit 47 bis 51 Qs wahrscheinlich macht, beziehungsweise der einen Übergang vom präsymptomatischen ins symptomatische Stadium anzeigt. Für die Alzheimer-Krankheit konnte beispielsweise anhand einer besonders großen Änderung des Proteinlevels des unspezifischen Neurodegenerationsmarkers Neurofilament-Leichtketten (NfL) der Übergang ins symptomatische Stadium bestimmt werden (Peischle, et al., 2019). Wilke et al. (2020) deckten auch für SCA3 signifikant erhöhte NfL-Proteinlevel in präsymptomatischen Mutationsträgern auf, die sich weniger als 7,5 Jahre vor dem AAO befanden und unterstützen damit die These, dass die Neurodegeneration bereits einige Zeit vor Symptombeginn einsetzt. Die longitudinale ESMI-Kohorte war mit 23 Probanden sehr klein und erlaubte innerhalb eines Jahres keine Identifikation eines solchen Grenzwertes für ATXN3. Ein Monitoring des ATXN3-Proteinlevels ab dem präsymptomatischen Stadium könnte weiterhin Auskunft über interindividuelle ATXN3-Proteinlevel geben und eine bessere Assoziation des Proteinlevels mit der klinischen Symptomatik herstellen.

Für die Erkrankung SCA3 ist vor allem expandiertes ATXN3 als Biomarker von Interesse, welches nur von SCA3-Mutationsträgern exprimiert wird. Im MW1-D2 Assay wurde jedoch auch ein Anteil nicht-expandiertes ATXN3 detektiert, weshalb die gemessenen ATXN3-Proteinlevel im Gegensatz zum 1C2-D2 Assay höher ausfielen und die Trennschärfe zwischen Kontrollen und Mutationsträgern reduziert war. Allgemein gibt es einige Faktoren, die nach Ward et al. (2017) Interferenzen in Immunassays auslösen können, wobei der sogenannte Hook-Effekt hier in den Vordergrund gerückt werden sollte. Durch ihn können bei falschem Verhältnis zwischen Antikörper und Antigen falsch niedrige Proteinlevel gemessen werden (Ward, et al., 2017). Auf den TR-FRET dieser Promotion übertragen könnte dies bedeuten, dass bei hoher ATXN3-Konzentration und niedriger Antikörperkonzentration nicht an jedem ATXN3-Molekül der D2- und der Tb-markierte Antikörper gleichzeitig binden konnten, sodass dieses ATXN3-Molekül im TR-FRET nicht detektiert wurde und das ATXN3-Proteinlevel zu niedrig eingeschätzt wurde. Dies war vor allem auf unzureichende Verdünnung der PBMC-Proben nach dem Bradford-Assay zurückzuführen. Hinweise auf einen potenziell vorliegenden Hookeffekt gab die ATXN3-Positivkontrolle, die idealerweise den höchsten Messwert im Assay liefern sollte, im Rahmen des Hook-Effekts jedoch paradox niedrige Werte ergab. Auf der anderen Seite können auch zu hohe Verdünnungen zu falsch niedrigen Werten führen, da ein niedrig gemessenes ATXN3-Proteinlevel im Bezug zu einem hohen Proteinlevel im Bradford-Assay gesetzt werden könnte. Denkbar ist bei geringer Sensitivität einer Methode ebenfalls die Messung eines Hintergrundsignals in Kontrollproben bzw. der Negativkontrolle, sodass die ATXN3-Proteinlevel der Kohorten bei falsch hoher Negativkontrolle insbesondere im MW1-D2 Assay mit negativen Werten imponierten. Weiterhin war ein Verlust des Pellets bzw. der Proteine bei der Verarbeitung und Lyse der PBMC-Proben als Ursache für niedrige ATXN3-Proteinlevel in Betracht zu ziehen. Im Allgemeinen ist vom Einfluss des Immunstatus auf die Konzentration von PBMCs im peripheren Blut auszugehen, die zentral mitwirkende Komponenten der Immunantwort darstellen. Vor allem bei einigen Kontrollen wurden im 1C2-D2 Assay ATXN3-Proteinwerte bis zu  $\Delta F = 50$  [% Signal über Hintergrund] ermittelt. Dies war beim Wissen der Eigen-

schaften des 1C2-D2 Antikörpers und der CAG-Längen von Kontrollen dieser Kohorte eigentlich nicht möglich. Ein möglicher Grund für diese Beobachtung könnten Kontaminationen durch Hämoglobin (Fodale, et al., 2017), Messung von Hintergrundsignal und eine potenzielle Probenvertauschung sein. Nach Ausschluss einer augenscheinlichen Hämoglobin-Kontamination durch eine weiße und nicht rötliche Farbe des Pellets und mehrfach wiederholter Messung mit ähnlichen Ergebnissen, wurden auch diese Probanden in die Kohorte inkludiert, um dieses Problem aufzuzeigen. Die Trennschärfe zwischen Kontrollen und Mutationsträgern wurde dadurch womöglich eingeschränkt. Ein generelles Problem für Kontrollprobanden in beiden Assays lag in künstlich hoch ermittelten ATXN3-Proteinleveln bei niedrigen Proteinleveln im Bradford. Grobe Pipettierfehler konnten hier als Ursachenquelle weitestgehend ausgeschlossen werden, da nur Pipettierfehler von maximal 10 % zwischen Duplikaten im Bradford-Assay und vor allem im TR-FRET zulässig waren.

In einer Studie mit teilweise retrospektiv erhobenen Daten kann die Korrektheit aller Daten nicht gewährleistet werden. Wurde die Diagnose bei diesem seltenen Krankheitsbild erst verzögert gestellt oder konnten Patienten sich nicht an den genauen Krankheitsbeginn erinnern, vielleicht auch weil Symptome erst verspätet durch Patienten und deren Umgebung als pathologisch wahrgenommen wurden, können Parameter wie AAO oder DD und in der Folge auch der Krankheitsprogressionsmarker CSDP verfälscht sein und statistisch relevante Korrelationen verdeckt werden. Zur idealen Datenerhebung wäre eine prospektive Beobachtung und regelmäßige klinische und laborchemische Testung von SCA3-Mutationsträgern mit bekanntem Erkrankungsrisiko empfehlenswert.

Weiterhin sind noch mögliche Verzerrungen der Ergebnisse durch andere Faktoren zu bedenken. Unter SCA3-Mutationsträgern war das ATXN3-Proteinlevel von männlichen Probanden tendenziell höher als das der weiblichen, jedoch ohne statistische Relevanz. Im 1C2-D2 Assay hatten allerdings unter den Kontrollen die weiblichen Probanden statistisch signifikant höhere ATXN3-Proteinlevel. Dieses Ergebnis war unter dem Gesichtspunkt der oben genannten möglichen Fehlerquellen in diesem Assay für Kontrollen sehr kritisch zu betrachten. Ebenfalls für die Kontrollen des 1C2-D2 Assays präsentierte sich eine

statistisch deutlich signifikante, positive Korrelation zwischen ATXN3-Proteinlevel und Alter, die im MW1-D2 Assay allerdings nicht bestätigt werden konnte. In beiden Assays ergab sich für die SCA3-Patienten des Zentrums 3 die einheitliche Aussage, dass deren ATXN3-Proteinlevel statistisch signifikant niedriger waren als die der anderen Zentren. Signifikante Unterschiede im Alter oder im AAO waren im Vergleich zu anderen Zentren nicht aufgefallen. Die Patienten waren aber im Durchschnitt kürzer erkrankt (DD) als insbesondere Zentrum 1 und 2. Da ATXN3-Proteinlevel und DD in den Analysen nicht korrelierten war eine kürzere DD als Erklärung fraglich.

