

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

**Therapieansatz mit Antisense-Oligonukleotiden in einem  
Mausmodell der Spinocerebellären Ataxie Typ 3**

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

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

**vorgelegt von**

**Krüger, Marie-Kristin**

**2026**

Dekanin: Professorin Dr. S. Y. Brucker

1. Berichterstatter: Professor Dr. O. Rieß

2. Berichterstatter: Professorin Dr. E. Reisinger

Tag der Disputation: 27.01.2025

*Für meine Familie*

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

|           |                                                                  |              |
|-----------|------------------------------------------------------------------|--------------|
| <b>1</b>  | <b>Einleitung .....</b>                                          | <b>- 1 -</b> |
| 1.1       | Spinocerebelläre Ataxie Typ 3 .....                              | - 1 -        |
| 1.1.1     | Einordnung der SCA3 in Polyglutamin-Erkrankungen.....            | - 1 -        |
| 1.1.2     | Klinik und Diagnose der SCA3 .....                               | - 2 -        |
| 1.1.3     | Epidemiologie der SCA3.....                                      | - 4 -        |
| 1.1.4     | Das Gen <i>Ataxin-3</i> .....                                    | - 5 -        |
| 1.1.4.1   | Einzelnukleotid-Polymorphismen in der SCA3 .....                 | - 6 -        |
| 1.1.5     | Die RNA des Ataxin-3 .....                                       | - 7 -        |
| 1.1.6     | Das Protein Ataxin-3 .....                                       | - 8 -        |
| 1.2       | SCA3-Tiermodelle .....                                           | - 13 -       |
| 1.3       | Bisherige Therapieansätze.....                                   | - 16 -       |
| 1.4       | Antisense-Oligonukleotide .....                                  | - 17 -       |
| 1.4.1     | Wirkprinzip einer ASO-Therapie .....                             | - 17 -       |
| 1.4.2     | Chemische Modifikationen der ASOs.....                           | - 19 -       |
| 1.4.3     | Chancen und Grenzen einer ASO-Therapie .....                     | - 21 -       |
| 1.4.4     | Praktikabilität einer ASO-Therapie .....                         | - 21 -       |
| 1.4.5     | ASO-Therapien mit Fokus auf neurodegenerativen Erkrankungen ...- | - 22 -       |
| 1.4.5.1   | Bisher zugelassene ASO-Therapien in Amerika und Europa .....     | - 23 -       |
| 1.4.5.1.1 | Behandlung der Spinalen Muskelatrophie mit Nusinersen .....      | - 23 -       |
| 1.4.5.1.2 | Behandlung der Duchenne Muskeldystrophie mit Eteplirsen ..-      | - 24 -       |
| 1.4.5.1.3 | Behandlung der hATTR mit Inotersen .....                         | - 25 -       |
| 1.4.5.1.4 | Behandlung der Amyotrophen Lateralsklerose mit Tofersen....      | - 26 -       |
| 1.4.5.2   | Klinische Studien zur ASO-Behandlung der HD .....                | - 26 -       |
| 1.4.5.3   | Bisherige ASO-Therapieansätze in der SCA3.....                   | - 28 -       |
| 1.4.5.3.1 | Präklinische ASO-Studien in der SCA3 .....                       | - 28 -       |
| 1.4.5.3.2 | Klinische ASO-Studien in der SCA3 .....                          | - 29 -       |
| 1.5       | Alternative gentherapeutische Therapieansätze der SCA3 .....     | - 30 -       |
| 1.5.1     | Therapieansätze mit MikroRNA .....                               | - 31 -       |

|           |                                                            |               |
|-----------|------------------------------------------------------------|---------------|
| 1.5.2     | RNA-Interferenz mittels <i>Small Interfering</i> RNA ..... | - 32 -        |
| 1.5.3     | RNA-Interferenz mittels <i>Small Hairpin</i> RNA.....      | - 33 -        |
| 1.6       | Zielsetzung dieser Arbeit .....                            | - 34 -        |
| <b>2</b>  | <b>Material und Methoden .....</b>                         | <b>- 37 -</b> |
| 2.1       | Material.....                                              | - 37 -        |
| 2.1.1     | Geräteverzeichnis .....                                    | - 37 -        |
| 2.1.2     | Reagenziensets (Kits) .....                                | - 39 -        |
| 2.1.3     | Chemikalien und Biochemikalien .....                       | - 40 -        |
| 2.1.4     | Medikamente .....                                          | - 41 -        |
| 2.1.5     | Enzyme .....                                               | - 41 -        |
| 2.1.6     | Puffer und Lösungen .....                                  | - 42 -        |
| 2.1.7     | Primer .....                                               | - 43 -        |
| 2.1.8     | Antikörper.....                                            | - 44 -        |
| 2.1.9     | Antisense-Oligonukleotide .....                            | - 44 -        |
| 2.1.10    | Verbrauchsmaterialien.....                                 | - 45 -        |
| 2.2       | Methoden.....                                              | - 47 -        |
| 2.2.1     | Tiere und Tierhaltung .....                                | - 47 -        |
| 2.2.1.1   | Tiermodell .....                                           | - 47 -        |
| 2.2.1.2   | Tierhaltung .....                                          | - 48 -        |
| 2.2.1.3   | Gewinnung von Ohrstanzen .....                             | - 48 -        |
| 2.2.1.4   | Gewichtserhebung .....                                     | - 49 -        |
| 2.2.1.5   | Stereotaktische Injektionen.....                           | - 49 -        |
| 2.2.1.6   | Nachsorge .....                                            | - 51 -        |
| 2.2.1.7   | Ablauf des <i>Beam-Walk</i> .....                          | - 53 -        |
| 2.2.1.8   | Gewinnung Blutserum.....                                   | - 54 -        |
| 2.2.1.9   | Maus-Präparationen.....                                    | - 55 -        |
| 2.2.2     | DNA .....                                                  | - 56 -        |
| 2.2.2.1   | DNA-Isolation aus Gewebe.....                              | - 56 -        |
| 2.2.2.2   | Polymerase-Kettenreaktion .....                            | - 56 -        |
| 2.2.2.2.1 | PCR zur Genotypisierung von YAC84Q-Mäusen.....             | - 57 -        |
| 2.2.2.2.2 | PCR zur Fragmentlängenanalyse .....                        | - 58 -        |
| 2.2.2.3   | Agarosegelelektrophorese .....                             | - 59 -        |