Zuletzt sollten Schwächen der Methoden für die SNP-Genotypisierung diskutiert werden. Zunächst einmal gelang die Etablierung der HRMA für die SNPs ATXN3 BP 669 und 1118 und erlaubte dadurch einen erhöhten Umsatz und schnellere Genotypisierung der Proben bei geringeren Kosten im Gegensatz zur Sanger-Sequenzierung. Dabei musste allerdings bei ATXN3 BP 669 auf eine Allelspezifität verzichtet werden, die für adäquate Vergleiche mit anderen Haplotypstudien wünschenswert wäre. Um eine Allelspezifität zu erreichen müsste eine Methode angewendet werden, bei der gleichzeitig der Genotyp des SNPs und die CAG-Länge beider Allele (nicht-expandiert/expandiert) abgebildet werden kann. Um dies für ATXN3 BP 987 und 1118 zu verwirklichen, wurde in dieser Arbeit im Vorfeld zur HRMA oder Sanger-Sequenzierung eine PCR und Gelextraktion vorgenommen, deren Zielsequenz die CAG-Expansion umfasste, um nicht-expandiertes und expandiertes Allel zu trennen. Diese PCR war allerdings nicht immer erfolgreich. Dies ist vermutlich auf Schwierigkeiten der DNA-Polymerase zurückzuführen, die repetitive CAG-Abfolge abzubilden. Ebenso große Schwierigkeiten verursachte der CAG-Trakt bei der HRMA des SNPs ATXN3 BP 987, bei der die variable Länge an CAG-Tripletts die Entstehung eines Genotyp-spezifischen PCR-Produkts verhinderte, das in der HRMA nach Genotyp des SNPs differenziert werden konnte.

## 5.5 Ausblick

PBMCs aus Blut, so wie sie in dieser Promotion verwendet wurden, sind ein einfaches und sicher zugängliches Medium. Um direkte Rückschlüsse auf die Neurodegeneration zu erlauben, müsste ATXN3 als potenzieller Surrogatmarker jedoch in anderen Medien wie Liquor oder direkt in Proben des *post mortem* (Klein-)Hirns untersucht werden (Abbildung 58), so wie dies bereits im SCA3 transgenen Mausmodell von Nguyen et al. (2013) gemacht wurde. Für die Huntington-Krankheit ist beispielsweise bereits bekannt, dass mHTT-Proteinlevel im Liquor bei HD-Mutationsträgern nachweisbar sind und mit der 5-Jahres-Erkrankungswahrscheinlichkeit und mit der Krankheitsschwere korrelieren (Wild, et al., 2015). Weiterhin erweckte eine mögliche Korrelation von SCA3 und Neurofilament-Leichtketten im Plasma großes Interesse. NfL sind Bestandteile von Intermediärfilamenten und werden als Bauteile des Zytoskeletts vor allem in großkalibrigen Axonen exprimiert. Im Zuge der Schädigung oder dem Tod dieser Neurone als Folge traumatischer Einwirkung oder neurodegenerativer Erkrankungen folgt eine Freisetzung der NfL in den Liquor und schließlich, vermeintlich über die Blut-Hirn-Schranke, ins Blut (Peischle, et al., 2019). Peischle, et al. (2019) und Byrne et al. (2018) bewiesen die enge Korrelation der NfL-Konzentrationen im Liquor und im peripheren Blut, was die Zugänglichkeit zur Messung von NfL erheblich erleichterte. Bei Forschungen zur autosomal-dominant vererbten Alzheimer-Krankheit erlaubte die NfL-Konzentration im Plasma zwischen Kontrollen und Mutationsträgern zu unterscheiden. Der jährliche Anstieg des NfL-Spiegels im Blut vermochte sogar den Übergang vom prä-symptomatischen ins symptomatische Krankheitsstadium anzuzeigen (Peischle, et al., 2019). Für Chorea Huntington konnten bereits statistisch signifikante Korrelationen zwischen den NfL-Konzentrationen im Patientenplasma und dem Vorhandensein der Mutationsanwesenheit, der Erkrankungsschwere, dem AAO, der Krankheitsprogression und dem Gehirnvolumen im MRT nachgewiesen werden (Byrne, et al., 2018). Auch für autosomal-dominant vererbte spinocerebelläre Ataxien wurden in einer Pilotstudie von Wilke, et al. (2018) erste Hinweise gefunden, dass die NfL-Konzentration im Plasma mit hoher Genauigkeit zwischen Kontrollprobanden und Mutationsträgern von SCA2 und SCA3 zu

diskriminieren vermag. In weiterführenden Studien zu SCA3 waren die NfL-Proteinlevel im Serum von präsymptomatischen Mutationsträgern bereits 7,5 Jahre vor AAO signifikant erhöht und unterschieden sich statistisch signifikant von denen der Kontrollen und SCA3-Patienten. Sie korrelierten weiterhin mit der Krankheitsschwere (SARA) und der longitudinalen Krankheitsprogression (Wilke, et al., 2020). Im zusätzlichen SCA3 *knock-in* Mausmodell dieser Studie waren die erhöhten NfL-Konzentrationen im Serum ebenfalls mit ATXN3-Aggregaten und Verlust von Purkinjezellen im Gehirn assoziiert (Wilke, et al., 2020). Sowohl die einmalige Messung der NfL-Konzentration im peripheren Blut, als auch die jährliche Änderung der NfL-Konzentration gelten insgesamt als vielversprechende, leicht zugängliche und krankheitsübergreifende Biomarker für Krankheitsprogression und Krankheitsschwere in neurodegenerativen Erkrankungen (Peischle, et al., 2019).

Ähnliche Studien mit longitudinalem Design, sowohl im Tiermodell als auch im Menschen, wären in Zukunft auch für ATXN3 wünschenswert. Die Frage, ob ATXN3, ähnlich wie NfL, darüber hinaus die Blut-Hirn-Schranke passiert (Peischle, et al., 2019) oder sogar im peripheren Nervensystem freigesetzt wird (Furtado, et al., 2019) und damit in ähnlich hohen Konzentrationen sowohl im Liquor als auch im Plasma messbar ist, bleibt in diesem Zusammenhang unbeantwortet, wäre aber für weitere Forschungen interessant (Abbildung 58). Mit ATXN3 im Plasma oder Serum wäre im Kontrast zum unspezifischen NfL ein für die Erkrankung SCA3 spezifisches Protein als Statemarker denkbar, dass Neurodegeneration während der Krankheitsprogression anzeigen und damit direkter Indikator für Therapieerfolg in klinischen Studien sein könnte. Wünschenswert wäre die Nutzung von expandiertem ATXN3 in einem geeigneten Medium als primärer *Readout*-Parameter in Therapiestudien, deren Erfolg an der Reduktion des ATXN3-Proteinlevels festgemacht wird. Damit würde die SARA als primärer *Readout*-Parameter ersetzt werden, aber dennoch als sekundärer *Readout*-Parameter Verwendung finden können, um eine Aussage über Symptomschwere zu treffen. Als sekundärer *Readout*-Parameter wäre ebenfalls das zuvor genannte NfL denkbar, das vor allem Informationen über das aktuelle Level an Neurodegeneration geben könnte.

Bei Messung von sehr geringen Konzentrationen eines Proteins schließt sich hier die Frage nach der Sensitivität einer Methode an. Wild et al. (2015) beschrieben die Methode des TR-FRET als zu wenig sensitiv, um mHTT im Plasma oder Liquor zu messen, wohingegen die Messung in PBMCs durchaus möglich war. Die Messung von ATXN3 in PBMCs funktionierte in dieser Promotion, wobei dies sogar mit zwei Assays inklusive unterschiedlicher Antikörperkombinationen gelang. Dabei zeigten beide Assays Stärken und Schwächen. Der MW1-D2 Assay detektierte sowohl nicht-expandiertes als auch expandiertes ATXN3 und sorgte dadurch für eine verminderte Trennschärfe zwischen Kontrollen und SCA3-Mutationsträgern. Im 1C2-D2 Assay war eine Detektion von Kontrollen durch nicht mittels Antikörpereigenschaften erklärbare Ursachen aufgefallen, die ebenfalls die Trennschärfe zwischen beiden Gruppen beeinträchtigte. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen präsymptomatischen und symptomatischen SCA3-Mutationsträgern lieferten beide Assays leider nicht. Insgesamt überzeugte der 1C2-D2 Assay mit 88,8 % AUC in der ROC-Analyse und höherer statistischer Korrelation von ATXN3-Proteinleveln zu SARA und INAS mehr. Um für ATXN3 entsprechende Messungen des Proteinlevels im Plasma und Liquor durchführen zu können, ist aber womöglich ein Wechsel auf sensitivere Methoden in Betracht zu ziehen (Abbildung 58). An dieser Stelle sind vor allem modifizierte Methoden des konventionellen ELISAs zu nennen, die durch alternative Detektionssysteme erweitert wurden (Fischer, et al., 2015). Dazu gehört der *Single-molecule counting* (SMC<sup>TM</sup>) Immunoassay von Singulex®. Die Technologie greift auf ein Immunassay-Protokoll als Grundlage zurück, das von einer Detektion fluoreszenzmarkierter Antikörper mittels Laser unter dem Konfokalmikroskop gefolgt wird und damit die Messung von Molekül-Konzentrationen im pico- bis femtoliter Bereich erlaubt (Fischer, et al., 2015). In der Biomarkerforschung wurde die Technologie beispielsweise eingesetzt, um mHTT im Liquor zu messen (Wild, et al., 2015). Weiterhin ist der *Single-Molecule enzyme-linked immunosorbent assay* (Simoa<sup>TM</sup>) von Quanterix® zu nennen. Bei dieser Methode werden durch die Isolation Molekülgebundener, paramagnetischer Kügelchen in Vertiefungen mit Fassungsvermögen im femtoliter Bereich und durch Messung der Fluoreszenz einzelner

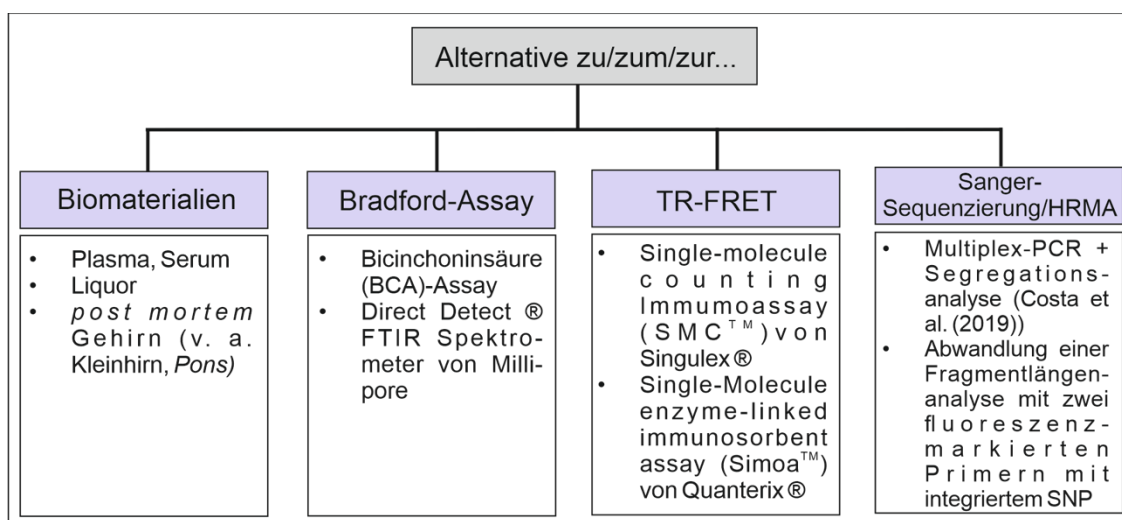
Proteine mit Enzymbindung sehr geringe Proteinkonzentrationen ( $< 10^{-15}$  M) erfasst (Rissin, et al., 2010; Fischer, et al., 2015). Auch Preische et al. (2019), Wilke et al. (2018) und Wilke et al. (2020) griffen bei ihren Biomarker-Forschungen zu neurodegenerativen Erkrankungen erfolgreich auf die Simoa-Technologie zurück.

Um die bisherigen Ergebnisse in PBMCs zu bestätigen, wäre auch eine alternative Methode zur Proteinquantifizierung anwendbar (Abbildung 58). Obwohl der Bradford-Assay leicht durchzuführen ist, muss er für das Erreichen hoher Sensitivitäten bei niedrigem pH-Wert durchgeführt werden (Chial, et al., 1993). Außerdem ist sein Ergebnis vom Anteil basischer Aminosäuren abhängig (Chial, et al., 1993; MERCK, n.d.). Als alternative Vorschläge sollen hier der Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay) und eine Infrarot-basierte Proteinquantifizierung beispielsweise mit dem Direct Detect<sup>®</sup> FTIR Spektrometer vom Millipore vorgestellt werden. Der BCA-Assay nutzt die sogenannte Biuret-Reaktion, eine Farbreaktion, die durch die Reaktion von Kupfer-Ionen mit Proteinen entsteht und deren Bindung proportional zur Proteinkonzentration abläuft (Smith, et al., 1985). Der Vorteil der infrarot-basierten Proteinquantifizierung gegenüber farb-basierten Methoden wie dem BCA-Assay oder dem Bradford-Assay liegt in der weitestgehenden Unabhängigkeit der Methode von der Aminosäurezusammensetzung des Proteins, den Farbstoffeigenschaften oder Redox-Potenzialen. Stattdessen werden hierbei Amidbindungen der Proteine gemessen (MERCK, n.d.).