|           |                                                                           |               |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------|---------------|
| 2.2.2.4   | Fragmentlängenanalyse .....                                               | - 60 -        |
| 2.2.3     | RNA-Analysen .....                                                        | - 63 -        |
| 2.2.3.1   | RNA-Isolation .....                                                       | - 63 -        |
| 2.2.3.2   | Reverse Transkription für die <i>Two-Step</i> Teststrategie .....         | - 63 -        |
| 2.2.3.3   | Quantitative <i>Real-Time</i> -PCR mittels <i>Two-Step</i> Verfahren..... | - 64 -        |
| 2.2.3.4   | <i>One-Step</i> Kits.....                                                 | - 67 -        |
| 2.2.3.4.1 | <i>One-Step</i> Kit von <i>Luna Universal</i> .....                       | - 67 -        |
| 2.2.3.4.2 | <i>One-Step</i> Kit von Roche .....                                       | - 68 -        |
| 2.2.3.4.3 | <i>One-Step</i> Kit von Qiagen.....                                       | - 69 -        |
| 2.2.4     | Protein.....                                                              | - 70 -        |
| 2.2.4.1   | Proteinisolation.....                                                     | - 70 -        |
| 2.2.4.2   | Protein-Konzentrationsbestimmung .....                                    | - 71 -        |
| 2.2.4.3   | <i>Western Blot</i> .....                                                 | - 71 -        |
| 2.2.4.3.1 | Gelelektrophorese.....                                                    | - 72 -        |
| 2.2.4.3.2 | Immunoblot .....                                                          | - 73 -        |
| 2.2.5     | Statistische Analysen.....                                                | - 75 -        |
| <b>3</b>  | <b>Ergebnisse .....</b>                                                   | <b>- 76 -</b> |
| 3.1       | Inhalt des Ergebnisteils.....                                             | - 76 -        |
| 3.2       | Teil A: Etablierung der qRT-PCR.....                                      | - 76 -        |
| 3.2.1     | Etablierung der Standardreihe .....                                       | - 77 -        |
| 3.2.2     | Etablierung der Konzentration der Proben .....                            | - 79 -        |
| 3.2.3     | Etablierung der Primer.....                                               | - 80 -        |
| 3.2.3.1   | Relevanz der Schmelzkurven und Schmelzpunkte.....                         | - 81 -        |
| 3.2.3.2   | Ergebnisse der Primerpaar-Testung.....                                    | - 83 -        |
| 3.2.3.2.1 | Primerpaare für murines <i>Tbp</i> sowie für murines <i>Actin</i> .....   | - 83 -        |
| 3.2.3.2.2 | Primerpaare für murine <i>Pdh</i> sowie für murine <i>Sdha</i> .....      | - 84 -        |
| 3.2.3.2.3 | Primerpaare für humanes <i>ATXN3</i> .....                                | - 86 -        |
| 3.2.3.2.4 | Primerpaar für murines <i>Atxn3</i> .....                                 | - 89 -        |
| 3.2.3.3   | Zusammenfassung der Primeretablierung .....                               | - 91 -        |
| 3.2.4     | Etablierung der Teststrategie .....                                       | - 92 -        |
| 3.2.4.1   | Ergebnisse im <i>Two-Step</i> Verfahren .....                             | - 92 -        |
| 3.2.4.2   | Ergebnisse im Kit von Roche .....                                         | - 93 -        |

|           |                                                                 |         |
|-----------|-----------------------------------------------------------------|---------|
| 3.2.4.3   | Ergebnisse im Kit von Qiagen.....                               | - 94 -  |
| 3.2.4.4   | Ergebnisse im Kit von <i>Luna Universal</i> .....               | - 95 -  |
| 3.2.4.5   | Ergebnisse der Etablierung der Teststrategie .....              | - 96 -  |
| 3.2.5     | Finale Auswahl der Versuchsbedingungen .....                    | - 97 -  |
| 3.3       | Teil B: Ergebnisse der durchgeführten ASO-Studien .....         | - 98 -  |
| 3.3.1     | Ergebnisse der Studie 1 zu den allel-unspezifischen ASOs .....  | - 99 -  |
| 3.3.1.1   | Ablauf der Studie 1 .....                                       | - 99 -  |
| 3.3.1.2   | Ergebnisse der Genotypisierung in Studie 1 .....                | - 100 - |
| 3.3.1.3   | Aufbau der Studie 1 .....                                       | - 102 - |
| 3.3.1.4   | Durchschnittlicher Gewichtsverlauf nach Geschlecht in Studie 1- | 104 -   |
| 3.3.1.5   | Postoperative Beobachtungen in Studie 1 .....                   | - 105 - |
| 3.3.1.5.1 | Postoperatives Überleben in Studie 1 .....                      | - 105 - |
| 3.3.1.5.2 | Postoperativer Gewichtsverlauf in Studie 1 .....                | - 106 - |
| 3.3.1.5.3 | Prozentuale Gewichtsänderungen in Studie 1 .....                | - 108 - |
| 3.3.1.5.4 | Punktzahl in der postoperativen Nachsorge in Studie 2 .....     | - 110 - |
| 3.3.1.5.5 | <i>Wirehang</i> -Test nach ASO-Applikation in Studie 1 .....    | - 111 - |
| 3.3.1.6   | Ergebnisse der Präparation in Studie 1 .....                    | - 113 - |
| 3.3.1.7   | Ergebnisse der qRT-PCR in Studie 1 .....                        | - 113 - |
| 3.3.1.7.1 | Ergebnisse der Proben aus dem Cerebellum .....                  | - 114 - |
| 3.3.1.7.2 | Ergebnisse der Proben aus dem Hirnstamm .....                   | - 116 - |
| 3.3.1.7.3 | Ergebnisse der Proben aus dem Frontalen Cortex .....            | - 118 - |
| 3.3.1.8   | Zusammenfassung Studie 1 .....                                  | - 120 - |
| 3.3.2     | Ergebnisse der Studie 2 zu den allel-spezifischen ASOs .....    | - 122 - |
| 3.3.2.1   | Ablauf der Studie 2 .....                                       | - 122 - |
| 3.3.2.2   | Wirkprinzip der allel-spezifischen ASOs in Studie 2 .....       | - 123 - |
| 3.3.2.3   | Toxizitätsstudie .....                                          | - 124 - |
| 3.3.2.4   | Genotypisierung der Jungtiere in Studie 2 .....                 | - 125 - |
| 3.3.2.5   | Aufbau der Studie 2 .....                                       | - 126 - |
| 3.3.2.6   | Durchschnittlicher Gewichtsverlauf nach Geschlecht in Studie 2- | 128 -   |
| 3.3.2.7   | Postoperative Beobachtungen .....                               | - 129 - |
| 3.3.2.7.1 | Toxizität und Überleben in Studie 2 .....                       | - 129 - |
| 3.3.2.7.2 | Postoperativer Gewichtsverlauf in Studie 2 .....                | - 131 - |

|           |                                                              |                |
|-----------|--------------------------------------------------------------|----------------|
| 3.3.2.7.3 | Prozentuale Gewichtsänderungen in Studie 2 .....             | - 133 -        |
| 3.3.2.7.4 | Punktzahl in der postoperativen Nachsorge in Studie 2 .....  | - 134 -        |
| 3.3.2.7.5 | <i>Wirehang</i> -Test in Studie 2 .....                      | - 135 -        |
| 3.3.2.7.6 | Ergebnisse des <i>Beam-Walks</i> .....                       | - 137 -        |
| 3.3.2.8   | Ergebnisse der Präparation in Studie 2 .....                 | - 139 -        |
| 3.3.2.9   | Ergebnisse des <i>Western Blots</i> aus dem Cerebellum ..... | - 140 -        |
| 3.3.2.10  | Zusammenfassung Studie 2 .....                               | - 143 -        |
| <b>4</b>  | <b>Diskussion.....</b>                                       | <b>- 144 -</b> |
| <b>5</b>  | <b>Zusammenfassung .....</b>                                 | <b>- 171 -</b> |
|           | <b>Literaturverzeichnis .....</b>                            | <b>I</b>       |
|           | <b>Anhang.....</b>                                           | <b>XX</b>      |
|           | <b>Erklärung zum Eigenanteil .....</b>                       | <b>XXIV</b>    |
|           | <b>Danksagung.....</b>                                       | <b>XXV</b>     |