Auch für die Genotypisierung der Polymorphismen sind noch weitere Methoden denkbar, die die Kohorte für die SNP-Analysen gewinnbringend vergrößern würden, um aussagekräftigere Ergebnisse zu erhalten (Abbildung 58). Costa et al. (2019) beschrieben am Beispiel von SCA3 eine Methode zur Genotypisierung durch Optimierung einer Multiplex-PCR mit anschließender Segregationsanalyse. Dabei genotypisierten sie auch die drei in dieser Promotion untersuchten SNPs, was Hoffnung auf eine schnelle Analyse in der Zukunft macht. Des Weiteren führte die medizinische Doktorandin Dorothea Schumann im Rahmen von ESMI und im Anschluss an diese Promotion eine Art Fragmentlängenanalyse zur Genotypisierung durch, die auf der Nutzung von Fluores-



zenzmarkierten Primern basiert, in deren Sequenz der zu untersuchende SNP inkludiert ist. Anhand einer anschließenden Fragmentlängenanalyse und Erkennung der Fluoreszenzmarkierung des spezifisch gebundenen Primers konnte zwischen nicht-expandiertem und expandiertem Allel unterschieden und der Genotyp des SNPs bestimmt werden. Damit gelang eine Methode, die eine einfache Genotypisierung des SNPs ATXN3 BP 987 erlaubte und in Zukunft auch für ATXN3 BP 1118 eine denkbare Option zur schnellen Analyse wäre. Im Falle einer Umsetzung einer alleine für SNPs konzipierten Studie wäre es interessant, mehrere Generationen von betroffenen Familien zu inkludieren, um Studien zum Einfluss des Genotyps auf die intergenerationale Variabilität des polyQ-Traktes zu ermöglichen, die bereits Thema verschiedener Haplotypstudien war (Maciel, et al., 1999; Martins, et al., 2008).



**Abbildung 58: Alternative Biomaterialien und Methoden der Probenverarbeitung.** Auf Grund der räumlichen Nähe zur Pathologie wäre die Messung von ATXN3 in Liquor für die Aussagekraft am idealsten, jedoch birgt dies aufgrund der Invasivität Risiken. Um die Bestimmung der ATXN3-Proteinlevel weiter zu verbessern bestehen Möglichkeiten zur Veränderung der Gesamtproteinbestimmung oder zur eigentlichen Messung von ATXN3, wobei hier vor allem der SMC™ von Singulex® und Simoa™ von Quanterix® zu nennen sind, die in der Biomarkerforschung bereits erfolgreich eingesetzt wurden. Die Effizienz der Genotypisierung und Schaffung einer größeren Kohorte für die SNP-Analysen ist ebenfalls erstrebenswert. TR-FRET = *Time-resolved fluorescence energy transfer*, HRMA = *High Resolution Melting Analysis*, SNP = Einzelnukleotidpolymorphismus, PCR = Polymerase-Kettenreaktion, SNP = Einzelnukleotidpolymorphismus.



## 6 Zusammenfassung

Die Ursache der autosomal-dominant vererbten, neurodegenerativen Erkrankung Spinocerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3) liegt in einer Mutation im *ATXN3*-Gen mit einer CAG-Expansion, die zur Expression des Polyglutamin-expandierten Proteins ATXN3 führt. Dieses neurotoxische Protein bewirkt vermutlich über Aggregate und Veränderung der Zellhomöostase den Neuronenuntergang umschriebener Gehirnregionen, was eine charakteristische Symptomatik mit Ataxie, Dysarthrie und zerebelläre Augenbewegungsstörungen hervorruft. Fehlendes ausführliches Wissen über die Physiologie von ATXN3 und die Pathogenese der Erkrankung ist einer der Gründe, weshalb bis heute weder symptomatische noch kurative Therapien für die Erkrankung zur Verfügung stehen. Therapierfolge in randomisiert, kontrollierten Studien sind gegenwärtig außerdem nur anhand klinischer Scores bewertbar, deren Sensitivität nicht zur Detektion einer Verbesserung der klinischen Symptomatik ausreicht.

In dieser Promotion im Rahmen der europaweiten, multizentrischen *European Spinocerebellar Ataxia Type3/Machado-Joseph-Disease Initiative* (ESMI) wurde deshalb an der Validierung von Biomarkern für die Erkrankung SCA3 gearbeitet. Sie sollen helfen Krankheitsprogression messbar zu machen und Therapieerfolge zu signalisieren. Die Nutzung hochstandardisierter Protokolle ermöglichte dabei eine einheitliche Verarbeitung der Biomaterialien EDTA-Blut und PBMCs (mononukleären Zellen des peripheren Blutes). Insgesamt wurden für 39 Kontrollprobanden, 17 präsymptomatische SCA3-Mutationsträger und 102 SCA3-Patienten die CAG-Länge, das ATXN3-Proteinlevel und die Genotypen dreier Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) bestimmt und statistisch analysiert.

Die CAG-Länge wurde als wichtigster Traitmarker zur Diagnosefindung bestätigt. Durch Korrelationen mit dem Alter bei Krankheitsbeginn (AAO) und dem Krankheitsprogressionsmarker CSDP (*cross-sectional disease progression*) präsentierte sich die CAG-Länge zusätzlich als Traitmarker mit prognostischem Charakter. Mutationsträger mit hoher Anzahl an CAG-Triplets im *ATXN3*-Gen

erkrankten früher im Leben, die Symptomatik schritt im Anschluss schneller und gravierender voran.

Die ATXN3-Proteinlevel wurden mit zwei Antikörper-Assays (MW1-D2 und 1C2-D2) im *Time-resolved fluorescence energy transfer* (TR-FRET) bestimmt. Da direkte Korrelationen mit der Krankheitsdauer (DD) und CSDP ausblieben, eignete sich ATXN3 nur bedingt als Krankheitsprogressionsmarker. In der relativ großen ESMI-Kohorte waren für ein AAO < 40 Jahre und größere Anzahl an CAG-Triplets lediglich Tendenzen zu höheren ATXN3-Proteinleveln auszumachen. Eine statistisch signifikante Korrelation zu den klinischen Scores SARA (*Scale of the Assessment of Rating of Ataxia*) und INAS (*Inventory of Non-Ataxia Symptoms*) bekräftigten auf der anderen Seite das Potenzial von ATXN3 zur zukünftigen Nutzung als Statemarker. Im Vergleich beider Antikörper-Assays überzeugte der 1C2-D2 Assay mit einer höheren Trennschärfe zwischen Kontrollprobanden und SCA3-Mutationsträgern.

Die Genotypisierung der SNPs identifizierte der Literatur entsprechend unter den kombinierten Genotypen aus ATXN3 BP 987 und 1118 C-A als den tragenden Haplotyp expandierter Allele, während nicht-expandierte Allele mit großer Häufung Träger des Haplotyps G-C waren. Zusätzlich imponierte das gehäufte Vorkommen der *full-length* Isoform ATXN3aS unter Mutationsträgern, der eine erhöhte Aggregationstendenz nachgesagt wird und in ESMI mit frühem AAO und hohem CSDP einherging. Die Genotypen der SNPs könnten somit in Zukunft als diagnostischer Traitmarker in die Diagnostik der Erkrankung SCA3 einfließen.

Zusammenfassend lieferte diese Promotion mit der CAG-Länge und den Genotypen der SNPs in *ATXN3* zwei potenzielle prognostische Traitmarker, die Auskunft über AAO und CSDP gaben, und mit dem ATXN3-Proteinlevel in PBMCs einen möglichen Statemarker für die Spinozerebelläre Ataxie Typ 3. Somit könnten Mutationsträger mit Erkrankungsrisiko frühzeitig einer Therapie zugeführt und Therapieerfolge in krankheitsmodifizierenden Studien überprüft werden.