## Abbildungsverzeichnis

|                                                                                 |        |
|---------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Abbildung 1.1 Funktionsweise der Antisense-Oligonukleotide,.....                | - 18 - |
| Abbildung 1.2 Aufbau der im Rahmen dieser Promotion durchgeführten Studien .... | - 36 - |
| Abbildung 2.1 Schema zur Markierung mittels Ohrstanze .....                     | - 48 - |
| Abbildung 2.2 Die Schädelnähte Lambda und Bregma am Maus-Schädel .....          | - 49 - |
| Abbildung 2.3 Stereotaktische Apparatur .....                                   | - 51 - |
| Abbildung 2.4 Maus beim <i>Wirehang</i> -Test .....                             | - 52 - |
| Abbildung 2.5 Schmerzmittelgabe in der postoperativen Nachsorge .....           | - 53 - |
| Abbildung 2.6 <i>Beam-Walk</i> -Apparatur .....                                 | - 54 - |
| Abbildung 2.7 Beispielhaftes Ergebnis einer Fragmentlängenanalyse .....         | - 62 - |
| Abbildung 2.8 Aufbau der Blotkammer .....                                       | - 73 - |
| Abbildung 3.1 Ablauf der Etablierung der RNA-Analysen .....                     | - 76 - |
| Abbildung 3.2 Standardreihe in der <i>One-Step</i> qRT-PCR.....                 | - 78 - |
| Abbildung 3.3 Standardkurve in der <i>One-Step</i> qRT-PCR.....                 | - 79 - |
| Abbildung 3.4 Signale der Proben innerhalb der Standardreihe. ....              | - 80 - |
| Abbildung 3.5 Beispielhafte Schmelzkurve der PCR-Produkte.....                  | - 82 - |
| Abbildung 3.6 Aus den Schmelzkurven errechnete Schmelzpunkte.....               | - 83 - |
| Abbildung 3.7 Ergebnisse für das Primerpaar für murines Tbp .....               | - 84 - |
| Abbildung 3.8 Ergebnisse für das Primerpaar für murines Sdha .....              | - 85 - |
| Abbildung 3.9 Schmelzpunkte zum Primerpaar für murines Sdha .....               | - 85 - |
| Abbildung 3.10 Ergebnisse für das Primerpaar ATXN3 A.....                       | - 86 - |
| Abbildung 3.11 Schmelzpunkte zum Primerpaar ATXN3 A.....                        | - 87 - |
| Abbildung 3.12 Ergebnisse für das Primerpaar ATXN3 C .....                      | - 88 - |
| Abbildung 3.13 Schmelzpunkte zum Primerpaar ATXN3 C .....                       | - 89 - |
| Abbildung 3.14 Ergebnisse für das Primerpaar Atxn3 .....                        | - 90 - |
| Abbildung 3.15 Schmelzpunkte zum Primerpaar Atxn3 .....                         | - 90 - |
| Abbildung 3.16 Standardkurve im <i>Two-Step</i> -Verfahren.....                 | - 92 - |
| Abbildung 3.17 Standardreihe im Roche-Kit .....                                 | - 93 - |
| Abbildung 3.18 Standardkurve im Roche-Kit .....                                 | - 94 - |
| Abbildung 3.19 Standardreihe im Qiagen-Kit.....                                 | - 94 - |
| Abbildung 3.20 Standardkurve im Qiagen-Kit.....                                 | - 95 - |
| Abbildung 3.21 Aufbau der in dieser Promotion durchgeführten Studien.....       | - 98 - |

|                                                                               |         |
|-------------------------------------------------------------------------------|---------|
| Abbildung 3.22 Zeitstrahl der in Studie 1 durchgeführten Versuche.....        | - 99 -  |
| Abbildung 3.23 Gewichtsverlauf der YAC84Q-Mäuse in Studie 1 .....             | - 104 - |
| Abbildung 3.24 Postoperative Gewichtsverläufe in Studie 1 .....               | - 107 - |
| Abbildung 3.25 Prozentuale Gewichtsveränderungen in Studie 1 .....            | - 109 - |
| Abbildung 3.26 Ergebnisse des postoperativen <i>Scores</i> in Studie 1.....   | - 110 - |
| Abbildung 3.27 Ergebnisse des <i>Wirehang</i> -Tests in Studie 1 .....        | - 112 - |
| Abbildung 3.28 RNA-Expressionslevel des humAtaxin-3 im Cerebellum.....        | - 115 - |
| Abbildung 3.29 RNA-Expressionslevel des humAtaxin-3 im Hirnstamm .....        | - 117 - |
| Abbildung 3.30 RNA-Expressionslevel des humAtaxin-3 im Frontalen Cortex ..... | - 119 - |
| Abbildung 3.31 Zeitstrahl der in Studie 2 durchgeführten Versuche.....        | - 122 - |
| Abbildung 3.32 Funktionsweise der allel-spezifischen ASOs .....               | - 123 - |
| Abbildung 3.33 Gewichtsverlauf der Versuchstiere in Studie 2 .....            | - 128 - |
| Abbildung 3.34 Postoperative Gewichtsverläufe in Studie 2.....                | - 132 - |
| Abbildung 3.35 Prozentuale Gewichtsveränderungen in Studie 2 .....            | - 133 - |
| Abbildung 3.36 Ergebnisse des postoperativen <i>Scores</i> in Studie 2.....   | - 135 - |
| Abbildung 3.37 Ergebnisse des <i>Wirehang</i> -Tests in Studie 2 .....        | - 136 - |
| Abbildung 3.38 Exemplarische Ergebnisse des <i>Beam-Walks</i> .....           | - 138 - |
| Abbildung 3.39 Ergebnisse des <i>Beam-Walks</i> vor und nach Behandlung.....  | - 139 - |
| Abbildung 3.40 Ergebnisse des <i>Western Blots</i> aus dem Cerebellum .....   | - 142 - |
| Abbildung 4.1 Ergebnisse der in dieser Promotion durchgeführten ASO-Studien.. | - 169 - |

## Tabellenverzeichnis

|                                                                                   |       |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Tabelle 1.1 Studienlage zu ASO-Therapien in neurodegenerativen Erkrankungen...    | 22 -  |
| Tabelle 2.1 Geräteverzeichnis .....                                               | 37 -  |
| Tabelle 2.2 Verzeichnis der verwendeten Reagenziensets .....                      | 39 -  |
| Tabelle 2.3 Verzeichnis der verwendeten Chemikalien und Biochemikalien.....       | 40 -  |
| Tabelle 2.4 Verzeichnis der verwendeten Medikamente.....                          | 41 -  |
| Tabelle 2.7 Verzeichnis der verwendeten Primer.....                               | 43 -  |
| Tabelle 2.8 Verzeichnis der verwendeten Antikörper .....                          | 44 -  |
| Tabelle 2.9 Verzeichnis der verwendeten Antisense-Oligonukleotide .....           | 44 -  |
| Tabelle 2.10 Verzeichnis der verwendeten Verbrauchsmaterialien .....              | 45 -  |
| Tabelle 2.11 Verzeichnis der verwendeten Software und Internetressourcen.....     | 46 -  |
| Tabelle 2.12 Mastermix für die PCR zur Genotypisierung .....                      | 57 -  |
| Tabelle 2.13 Programm der PCR zur Genotypisierung .....                           | 58 -  |
| Tabelle 2.14 Mastermix für die PCR zur Fragmentlängenanalyse.....                 | 58 -  |
| Tabelle 2.15 Programm der PCR zur Fragmentlängenanalyse.....                      | 59 -  |
| Tabelle 2.16 Ablauf des Programmes Frag 3 zur Fragmentlängenanalyse .....         | 61 -  |
| Tabelle 2.17 Mastermix zur Reversen Transkription .....                           | 64 -  |
| Tabelle 2.18 Mastermix zur quantitativen PCR .....                                | 66 -  |
| Tabelle 2.19 Programm zur quantitativen PCR mit Schmelzprogramm .....             | 66 -  |
| Tabelle 2.20 Mastermix zur <i>Luna Universal</i> RT-qPCR.....                     | 67 -  |
| Tabelle 2.21 Programm zur <i>Luna Universal</i> RT-qPCR mit Schmelzprogramm ..... | 68 -  |
| Tabelle 2.22 Mastermix zur RT-qPCR von Roche.....                                 | 68 -  |
| Tabelle 2.23 PCR-Programm zur RT-qPCR von Roche mit Schmelzprogramm .....         | 69 -  |
| Tabelle 2.24 Mastermix zur RT-qPCR von Qiagen .....                               | 70 -  |
| Tabelle 2.25 PCR-Programm zur RT-qPCR von Qiagen mit Schmelzprogramm .....        | 70 -  |
| Tabelle 2.26 Bestandteile des Sammel- und des Trenngels .....                     | 72 -  |
| Tabelle 3.1 Vorstellung der getesteten Primerpaare.....                           | 81 -  |
| Tabelle 3.2 Ergebnisse der Primeretablierung.....                                 | 91 -  |
| Tabelle 3.3 Kriterien der Auswahl der Teststrategie bzw. des Kits .....           | 96 -  |
| Tabelle 3.4 Finaler Mastermix zur <i>Luna Universal</i> RT-qPCR .....             | 97 -  |
| Tabelle 3.5 Finales PCR-Programm zur <i>Luna Universal</i> RT-qPCR.....           | 97 -  |
| Tabelle 3.6 Längenbestimmung der CAG-Sequenz der Versuchstiere in Studie 1..      | 101 - |

|                                                                                    |       |
|------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Tabelle 3.7 Übersicht der optimalen Aufteilung der Versuchstiere in Studie 1 ..... | 102 - |
| Tabelle 3.8 Übersicht der verwendeten Tiere in Studie 1 .....                      | 103 - |
| Tabelle 3.9 Tierverluste in Studie 1 .....                                         | 106 - |
| Tabelle 3.11 Übersicht der Ergebnisse der Studie 1.....                            | 121 - |
| Tabelle 3.12 Ergebnisse der Genotypisierung in Studie 2 .....                      | 126 - |
| Tabelle 3.13 Übersicht der optimalen Aufteilung der Versuchstiere in Studie 2..... | 127 - |
| Tabelle 3.14 Übersicht der verwendeten Tiere in Studie 2 .....                     | 127 - |
| Tabelle 3.15 Toxizitätsaspekte der ASOs in Studie 2 .....                          | 131 - |
| Tabelle 3.17 Beobachtungen der Präparationen in Studie 2.....                      | 140 - |
| Tabelle 3.18 Übersicht der Ergebnisse Studie 2.....                                | 143 - |
| Tabelle 4.1 Publierte <i>in vitro</i> getestete ASO-Sequenzen in der SCA3.....     | 153 - |
| Tabelle 4.3 Koordinaten der ICV-Injektionen in den SCA3 ASO-Studien .....          | 163 - |
| Tabelle A <i>Scoresheet</i> für die postoperative Nachsorge in HG07-21G.....       | XX    |
| Tabelle B <i>Scoresheet</i> für die postoperative Nachsorge in HG06-21G.....       | XXI   |

## Abkürzungsverzeichnis

|            |                                                                      |
|------------|----------------------------------------------------------------------|
| 2'MOE      | Methoxyethylierung der 2'OH-Gruppe der Ribose                        |
| 2'O-Me     | Methylierung der 2'OH-Gruppe der Ribose                              |
| 3K Narkose | 3 Komponenten Narkose                                                |
| A          | Adenin                                                               |
| ALS        | Amyotrophe Lateralsklerose                                           |
| AMPA       | <i>3-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionic-Acid-Receptor</i> |
| Arg        | Arginin                                                              |
| ASO        | Antisense-Oligonukleotide                                            |
| ATXN3      | Ataxin-3                                                             |
| BCA        | <i>Bicinchoninic Acid</i>                                            |
| BHS        | Bluthirnschranke                                                     |
| C          | Cytosin                                                              |
| Cas        | <i>Crispr-Associated Proteins</i>                                    |
| CBP        | CREB-Binding-Protein                                                 |
| cDNA       | Komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )                       |
| Cp-Wert    | <i>Crossing-Point</i>                                                |
| Crispr     | <i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>     |
| DMD        | Duchenne Muskeldystrophie                                            |
| DNA        | Desoxyribonukleinsäure ( <i>Desoxyribonucleic Acid</i> )             |
| dNTP       | Desoxyribonukleosidtriphosphat                                       |
| DRPLA      | Dentatorubro-Pallidolysische Atrophie                                |
| dsRNA      | Doppelsträngige RNA ( <i>double stranded RNA</i> )                   |
| DUB        | Deubiquitinase                                                       |
| EDTA       | Ethylendiamintetraessigsäure                                         |
| EMA        | <i>European Medicines Agency</i>                                     |
| FDA        | <i>Food and Drug Administration</i>                                  |
| G          | Guanin                                                               |
| Gly        | Glycin                                                               |
| hATTR      | Hereditäre Transthyretin-Amyloidose                                  |
| HTT        | Huntingin                                                            |

|            |                                                                |
|------------|----------------------------------------------------------------|
| ICV        | Intracerebroventrikulär                                        |
| IgG        | Immunglobulin G                                                |
| Inas-Score | Inventory of Non-Ataxia Symptoms                               |
| kDa        | Kilo Dalton                                                    |
| KI         | Künstliche Intelligenz                                         |
| LNA        | <i>Locked Nucleic Acid</i>                                     |
| Mbl        | <i>Muscleblind</i>                                             |
| mRNA       | <i>Messenger RNA</i>                                           |
| MRT        | Magnetresonanztomographie                                      |
| mur        | Murin                                                          |
| mut        | Mutant                                                         |
| NES        | <i>Nuclear Export Signal</i>                                   |
| NFL        | <i>Neurofilament Light Chain</i>                               |
| NIH        | <i>National Institutes of Health</i>                           |
| NLS        | <i>Nuclear Localisation Signal</i>                             |
| NMDA       | N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor                                   |
| PBS        | <i>Phosphate-buffered saline</i>                               |
| PCAF       | P300/CBP-assoziiierter-Faktor                                  |
| PCR        | Polymerase Kettenreaktion ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> ) |
| PDH        | Pyruvatdehydrogenase                                           |
| Poly-Q     | Polyglutamin                                                   |
| PS         | Phosphothioat                                                  |
| PVDF       | Polyvinylidenfluorid                                           |
| Q          | Glutamin                                                       |
| qRT-PCR    | Quantitative <i>Real-Time</i> PCR                              |
| RNAse      | Ribonuklease                                                   |
| RIN        | <i>RNA Integrity Number</i>                                    |
| RISC       | <i>RNA Induced Silencing Complex</i>                           |
| RNA        | Ribonukleinsäure ( <i>Ribonucleic Acid</i> )                   |
| RNAi       | RNA-Interferenz                                                |
| ROG        | <i>Rhythmicity Of Gait</i>                                     |
| rpm        | <i>Revolutions per minute</i>                                  |

|            |                                                      |
|------------|------------------------------------------------------|
| Sara-Score | <i>Scale for the Assessment and Rating of Ataxia</i> |
| SBMA       | Spinobulbäre Muskelatrophie                          |
| SCA        | Spinocerebelläre Ataxie                              |
| SCA3       | Spinocerebelläre Ataxie Typ 3                        |
| SDHA       | Flavoprotein Untereinheit der Succinatdehydrogenase  |
| SDS        | Sodium Dodecyl Sulfat                                |
| shRNA      | <i>Small hairpin RNA</i>                             |
| siRNA      | <i>Small interfering RNA</i>                         |
| SMA        | Spinale Muskelatrophie                               |
| SMN        | <i>Survival</i> Motoneuron                           |
| SNP        | <i>Single-Nucleotide Polymorphism</i>                |
| SNALPs     | <i>Stable Nucleic Acid Lipid Particles</i>           |
| SOD1       | Superoxiddismutase 1                                 |
| T          | Thymin                                               |
| TBE-Puffer | Tris-Borat-EDTA Puffer                               |
| TBP        | TATA-box-binding-protein                             |
| TBS-T      | <i>Tris-buffered</i> Saline mit <i>Tween20</i>       |
| TTR        | Transthyretin Rezeptor                               |
| UIM        | <i>Ubiquitin-Interacting-Motif</i>                   |
| UTR        | <i>Untranslated Region</i>                           |
| UV         | Ultraviolett                                         |
| wt         | Wildtypisch                                          |
| YAC        | <i>Yeast Artificial Chromosome</i>                   |
| ZNS        | Zentrales Nervensystem                               |