## 7 Literaturverzeichnis

- Alves, S.**, Nascimento-Ferreira, I., Auregan, G., Hassig, R., Dufour, N., Brouillet, E., Deglon, N. (2008). Allele-Specific RNA Silencing of Mutant Ataxin-3 Mediates Neuroprotection in a Rat Model of Machado-Joseph Disease. *PLoS ONE*, 3(10), e3341. doi: 10.1371/journal.pone.0003341.
- Bettencourt, C.**, Santos, C., Montiel, R., de Carmo Costa, M., Cruz-Morales, P., Santos, L. R., Lima, M. (2010). Increased transcript diversity: novel splicing variants of Machado-Joseph Disease gene (ATXN3). *Neurogenetics*, 11, S. 193-202.
- Bichelmeier, U.**, Schmidt, T., Hübener, J., Boy, J., Rüttiger, L., Häbig, K., Riess, O. (2007). Nuclear Localization of Ataxin-3 Is Required for the Manifestation of Symptoms in SCA3: In Vivo Evidence. *The Journal of Neuroscience*, 27(28), S. 7418-7428.
- Bidinosti, M.**, Shimshek, D. R., Mollenhauer, B., Marcellin, D., Schweizer, T., Lotz, G. P., Weiss, A. (2012). Novel One-step Immunoassays to Quantify alpha-Synuclein, Applications for Biomarker Development and High-Throughput Screening. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(40), S. 33691-33705.
- Biomarkers Definitions Working Group.** (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 69(3), S. 89-95.
- Bradford, M. M.** (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, S. 248-254.
- Byrne, L. M.**, Rodrigues, F. B., Johnson, E. B., Wijeratne, P. A., De Vita, E., Alexander, D. C., Wild, E. J. (2018). Evaluation of mutant huntingtin und neurofilament proteins as potential markers in Huntington's disease. *Science Translational Medicine*, 10, doi: 10.1126/scitranslmed.aat7108.
- Chial, H. J.**, Thompson, H. B., & Splittgerber, A. G. (1993). A Spectral Study of the Charge Forms of Coomassie Blue G. *Analytical Biochemistry*, 209(2), S. 258-266.
- Coarelli, G.**, Brice, A., & Durr, A. (2018). Recent advances in understanding dominant spinocerebellar ataxias from clinical and genetic points of view. *F1000Research*, 7, doi: 10.12688/f1000research.15788.1.
- Collins, F. S.**, Brooks, L. D., & Chakravarti, A. (1998). A DNA Polymorphism Discovery Resource for Research on Human Genetic Variation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, S. 1229-1231.
- Costa, I. P.**, Almeida, B. C., Sequeiros, J., Amorim, A., & Martins, S. (2019). A Pipeline to Assess Disease-Associated Haplotypes in Repeat Expansion Disorders: The Example of MJD/SCA3 Locus. *frontiers in Genetics*, 10, doi: 10.3389/fgene.2019.00038.
- Coutinho, P.**, Ruano, L., Loureiro, J. L., Barros, J., Cruz, V. T., Tuna, A., Silva, M. C. (2013). Hereditary Ataxia and Spastic Paraplegia in Portugal. A Population-Based Prevalence Study. *JAMA Neurology*, 70(6), S. 746-755.
- Cui, X.**, Liang, Q., Liang, Y., Lu, M., Ding, Y., & Lu, B. (2014). TR-FRET Assay of Huntingtin Protein Fragments Reveal Temperature and PolyQ Length-

- Dependent Conformational Changes. *Scientific Reports*, 4, doi: 10.1038/srep05601.
- D'Abreu, A.**, Franca Jr, M. C., Paulson, H. L., & Lopes-Cendes, I. (2010). Caring for Machado-Joseph Disease: current understanding and how to help patients. *Parkinsonism Related Disorders*, 16(1), doi: 10.1016/j.parkreldis.2009.08.012.
- de Mattos, E. P.**, Kolbe Muskopf, M., Saraiva-Pereira, M. L., Bannach Jardim, L., & Leotti Torman, V. (2018). Genetic risk factors for modulation of age at onset in Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3: a systematic review and meta-analysis. *Neurogenetics*, 90(2), S. 203-210.
- Ding, D.**, Li, K., Wang, C., Chen, Z., Long, Z., Peng, Y., Jiang, H. (2016). ATXN2 polymorphism modulates age at onset in Machado-Joseph disease. *Brain*, 139(10), S. e59.
- Duarte-Silva, S.**, & Maciel, P. (2018). Pharmacological Therapies for Machado-Joseph Disease. In *Polyglutamine Disorders* (S. 369-394). Springer International Publishing AG.
- Durcan, T. M.**, & **Fon, E. A.** (2013). Ataxin-3 and its E3 partners: implications for Machdo-Joesph disease. *Frontiers in Neurology*, 4, doi: 10.3389/fneur.2013.00046.
- DZNE.** (kein Datum). *Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen, ESMI.* Zugriff am 28. Dezember 2018 von <https://www.dzne.de/forschung/studien/klinische-studien/esmi/>
- Eletr, Z. M.**, & Wilkinson, K. D. (2014). Regulation of proteolysis by human deubiquitinating enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta*, S. 114–128.
- Estrada-Rivadeneira, D.** (2017). Sanger Sequencing. *The FEBS Journal*, S. 4159-4161.
- Fischer, S. K.**, Joyce, A., Spengler, M., Yang, T.-Y., Zhuang, Y., Fjording, M. S., & Mikulskis, A. (2015). Emerging Technologies to Increase Ligand Binding Assay Sensitivity. *The AAPS Journal*, 17(1), S. 93-101.
- Fodale, V.**, Boggio, R., Daldin, M., Cariulo, C., Spiezia, M. C., Byrne, L. M., Bresciani, A. (2017). Validation of Ultrasensitive Mutant Huntingtin Detection in Human Cerebrospinal Fluid by Single Molecule Counting Immunoassay. *Journal of Huntington's Disease*, 6, S. 349-361.
- Full Proposal Application Form ESMI.** (n.d.). European Spinocerebellar Ataxia Type 3/Machado-Joesph-Disease.
- Furtado, G. V.**, de Oliveira, C. M., Bolzan, G., Saute, J. A., Saraiva-Pereira, M. L., & Jardim, L. B. (2019). State biomarkers for Machado Joseph disease: Validation, feasibility and responsiveness to change. *Genetics and Molecular Biology*, 42(1), S. 238-251.
- Gaspar, C.**, Lopes-Cendes, I., Hayes, S., Goto, J., Arvidsson, K., Dias, A., Brunt, E. (2001). Ancestral Origins of the Machado-Joeseph Disease Mutation: A Worldwide Haplotype Study. *The American Society of Human Genetics*, 68, S. 523-528.
- Harmuth, T.**, Prell-Schicker, C., Weber, J. J., Gellerich, F., Funke, C., Drießen, S., Hübener J. (2018). Mitochondrial Morphology, Function and Homeostasis Are Impaired by Expression of an N-terminal Calpain Cleavage Fragment of Ataxin-3. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 11:368, doi: 10.3389/fnmol.2018.00368.