# 1 Einleitung

## 1.1 Spinocerebelläre Ataxie Typ 3

Die Spinocerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3) ist eine autosomal dominant vererbte neurodegenerative Erkrankung, die erstmals zwischen 1972 und 1976 beschrieben wurde (Nakano et al., 1972; Rosenberg et al., 1976; Woods & Schaumburg, 1972). Sie ist die weltweit am häufigsten vorkommende autosomal dominant vererbte Ataxie (Bettencourt & Lima, 2011; Paulson, 2007). Die SCA3 gehört zu den Spinocerebellären Ataxien. Diese sind von weiteren Ataxie-Definitionen abzugrenzen. Der Begriff „Ataxie“ beschreibt einerseits eine Gangstörung, andererseits lassen sich cerebelläre Ataxien von sensiblen Ataxien unterscheiden. Dabei wird der Ursprung - im Kleinhirn oder in den sensorischen Afferenzen aus der Peripherie - unterschieden. Mittlerweile sind mehr als 40 Subtypen an Spinocerebellären Ataxien beschrieben worden (NeuromuscularDiseaseCenter, 2024).

### 1.1.1 Einordnung der SCA3 in Polyglutamin-Erkrankungen

Bei der Spinocerebellären Ataxie Typ 3 handelt es sich um eine Polyglutamin-Erkrankung bzw. eine CAG-Wiederholungs-Erkrankung. Außer der SCA3 lassen sich 5 weitere Ataxien (SCA1, 2, 6, 7 und 17) der Poly-Q-Gruppe zuordnen. Ebenfalls zählen die Huntington-Erkrankung (HD), die Spinobulbäre Muskelatrophie (SBMA) sowie die Dentatorubro-Pallidolysische Atrophie (DRPLA) dazu (Riess et al., 2008). Neu hinzugekommen ist die Huntington Disease-like 2 als 10. Erkrankung (Costa Mdo & Paulson, 2012). Alle diese werden autosomal dominant vererbt. Eine Ausnahme stellt die SBMA dar, welche autosomal rezessiv vererbt wird (Finkel et al., 2017).

Die größte Gemeinsamkeit besteht im Vorliegen einer Polyglutamin-Kette im Erkrankungsprotein, die sich aus einer vorliegenden CAG-Wiederholung im codierenden Abschnitt des betroffenen Gens ergibt. Dadurch neigen alle Erkrankungsproteine zur Fehlfaltung und der Bildung von Aggregaten sowie Inklusionen in den Zellen bzw. Zellkernen des zentralen Nervensystems (ZNS). Es wird von einem daraus resultierenden toxischen Funktionsgewinn ausgegangen. Die Krankheitsproteine werden bei allen Krankheitsbildern mit Ausnahme der SCA6 und der SBMA ubiquitär im ZNS exprimiert.

Bei allen Entitäten zeigt sich eine selektive ZNS-Degeneration. Die Veränderungen zeigen sich für jede Erkrankung in spezifischen Bereichen und Zelltypen. Die Pathologie und klinische Symptomatik sind spezifisch für die jeweilige Erkrankung aufgrund der unterschiedlichen Proteinfunktionen. Es ist daher essenziell, die physiologische Funktion der Erkrankungsproteine zu kennen, um die pathologischen Veränderungen zu verstehen. Dennoch besteht die Möglichkeit, dass therapeutische Ansätze für eine der Krankheiten auf die anderen des Formenkreises übertragen werden können (Costa Mdo & Paulson, 2012; Rodrigues et al., 2007).

### 1.1.2 Klinik und Diagnose der SCA3

Das Wort Ataxie leitet sich vom Griechischen „Ataxia“ ab, was so viel wie „in Unordnung“ bedeutet. Konkret liegt eine Koordinationsstörung vor, die sich auf die verschiedenen motorischen Systeme auswirkt. Es ist festzuhalten, dass die Klinik sehr variabel ausfallen kann.

Anfangs zeigt sich meist eine progressive Gangstörung. Dysarthrie und Dysphagie sind häufige Symptome, die im Verlauf eine Kachexie bewirken. Darüber hinaus fällt es den PatientInnen zunehmend schwer, gezielte Folgebewegungen auszuführen. Im Verlauf entwickelt sich oft eine okulomotorische Komponente wie die Entwicklung eines Nystagmus, verlangsamte Sakkaden oder entkoppelte Bewegungen der Augen mit daraus resultierenden Doppelbildern sowie ein Exophthalmus. Im fortgeschrittenen Krankheitsstadium können eine Ophthalmoplegie sowie fazial-linguale Faszikulationen auftreten. Häufig kommt das *Restless-Legs*-Syndrom vor. Ebenso kann das vestibuläre System betroffen sein, was zu Gleichgewichtsproblemen führt und die Gangunsicherheit aggravieren kann. Peripher zeigt sich bei manchen Betroffenen eine sensorische und motorische Polyneuropathie. Starke kognitive Einschränkungen kommen dagegen weniger vor. Nur selten entwickelt sich eine leichte Demenz (Bettencourt & Lima, 2011; Fowler, 1984; Klockgether et al., 1999; Paulson, 2012; Paulson & Shakkottai, 1993; Riess et al., 2008; Rosenberg, 1992; Schols et al., 1998).

Das durchschnittliche Ausbruchsalter der Erkrankung liegt zwischen 30 und 50 Jahren. Im Verlauf von 10 – 20 Jahren nach Ausbruch verstärkt sich die Symptomatik immer weiter. Die PatientInnen werden immobil und sind an den Rollstuhl gebunden, bis sie

## Einleitung

später bettlägerig werden. Die SCA3 verläuft 20-25 Jahre nach Ausbruch letal (Kieling et al., 2007). Terminal entwickeln sich oft Pneumonien, Dehydratation und ein Gewichtsverlust aufgrund der Schluckstörungen (Diallo et al., 2018; Rub et al., 2006)

„Spinocerebellär“ beschreibt die Lokalisation der zugrundeliegenden Schädigung im ZNS. Hauptsächlich liegt diese nämlich im Cerebellum (Rosenberg, 1992). Die Gewebsveränderungen zeigen sich makroskopisch in der Bildgebung. In der Magnetresonanztomographie (MRT) konnte eine Abnahme des Hirnvolumens der PatientInnen festgestellt werden. Genauer gesagt handelte es sich dabei um das Cerebellum, den Hirnstamm und das Putamen sowie das Striatum, also Anteile der Basalganglien. Es konnte keine Korrelation zwischen der CAG-Wiederholungsanzahl und dem Ausmaß der Volumenverringerung festgestellt werden (Klockgether et al., 1998).

Mikroskopisch entspricht dem eine Degeneration der Kleinhirnrinde mit Verlust der Purkinjezellen. Ebenso findet sich der Neuronenuntergang im Nucleus dentatus, der Substantia Nigra sowie in kranialen motorischen Nuclei wie auch im Pallidum und im Striatum (Durr et al., 1996; Takiyama et al., 1994). Außerdem tritt eine Gliose auf (Rosenberg, 1992).

„Spinalis“ bezieht sich auf das Rückenmark. Die Bewegungsprogramme und Pläne aus dem Kleinhirn werden über die spinocerebellären Bahnen ins Rückenmark weitergeleitet, um von dort auf die Muskulatur übertragen zu werden. Auf spinaler Ebene wurden im Vorderhorn des Rückenmarks histologische Veränderungen mit Degeneration der Motoneuronen gefunden. Außerdem ließ sich eine Demyelinisierung des Hinterstrangs, des lateralen kortikospinalen Trakts sowie des spinothalamischen Strangs feststellen (Rosenberg, 1992).

Die Kriterien zur klinischen Diagnose wurden erstmals 1980 definiert (Lima & Coutinho, 1980). Es gibt verschiedene *Scores*, die anhand von Untersuchungen zu einer Punktzahl kommen, die die individuelle Schwere der Symptomatik einstuft. Hauptsächlich werden der SARA-Score (*Scale for the Assessment and Rating of Ataxia*) sowie der INAS-Score (*Inventory of Non-Ataxia Symptoms*) verwendet.

## Einleitung

Der SARA-Score, der 2006 entwickelt wurde, evaluiert die motorischen Symptome anhand der folgenden Merkmale: Gang, Stand, Sitzen, Sprechen, Finger-Folge-Versuch, Finger-Nase-Versuch, Diadochokinese und Knie-Hacke-Test. Die ProbandInnen führen den Kriterien entsprechende motorische Aufgaben aus und werden durch den bzw. die UntersucherIn mit einer Punktzahl eingestuft (Schmitz-Hubsch et al., 2006). Es kann eine Punktzahl von 0 bis 40 erreicht werden, wobei 0 die Abwesenheit von Ataxie und 40 eine maximal ausgeprägte Symptomatik bedeutet. Es findet eine Trennung tatsächlich ataktischer ( $Score \geq 3$ ) von prä-ataktischen ( $Score < 3$ ) MutationsträgerInnen statt. Anhand dieser kann initial der Beginn und das Vorliegen der Ataxie gemessen und später der individuelle Verlauf der Erkrankung erfasst werden. Der Score soll die Beobachtungen des Untersuchers/ der Untersucherin objektivieren. Dennoch können Unterschiede in der Bewertung genauso wie eine individuelle Streuung durch die Tagesform des Patienten/ der Patientin vorliegen. Wichtig wird dies in Bezug auf die Beurteilung von Therapieversuchen bei PatientInnen.

Der INAS-Score dagegen beurteilt die Symptome, die nicht der Ataxie selbst geschuldet sind. Es gibt 30 Untersuchungsmerkmale, die den folgenden 16 Symptomen oder Syndromen zugeordnet werden: Areflexie, Hyperreflexie, Babinski-Reflex, Spastizität, Rigor, Amyotrophie, Faszikulationen, Myoklonien, Chorea, Dystonie, Ruhetremor, sensorische Beschwerden, okulomotorische Symptome des Hirnstamms (horizontale und vertikale Ophthalmoplegie, verlangsamte Sakkaden), Blasendysfunktion und kognitive Einschränkungen. So wird eine Punktzahl zwischen 0 und 16 vergeben (Schmitz-Hubsch et al., 2008).

### 1.1.3 Epidemiologie der SCA3

Die SCA3 ist eine seltene Krankheit (Paulson & Shakkottai, 1993). Es lässt sich ein eindeutiger Trend hinsichtlich der geographischen Verteilung erkennen. So erfolgte die Erstbeschreibung in portugiesischen Familien der Azorischen Insel São Miguel (Nakano et al., 1972), wo auch die höchste Prävalenz mit 23-39/ 100.000 zu verorten ist (DeAraujo, 2016).

Die beschriebenen Familien trugen die Namen Machado, Thomas und Joseph, woraus 1980 der anfängliche Name *Machado Joseph Disease (MJD)* durch Coutinho et al. vergeben wurde (Lima & Coutinho, 1980). Besonders häufig findet sich die SCA3 - außer in Portugal (Silveira et al., 2002) - in Japan (Shibata-Hamaguchi et al., 2009) und in Brasilien (Jardim et al., 2001) mit beschriebenen Frequenzen von 1-2/ 100.000. Es wird von einem Gründereffekt durch portugiesische EmigrantInnen ausgegangen (Gaspar et al., 2001; Silveira et al., 2002). Das durchschnittliche Erkrankungsalter beträgt 40 Jahre mit einer Spannweite von 4 (Carvalho et al., 2008) bis zu 70 Jahren (Bettencourt & Lima, 2011).

### 1.1.4 Das Gen *Ataxin-3*

Als monogenetische, autosomal dominant vererbte Krankheit liegt bei der Spinocerebellären Ataxie Typ 3 eine krankheitsauslösende Mutation vor. Das entsprechende Gen wurde *Ataxin-3 (ATXN3)* genannt. Das daraus translatierte Protein ist das Ataxin-3 (ATXN3). Im C-terminal liegenden Exon 10 des *ATXN3* befindet sich eine CAG-Wiederholungssequenz, welche im zugehörigen Protein zu einer Polyglutamin-Kette führt (Ichikawa et al., 2001; Kawaguchi et al., 1994; Schols, Vieira-Saecker, et al., 1995).

Das betroffene Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 14q24.3-q32 lokalisiert. (Takiyama et al., 1993). Im Jahr 1994 entschlüsselten Kawaguchi et al. den der MJD zugeordneten genauen Locus 14q32.1 der Mutation (Kawaguchi et al., 1994). Nahezu gleichzeitig wurde durch Schöls et al. die Mutation, die die SCA3 auslöst, auf Chromosom 14q verortet. Es wurde entdeckt, dass sich die beiden Mutationen entsprechen. So konnten die MJD und SCA3 als eine Entität zusammengeführt werden (Schols, Vieira-Saecker, et al., 1995).

Auch bei Gesunden liegt eine CAG-Wiederholung im *ATXN3* vor, diese enthält jedoch nur zwischen 12 und 44 Wiederholungen, während das expandierte Allel der Erkrankten zwischen 61-87 Wiederholungen enthalten kann (Durr et al., 1996; Kawaguchi et al., 1994; Maciel et al., 1995). Ein intermediärer Bereich liegt bei 45 - 60 Wiederholungen mit unvollständiger Penetranz des Phänotyps vor. (Da Silva et al., 2019; Kawaguchi et al., 1994). Es gibt eine inverse Korrelation zwischen der CAG-Wiederholungslänge und

dem Ausbruchsalter (Kawaguchi et al., 1994; Maciel et al., 1995). Das bedeutet, je mehr Wiederholungen vorliegen, desto früher treten die ersten Krankheitssymptome auf. Diese Korrelation zwischen Anzahl der CAG-Wiederholungen und dem Ausbruchsalter liegt laut Literatur zwischen ca. 50% und 90% (Bettencourt & Lima, 2011; Paulson, 2007). Außerdem scheinen Umwelteinflüsse, weitere genetische Faktoren, der Lebensstil sowie unbekannte Ursachen das Ausbruchsalter mitzubestimmen (Da Silva et al., 2019). Die Schwere der Krankheit steigt mit zunehmender Wiederholungsanzahl (Maciel et al., 1995). Auch die Letalität steigt mit Anzahl der Wiederholungen, entsprechend ist die Überlebenszeit nach Krankheitsausbruch geringer, je mehr CAG-Wiederholungen es gibt (Kieling et al., 2007).

Bei der Vererbung des Gens, also der Transmission, ist die Anzahl der CAG-Wiederholungen stabil, dennoch kann es auch zu Veränderungen zwischen Eltern und Nachkommen kommen. Die Instabilität ist bei Weitergabe durch den Vater stärker ausgeprägt als bei der mütterlichen Vererbung (Maciel et al., 1995). Bei Expansion der Wiederholungsanzahl bei der väterlichen Vererbung wird von Antizipation des Phänotyps gesprochen (Riess et al., 2008). Insgesamt findet eine leichte Zunahme von 0,84 Wiederholungen pro Vererbung statt (Maciel et al., 1995).