- Harris, G.**, Dolezon, K., Gong, L., Gonzalez-Alegre, P., & Paulson, H. (2010). Splice Isoforms of the Polyglutamine Disease Protein Ataxin-3 Exhibit Similar Enzymatic yet Different Aggregation Properties. *PLoS ONE*, 5(10), e13695. doi: 10.1371/journal.pone.0013695.
- Jacobi, H.**, Tezenas du Montcel, S., Bauer, P., Giunti, P., Cook, A., Labrum, R., Rakowicz. (2015). Long-term disease progression in spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6: a longitudinal cohort study. *Lancet Neurology*, 14, S. 1101–1108.
- Kawaguchi, Y.**, Okamoto, T., Taniwaki, M., Aizawa, M., Inoue, M., Katayama, S., Kakizuka, A. (1994). CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nature Genetics*, 8, S. 221-228.
- Klockgether, T.** (2015). Does degeneration of the subthalamic nucleus prevent parkinsonism in spinocerebellar ataxia type 2 and type 3? *BRAIN*, 138(11), S. 3139-3140.
- Klockgether, T.**, Mariotti, C., & Paulson, H. L. (2019). Spinocerebellar ataxia. *Disease Primers*, 5(24), doi.org/10.1038/s41572-019-0074-3.
- Ko, J.**, Ou, S., & Patterson, P. H. (2001). New anti-huntingtin monoclonal antibodies: Implications for huntingtin conformation and its binding proteins. *Brain Research Bulletin*, 56(3/4), S. 319-329.
- Lang, A.**, Rogaeva, E., Tsuda, T., Hutterer, J., & St George-Hyslop, P. (1994). Homozygous Inheritance of the Machado-Joseph Disease Gene. *American Neurological Association*, 36, S. 443-447.
- Li, Q.-F.**, Cheng, H.-L., Yang, L., Ma, Y., Zhao, J.-J., Dong, Y., & Wu, Z.-Y. (2020). Clinical features and genetic characteristics of homozygous spinocerebellar ataxia type 3. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, e1314. doi: 10.1002/mgg3.1314.
- Li, Q.-F.**, Dong, Y., Yang, L., Xie, J.-J., Ma, Y., Du, Y.-C., Wu, Z.-Y. (2019). Neurofilament light chain is a promising serum biomarker in spinocerebellar ataxia type 3. *Molecular Neurodegeneration*, 14(1), doi: 10.1186/s13024-019-0338-0.
- Li, T.**, Hou, X., Chen, Z., Peng, Y., Wang, P., Xie, Y., Jiang, H. (2019). RNA Expression Profile and Potential Biomarkers in Patients With Spinocerebellar Ataxia Type 3 From Mainland China. *frontiers in Genetics*, 10, doi: 10.3389/fgene.2019.00566.
- Liew, M.**, Pryor, R., Palais, R., Meadows, C., Erali, M., Lyon, E., & Wittwer, C. (2004). Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms by High-Resolution Melting of Small Amplicons. *Clinical Chemistry*, S. 1156-1164.
- Maciel, P.**, Gaspar, C., DeStefano, A. L., Silveira, I., Coutinho, P., Radvany, J., Ros. (1995). Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease. *The American Journal of Human Genetics*, 57(1), S. 54-61.
- Maciel, P.**, Gaspar, C., Guimaraes, L., Goto, J., Lopes-Cendes, I., Hayes, S., Rouleau, G. A. (1999). Study of three intragenetic polymorphisms in the Machado-Joseph disease gene (MJD1) in relation to genetic instability of the (CAG)<sub>n</sub> tract. *European Journal of Human Genetics*, 7, S. 147-156.
- Martier, R.**, Sogorb-Gonzalez, M., Stricker-Shaver, J., Hübener-Schmid, J., Keskin, S., Klima, J., Konstanti. (2019). Development of an AAV-Based

- MicroRNA Gene Therapy to Treat Machado-Joseph Disease. *Molecular Therapy: Methods & Clinical Development*(15), S. 343-358.
- Martins, S.**, Coutinho, P., Silveira, I., Giunti, P., Jardim, L. B., Calafell, F., . . . Amorim, A. (2008). Cis-Acting Factors Promoting the CAG Intergenerational Instability in Machado–Joseph Disease. *American Journal of Medical Genetics Part B (Neuropsychiatric Genetics)*, S. 439–446.
- Matos, C. A.**, de Macedo-Ribeiro, S., & Carvalho, A. L. (2011). Polyglutamine diseases: The special case of ataxin-3 and Machado-Joseph disease. *Progress in Neurobiology*, 95, S. 26-48.
- Meira, A. T.**, Pedrosa, J. L., Boller, F., Franklin, G. L., Barsottini, O. G., & Teive, H. A. (2020). Reconstructing the History of Machado-Joseph Disease. *European Neurology*, 83(1), S. 99-104.
- MERCK.** (n.d.). *MERCK*. Zugriff am 12. August 2020 von <https://www.merckmillipore.com/DE/de/life-science-research/protein-detection-quantification/direct-detection-spectrometer/NWGb.qB.NtgAAAFBfBwRRkwm,nav>
- NCBI ATXN3.** (23. Dezember 2018). *NCBI ATXN3*. Zugriff im Januar 2019 von <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4287>
- NCBI rs1048755.** (2018). *Single Nucleotide Polymorphism Database rs1048755*. Zugriff am 2. August 2020 von <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1048755>,
- NCBI rs12895357.** (2018). *Single Nucleotide Polymorphism Database rs12895357*. Zugriff am 2. August 2020 von <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs12895357>
- NCBI rs7158733.** (2018). *Single Nucleotide Polymorphism Database rs7158733*. Zugriff am 2. August 2020 von <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs7158733>
- Nguyen, H. P.**, Hübener, J., Weber, J. J., Grueninger, S., Riess, O., & Weiss, A. (2013). Cerebellar Soluble Mutant Ataxin-3 Level Decreases during Disease Progression in Spinocerebellar Ataxia Type 3 Mice. *PLoS ONE*, 8(4), p. e62043. doi: 10.1371/journal.pone.0062043.
- NINDS.** (2010, Februar). *National Institute of Neurological Disorders and Stroke, Machado-Joseph Disease Fact Sheet*. Zugriff am 2. Januar 2019 von <https://www.ninds.nih.gov/Disorders/Patient-Caregiver-Education/Fact-Sheets/Machado-Joseph-Disease-Fact-Sheet>
- NM\_004993.6, N.** (kein Datum). *NCBI Gene*. Zugriff am 5. August 2020 von [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM\\_004993.6](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_004993.6)
- Paulson, H. L.**, Perez, M. K., Trotter, Y., Trojanowski, J. Q., Subramony, S. H., Das, S. S., Pittman, R. N. (1997). Intranuclear Inclusions of Expanded Polyglutamine Protein in Spinocerebellar Ataxia Type 3. *Neuron*, 19, S. 333-344.
- Peischle, O.**, Schulz, S. A., Apel, A., Kuhle, J., Kaeser, S. A., Barro, C., Sch. (2019). Serum neurofilament dynamics predicts neurodegeneration and clinical progression in presymptomatic Alzheimer's disease. *Nature Medicine*, 25, S. 277-283.
- Rapaso, M., & Lima, M.** (2018). Towards the Identification of Molecular Biomarkers of Spinocerebellar Ataxia Type 3 (SCA3)/Machado-Joseph