### 1.1.4.1 Einzelnukleotid-Polymorphismen in der SCA3

Unter einem sogenannten Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP, kurz für *Single-Nucleotide Polymorphism*) versteht man die genetische Variation eines einzelnen Basenpaares, die vor allem vererbt wird und weniger *DeNovo* auftritt. Polymorphismen können mit anderen Mutationen in einem benachbarten oder im selben Genabschnitt assoziiert sein. Durch die Basenvariation im SNP ergibt sich ein verändertes Basentriplett, welches „stumm“ bleiben kann, also ohne Veränderung der zugehörigen Aminosäure oder zur Änderung dieser in der Translation führen kann. Auch das Auftreten eines Stopp-Codons bzw. die Vertauschung eines solchen gegen eine weitere Aminosäure mit Verlängerung der Aminosäurekette ist möglich. Das Vorliegen eines entsprechenden SNPs kann die Wahrscheinlichkeit des Vorhandenseins einer anderen Mutation vorhersagen bzw. damit korreliert werden. Dies bedeutet einen diagnostischen Vorteil. Weiterhin können SNPs auch therapeutisch genutzt werden. Es können Therapien

entwickelt werden, die den Krankheits-korrelierten SNP binden. So wird nur das pathologische Allel, nicht aber das wildtypische - also das gesunde Allel - reguliert.

Auch das expandierte *ATXN3* weist assoziierte Polymorphismen auf. Bekannt sind besonders drei intragenisch liegende Polymorphismen. Der SNP c.987G>C (rs12895357) liegt nahe dem 3' Ende des Abschnittes mit den CAG-Wiederholungen, wobei das wildtypische *ATXN3* häufig ein Guanin (G), das mutante *ATXN3* eine Base Cytosin (C) trägt. In der Aminosäuresequenz wird dadurch Glycin an Position 306 zu Arginin (p.Gly306Arg). Dieser SNP ist bei mehr als 70% der bekannten SCA3-PatientInnen vorhanden, bei den Tübinger PatientInnen sogar in 100% der Fälle, während er nur bei 2% der Normalbevölkerung vorkommt (Alves et al., 2010; Hauser et al., 2022). Er bietet sich gut für eine allel-spezifische Genregulation an. Außerdem wurden der SNP c.669T>C (rs75882680) und der SNP c.1118A>T (rs7158733) beschrieben (Goto et al., 1997; Maciel et al., 1999), welche zu verschiedenen Aminosäureketten und damit Isoformen des späteren Proteins führen (siehe Kapitel 1.1.6).

### 1.1.5 Die RNA des Ataxin-3

In weiteren Studien wurde der Fokus auch auf die veränderte RNA und damit verbundene potenziell toxische Effekte gelegt (Li & Bonini, 2010; Li et al., 2008; Tsoi et al., 2011).

Die RNA-Toxizität spielt in manchen neurodegenerativen Krankheiten sogar die Hauptrolle, in der SCA3 wird ihr bisher ein Nebeneffekt zugeschrieben. Es werden Effekte auf die Proteinfunktion, Einflüsse auf die Signalwege der RNA-Interferenz (RNAi) und auf wichtige Signalwege der Zellhomöostase unterschieden.

Für eine normale Translation liegen verschiedene RNA-bindende Proteine in der Zelle vor. Die mutante RNA bindet diese auf eine andere Art, was zu einem Aktivitätsverlust führen kann. Außerdem erkannten Li et al. 2008, dass die CAG-Wiederholungen in der RNA auf den Spleißfaktor *Muscleblind* (Mbl) wirken. Es wurde gezeigt, dass auch durch untranslatierte RNA eine Neurodegeneration in *Drosophila* stattfand, obwohl kein mutantes Protein vorlag (Li et al., 2008). Dies legt nahe, dass auch die mutante RNA unabhängig vom Protein an der Entstehung der SCA3 mitwirkt.

Weiterhin konnten Aggregate der RNA, die die CAG-Wiederholungen tragen, im Nucleus transgener *Drosophila* Fliegen detektiert werden. Dabei wurde das U2AF50 Gen untersucht, welches für den nukleären Transport von RNA zuständig ist. Die nukleäre

Ablagerung verstärkte sich bei einer reduzierten Expression dieses Gens. Auch in symptomatischen transgenen SCA3 Mäusen war das U2AF50 Gen herunterreguliert, wodurch sich die nukleären RNA-Ablagerungen zeigten. Die RNA-Aggregate traten unabhängig von Protein ATXN3-Aggregaten auf. Weiterhin wurde bewiesen, dass auch das humane U2AF50 mit der veränderten Ataxin-3 RNA interagiert, insofern kann ein ähnlicher Mechanismus beim Menschen erwartet werden (Tsoi et al., 2011).

Es ist ebenfalls zu vermuten, dass sich die veränderte RNA auf die Expression von ATXN3 selbst auswirkt. Die Mutation der SCA3 befindet sich im translatierten Bereich. Liegen dort Veränderungen vor, kann dies auch die Translation selbst beeinflussen. Li et al. fügten 2008 eine CAA-Insertion in den Bereich der CAG-Wiederholungen in *Drosophila* ein, wodurch sich die RNA-Protein-Ratio weiter in Richtung Protein verschob (Li et al., 2008). So deutet sich an, dass RNA-Veränderungen die Proteinbiosynthese beeinflussen.

### 1.1.6 Das Protein Ataxin-3

Das in der Translation entstehende Protein wird Ataxin-3 (ATXN3) genannt. Es ist ein 40-43 kDa schweres zelluläres Protein (Costa Mdo & Paulson, 2012; Wang et al., 1997), welches ubiquitär im Körper exprimiert wird (Bettencourt & Lima, 2011; Ichikawa et al., 2001; Paulson, Das, et al., 1997). Die CAG-Wiederholungen übersetzen sich in eine verlängerte Glutamin-(Q)-Kette, auch PolyQ-Bereich genannt. Das ATXN3 ist ein evolutionär hochkonserviertes Protein, da es sich in vielen Spezies wiederfindet. Dies kann bei der Erforschung der Pathologie hilfreich sein und die Übertragbarkeit von Tiermodellen auf den Menschen gewährleisten (Rodrigues et al., 2007; Yu et al., 2009). N-terminal trägt das Protein die hochkonservierte Josephin-Domäne. Darauf folgen die sogenannten *Ubiquitin Interacting Motifs* (UIM). Dies sind Stellen, an denen ATXN3 mit Ubiquitin-Ketten interagieren kann (Berke et al., 2005). Am unstrukturierten C-Terminus findet sich der PolyQ-Bereich.

Physiologisch fungiert ATXN3 als Deubiquitinase (DUB). Dies wurde damit gezeigt, dass ATXN3 deubiquitiniert, Ubiquitinketten von ubiquitinierten Substraten abspalten kann und vom Ubiquitin-Proteasen-Inhibitor Ubiquitin-Aldehyd gebunden wird (Burnett et al., 2003; Mao et al., 2005; Scheel et al., 2003). Der C-Terminus mit den

UIMs bindet das ubiquitinierte Protein, während die Josephin-Domäne die Spaltung, also die Enzymfunktion, ausführt (Burnett et al., 2003). ATXN3 bindet und deubiquitiniert ubiquitinierte Proteine erst ab einer Mindestlänge von 4 oder mehr Ubiquitin-Einheiten, wie es typisch für den proteasomalen Abbau ist (Burnett et al., 2003; Rodrigues et al., 2007). Damit scheint es an der proteasomalen Funktion der Zelle beteiligt zu sein, erweist sich aus aktueller Sicht jedoch nicht als obligatorisch für eine gesunde Zellfunktion (Rodrigues et al., 2007; Schmitt et al., 2007).