- Disease (MJD). In L. Pereira de Almeida, & C. Nobrega, *Polyglutamine Disorders* (Vol. Advances in Experimental Medicine and Biology 1049, S. 309-310). Basel: Springer International Publishing AG.
- Reed, G. H.**, Kent, J. O., & Wittwer, C. T. (2007). High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*, S. 597-608.
- Rieß, O.**, & Schöls, L. (1996). Machado-Joseph Erkrankung in Deutschland. Genetische Diagnostik und klinische Charakteristika. *Deutsches Ärzteblatt*, 93(17), S. 1108-1110. Zugriff am 6. Januar 2019 von <https://www.aerzteblatt.de/archiv/1308/Machado-Joseph-Erkrankung-in-Deutschland-Genetische-Diagnostik-und-klinische-Charakteristika>
- Rieß, O.**, Rüb, U., Pastore, A., Bauer, P., & Schöls, L. (2008). SCA3: Neurological features, pathogenesis and animal models. *The Cerebellum*, S. 125-137.
- Rissin, D. M.**, Kan, C. W., Campbell, T. G., Howes, S. C., Fournier, D. R., Song, L., Duffy, D. (2010). Single-Molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations. *Nature Biotechnology*, 28(6), S. 595–599.
- Rodríguez-Labrada, R.**, Martins, A. C., Magaña, J. J., Vazquez-Mojena, Y., Medrano-Montero, J., Fernandez-Ruiz, J., Cerecedo-Zapata, C. (2019). Founder Effects of Spinocerebellar Ataxias in the American Continents and the Caribbean. *Cerebellum*(19), S. 446–458.
- Sanger, F.**, Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, Vol.74(No.12), S. 5463-5467.
- Saute, J. A.**, & **Jardim, L. B.** (2018). Planning Future Clinical Trials for Machado-Joseph Disease. In C. Nobrega, & L. Pereira de Almeida, *Polyglutamine Disorders* (S. 321-348). Basel: Springer International Publishing AG.
- Schmidt, J.**, Schmidt, T., Golla, M., Lehmann, L., Weber, J. J., Hübener-Schmid, J., & Riess, O. (2016). In vivo assessment of riluzole as a potential therapeutic drug for spinocerebellar ataxia type 3. *Journal of Neurochemistry*, 138, S. 150-162.
- Schmitt, I.**, Linden, M., Khazneh, H., Evert, B. O., Breuer, P., Klockgether, T., & Wuellner, U. (2007). Inactivation of mouse Atxn3 (ataxin-3) gene increases protein ubiquitination. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 362, S. 734-739.
- Schmitz-Hübsch, T.**, Coudert, M., Bauer, P., Giunti, P., Globas, C., Baliko, L., Rola. (2008). Spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6. Disease severity and nonataxia symptoms. *Neurology*, 71, S. 982-989.
- Schmitz-Hübsch, T.**, Tezenas du Montcel, S., Baliko, L., Berciano, J., Boesch, S., Depondt, C., Szymanski. (2006). Scale for the assessment and rating of ataxia - Development of a new clinical scale. *Neurology*, 66, S. 1717-1720.
- Schöls, L.**, Reimold, M., Seidel, K., Globas, C., Brockmann, K., Hausten, T. K., Rüb, U. (2015). No parkinsonism in SCA2 and SCA3 despite severe neurodegeneration of the dopaminergic substantia nigra. *BRAIN*, 138(11), S. 3316-3326.

- Schöls, L.**, Vieira-Saecker, A. M., Schöls, S., Przuntek, H., Epplen, J. T., & Rieß, O. (1995). Trinucleotide expansion within the MJD1 gene presents clinically as spinocerebellar ataxia and occurs most frequent in German SCA patients. *Human Molecular Genetics*, 4(6), S. 1001-1005.
- Smith, P. K.**, Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Pronvenzano, M. D., Klenk, D. C. (1985). Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Analytical Biochemistry*, 150, S. 76-85.
- Switonski, P. M.**, Fiszer, A., Kazmierska, K., Kurpysz, M., Krzyzosiak, W. J., & Figiel, M. (2011). Mouse Ataxin-3 Functional Knock-Out Model. *Neuromolecular Medicine*, 13, S. 54-65.
- Taillon-Miller, P.**, Gu, Z., Li, Q., Hillier, L., & Kwok, P.-Y. (1998). Overlapping Genomic Sequences: A Treasure Trove of Single-Nucleotide Polymorphisms. *Cold Spring Harbour Laboratory Press*, S. 748-754.
- Teng, S.**, Madej, T., Panchenko, A., & Alexov, E. (2009). Modeling Effects of Human Single Nucleotide Polymorphisms on Protein-Protein-Interaction. *Biophysical Journal*, S. 2178-2188.
- Tonnen, L. J.**, Rigo, F., van Attikum, H., & van Roon-Mom, W. M. (2017, September). Antisense Oligonucleotide-Mediated Removal of the Polyglutamine Repeat in Spinocerebellar Ataxia Type 3 Mice. *Molecular Therapy: Nucleic Acids*, 8, S. 232-242.
- Trottier, Y.**, Cancel, G., An-Gourfinkel, I., Lutz, Y., Weber, C., Brice, A., Mandel, J.-L. (1998). Heterogeneous Intracellular Localization and Expression of Ataxin-3. *Neurobiology of Diseases*, 5, S. 335-347.
- Trottier, Y.**, Lutz, Y., Stevanin, G., Imbert, G., Devys, D., Cancel, G., Mandel, J.-L. (1995). Polyglutamine expansion as a pathological epitope in Huntington's disease and four dominant cerebellar ataxias. *Nature*, 378, S. 403-406.
- Twist, E. C.**, Casaubon, L. K., Ruttledge, M. H., Rao, V. S., Macleod, P. M., Radvany, J., Rouleau, G. A. (1995). Machado Joseph disease maps to the same region of chromosome 14 as the spinocerebellar ataxia type 3 locus. *Journal of Medical Genetics*, 32, S. 25-31.
- Wang, Z.**, & Moutt, J. (2001). SNPs, Protein Structure, and Disease. *Human Mutation*, S. 263-270.
- Ward, G.**, Simpson, A., Boscato, L., & Hickman, P. E. (2017). The investigation of interferences in immunoassay. *Clinical Biochemistry*, S. 1306-1311.
- Weir, D. W.**, Sturrock, A., & Leavitt, B. R. (2011). Development of biomarkers for Huntington's disease. *The Lancet Neurology*, 10(6), S. 573-590.
- Weishäupl, D.**, Schneider, J., Peixoto Pinheiro, B., Reuss, C., Dold, S. M., von Zweydford, F., Schmidt, T. (2019). Physiological and pathophysiological characteristics of ataxin-3 isoforms. *Journal of Biological Chemistry*, 294, S. 644-661.
- Weiss, A.**, Träger, U., Wild, E. J., Grueninger, S., Farmer, R., Landles, C., Andre, R. (2012). Mutant huntingtin fragmentation in immune cells tracks Huntington's disease progression. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(10), S. 3731-3736.
- Wild, E. J.**, Boggio, R., Langbehn, D., Robertson, N., Haider, S., Miller, J. R., Weiss, A. (2015). Quantification of mutant huntingtin protein in

- cerebrospinal fluid from Huntington's disease patients. *The Journal of Clinical Investigation*, 125(5), S. 1979-1986.
- Wilke, C.**, Bender, F., Hayer, S. N., Brockmann, K., Schöls, L., Kuhle, J., & Synofzik, M. (2018). Serum neurofilament light is increased in multiple system atrophy of cerebellar type and in repeat-expansion spinocerebellar ataxias: a pilot study. *Journal of Neurology*, 265, S. 1618-1624.
- Wilke, C.**, Haas, E., Reetz, K., Faber, J., Garcia-Moreno, H., Santana, M. M., Giunti, P. (2020). Neurofilaments in spinocerebellar ataxia type 3: blood biomarkers at the preataxic and ataxic stage in humans and mice. *EMBO Molecular Medicine*, 12(7), e11803. doi:10.15252/emmm.201911803.



## 8 Erklärung zum Eigenanteil

Diese Promotion wurde am Institut für Medizinische Genetik und angewandte Genomik der Universitätsklinik Tübingen durchgeführt und von Herrn Prof. Dr. Olaf Rieß betreut. Sie fand im Rahmen der *European Spinocerebellar Ataxia Type3/Machado-Joseph-Disease Initiative* (ESMI) statt, die von Frau Dr. rer. nat. Jeannette Hübener-Schmid (Post-Doc, Arbeitsgruppe SCA3 des Instituts für Medizinische Genetik und angewandte Genomik Tübingen) und Herrn Prof. Dr. Olaf Rieß mitkonzipiert wurde. Die Einarbeitung ins Labormanagement erfolgte durch Frau Dr. rer. nat. Jeannette Hübener-Schmid, in die DNA-Extraktion durch Herrn Patrik Pelz, in die Genotypisierung der Einzelnukleotidpolymorphismen durch die Praktikantin Frau Annika Lambert, in die Verarbeitung der PBMC-Proben und in die Messung der ATXN3-Proteinlevel im TR-FRET durch Dr. med. dent. Gabriele Anna Kaucher. Die Etablierung des MW1-D2 Assays des TR-FRETs war im Vorfeld im Rahmen der Promotion von Dr. med. Kathrin Gonsior in der Studie *NeurOmics* erfolgt, die des 1C2-D2 Assays durch Dr. med. dent. Gabriele Anna Kaucher. Zum Zeitpunkt des Beginns dieser Promotion waren bereits durch Dr. med. dent. Gabriele Anna Kaucher und Annika Lambert 37 Proben des SNPs ATXN3 BP 669, 22 des SNPs ATXN3 BP 987 und 20 des SNPs ATXN3 BP 1118 genotypisiert worden. Das ATXN3-Proteinlevel war zuvor für insgesamt 82 Probanden im MW1-D2 Assay und 77 Probanden im 1C2-D2 Assay durch Dr. med. dent. Gabriele Anna Kaucher bestimmt worden. Die Zusendung der Blut- und PBMC-Proben fand durch die europäischen ESMI-Partner statt. Die Fragmentlängenanalyse im *CEQ<sup>TM</sup>8000 Genetic Analysis System* erfolgte durch Alexandra Grenzendorf der diagnostischen Abteilung des Instituts.

Sämtliche Versuche wurden eigenständig von mir durchgeführt, statistisch ausgewertet und graphisch aufgearbeitet. Die Datenrecherche und Verfassung des Manuskriptes erfolgte alleine durch mich. Ich versichere, keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben. Die Korrektur des Manuskriptes wurde durch Frau Dr. rer. nat. Jeannette Hübener-Schmid vorgenommen.

Tübingen, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Melanie Gansel

## 9 Präsentationen, Poster und Publikationen

### ESMI-Meeting, 28.05. – 29.05.2019, London:

- Vortrag, 28.05.2019: *Ataxin-3 measurements in PBMCs.*

### DGN-Kongress, 25.09 – 28.09.2019, Stuttgart:

- Poster-Session, 27.09.2020: *Validation of potential biomarkers in mononuclear cells in peripheral blood for the neurodegenerative disorder spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3).*

### Publikation:

Gonsior K., Kaucher G. A., Pelz, P. Schuhmann D., **Gansel M.**, Kuhs S., Klockgether T., Forlani S., Durr A., Hauser S., Rattay T. W., Synofzik M., Hengel H., Schöls L., Rieß O. H., Hübener-Schmid J. (2020). PolyQ-expanded ataxin-3 protein levels in peripheral blood mononuclear cells correlate with clinical parameters in SCA3: a pilot study. *Journal of Neurology*, <https://doi.org/10.1007/s00415-020-10274-y>.

- Zuarbeitung zu den Analysen im Paper. Es wurden keine Daten dieser Doktorarbeit veröffentlicht.

## 10 Danksagung

Ein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Olaf Rieß für die Betreuung meiner Promotion in seinem Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik am Universitätsklinikum Tübingen. Der Einblick in wissenschaftliche Arbeit in einem Labor und die Möglichkeit zur Präsentation meiner Daten institutsintern, auf dem DGN-Kongress in Stuttgart und auf dem ESMI-Meeting in London haben mir reflektiertes Betrachten und Interpretieren von Studiendaten ermöglicht, die mir in meiner späteren Laufbahn als Ärztin bei der Therapie meiner Patienten sicher zugute kommen werden.

Einen großen Dank möchte ich auch Dr. rer. nat. Jeannette Hübener-Schmid aussprechen. Zunächst einmal für die Vermittlung dieser Promotion, aber im Weiteren für die Schaffung einer herzlichen und offenen Arbeitsatmosphäre in der mehrfache Nachfragen und Unterstützung als selbstverständlich galten, für die behutsame Einarbeitung in den Laboralltag, für die schnellen und hilfreichen Korrekturen meines Manuskripts mit ehrlichem Feedback und Motivationsschüben, die zum erfolgreichen Abschluss dieser Promotion geführt haben.

Besonders herzlich war auch die Aufnahme in die Arbeitsgruppe SCA3 unter der Leitung von Dr. rer. nat. Thorsten Schmidt. Den Mitgliedern möchte ich für die Möglichkeit danken, jederzeit im Labor hilfsbereite Ansprechpartner zu finden und im geschützten Rahmen das Präsentieren wissenschaftlicher Arbeiten und meiner Ergebnisse zu üben.

Herzlichen Dank an alle Partner von ESMI für die Bereitstellung von Patientendaten, die klinische Untersuchung, die Kollektion von Biomaterialien und den Versand der Proben nach Tübingen.

Ein großer Dank gebührt auch allen Studienteilnehmern. Ohne die bereitwillige Partizipation und Untersuchungsbereitschaft von SCA3-Patienten und Kontrollprobanden sowie die Unterstützung durch deren Angehörige wäre die Forschung mit wertvollen menschlichen Biomaterialien nicht möglich gewesen.

Zum Schluss möchte ich mich bei Benedikt Hering, meinen Schwestern Daniela und Cathleen Gansel und meinen Eltern, Claudia und Werner Gansel, für das aufmerksame Korrekturlesen meines Manuskripts und die durchgängige Motivation und Unterstützung bedanken. Ich danke meinen Eltern insbesondere



auch für die finanzielle und emotionale Unterstützung, die diese Promotion mit Freisemester und vor allem mein Studium erst ermöglicht haben.