Der genaue Pathomechanismus zwischen dem veränderten Protein und der vorhandenen Symptomatik in der SCA3 ist noch nicht ausreichend geklärt, dennoch wurden viele Hypothesen dazu aufgestellt und untersucht. Durch das Vorliegen des Polyglutamin-Abschnittes wird die Faltung des ATXN3 verändert und dessen Tertiär- bzw. Quartärstruktur gestört. Im Besonderen neigt es zur Aggregatbildung, was durch die zellinterne Prozessierung des Proteins noch verstärkt wird. Die Aggregate weisen selbst eine Ubiquitinierung auf (Paulson, Perez, et al., 1997). Sie beinhalten das C-terminale PolyQ-tragende Ende des ATXN3, Transkriptionsfaktoren, molekulare Chaperone und Anteile des 26S Proteasoms (Hubener et al., 2013). Wildtypisches *full-length* ATXN3 wird vermehrt in die Aggregate rekrutiert, wenn ein PolyQ-Bereich im Protein vorliegt. Fehlt dieser, neigt es weniger zur Aggregation (Paulson, Perez, et al., 1997). *In vitro* konnte keine veränderte Aktivität der Deubiquitinase-Funktion des ATXN3 in der expandierten Form festgestellt werden (Winborn et al., 2008).

Normalerweise liegt das wildtypische ATXN3 im Zytoplasma vor, während das mutante ATXN3 auch vermehrt in Aggregaten im Zellkern vorzufinden ist (Paulson, Das, et al., 1997; Paulson, Perez, et al., 1997; Trottier et al., 1998). Um den Mechanismus zu erforschen, der dies bewirkt, wurde 2007 ein transgenes Mausmodell für *ATXN3* mit 148 CAG-Wiederholungen entwickelt, deren ATXN3 mit einem externen Kernexportsignal (NES, *Nuclear Export Signal*) versehen wurde. Die Wiederholungsanzahl lag mit 148 deutlich über der Wiederholungsanzahl symptomatischer PatientInnen, die Symptome sowie die Aggregatmenge fielen daher im Modell deutlich stärker aus als bei PatientInnen der SCA3 beschrieben. Die transgenen Tiere, welche das humane ATXN3 mit 148Q und einem bekannten NES exprimierten, wiesen weniger ATXN3 im Zellkern auf, was mit

einem schwächeren neurologischen Phänotyp assoziiert war als die transgenen Tiere mit humanem ATXN3 mit 148Q ohne NES (Bichelmeier et al., 2007). In derselben Studie wurden transgene Mäuse mit dem humanen ATXN3 mit 148Q sowie einem bekannten Kernlokalisierungssignal (NLS, *Nuclear Localisation Signal*) versehen, wodurch vermehrte intranukleäre Aggregate sowie aggravierte Symptome beobachtet wurden (Bichelmeier et al., 2007). Daraus wurde geschlossen, dass das intranukleäre Vorliegen des ATXN3-Proteins entscheidend an der Entstehung der SCA3 mitwirkt (Bichelmeier et al., 2007). Zwei Jahre später wurden interne NLS sowie NES im humanen ATXN3 gefunden, die den Transport der löslichen Form zwischen Zytoplasma und Zellkern steuern (Antony et al., 2009). Vor allem die internen NES sind deutlich schwächer als das im zuvor beschriebenen transgenen Mausmodell einklonierte NES. Dies erklärt, wieso die internen NES möglicherweise nicht ausreichen, um die nukleäre ATXN3-Aggregatbildung bei PatientInnen zu verhindern (Antony et al., 2009). Die Josephin-Domäne trägt die NES, die NLS liegen eher C-terminal (Kristensen et al., 2018; Pozzi et al., 2008).

Da in den intranukleären Ablagerungen vornehmlich der PolyQ-Bereich gefunden werden kann, wurde auch ein Mausmodell entwickelt, welches ein verändertes murines Atxn3 nur mit N-Terminus ohne C-Terminus mit PolyQ-Bereich trägt (Schmidt et al., 1998). Doch auch bei diesem Modell traten innerhalb eines Jahres motorische Symptome sowie ein vorzeitiger Tod auf. Diese Symptome waren vergleichbar mit einem anderen SCA3-Mausmodell mit *full-length* ATXN3 bzw. mit SCA3-PatientInnen. Dies deutet an, dass auch proteolytische Fragmente, die nur den N-Terminus beinhalten, zur Erkrankung beitragen (Hubener et al., 2011). Andererseits hatten sich in einem früheren *in vitro* Versuch mit N-terminalen Fragmenten keine unlöslichen Aggregate gezeigt (Perez et al., 1998).

Der Fokus wurde auch auf die proteolytische Spaltung des ATXN3 gelegt. Es liegt nahe, dass diese den nukleären Ablagerungen vorgeschaltet ist (Paulson, Perez, et al., 1997; Schmidt et al., 1998). Die Prozessierung findet durch zwei Hauptfamilien der Proteasen, die Caspasen und die Calpaine statt (Hubener et al., 2013). Es konnten zwei Hauptsplattstellen des ATXN3 an den Aminosäure-Stellen D208 und S256 gefunden werden (Weber et al., 2017). Dies führt bei der proteolytischen Spaltung durch die

## Einleitung

Calpaine zu einer Trennung des C-Terminus mit NLS vom N-Terminus mit NES. Dadurch konnte zwar keine veränderte Lokalisation der Aggregate beschrieben werden, jedoch erhöhte die proteolytische Spaltung die Aggregationsneigung (Weber et al., 2020). In einem transgenen Mausmodell wurde der Calpain-Inhibitor Calpastatin inhibiert - die Calpaine konnten also verstärkt arbeiten - was zu ausgeprägteren neurologischen Symptomen der Tiere führte (Hubener et al., 2013). Das expandierte ATXN3 zeigte sich sensitiver für den Abbau durch Calpaine als das wildtypische Protein mit besonderem Stellenwert des Calpain-2. Doch auch durch eine Reduktion des Calpain-1 konnte die Symptomatik in transgenen Mäusen verbessert werden (Weber et al., 2020). Die proteolytische Spaltung scheint aufgrund der Trennung der NES tragenden Bereiche von den NLS tragenden Bereichen einen wichtigen Einfluss auf die Pathogenese zu haben. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Fragmente, die den C-Terminus tragen, toxischer als das *full-length* ATXN3 sind (Goti et al., 2004; Paulson, Perez, et al., 1997). ATXN3 Fragmente scheinen außerdem einen toxischen Einfluss auf die Phagozytose und die Funktion des lysosomalen Abbaus in betroffenen Zellen zu haben (Harmuth et al., 2018).

*ATXN3* unterliegt in der Transkription alternativem Spleißen, wobei über 56 beschriebene verschiedene Spleiß Varianten entstehen (Bettencourt et al., 2010). Ein Großteil der Varianten beinhaltet ein vorzeitiges Stopp-Codon, oft auch vor dem mutationstragenden Exon 10, sodass die Variante gar nicht translatiert wird, sondern zelleigen abgebaut wird oder nicht PolyQ-tragend ist. Aus den übrigen translatierten Varianten ergeben sich verschiedene Isoformen des ATXN3-Proteins. Davon betreffen 7 beschriebene Isoformen die expandierte Variante (Bettencourt et al., 2010). Es finden sich drei Isoformen, die sich im C-Terminus unterscheiden (Goto et al., 1997). Diese Isoformen werden mit 3a - wobei es eine kürzere (3aK) und eine längere Variante (3aL) gibt - sowie mit 3c bezeichnet. Die Isoform 3c zeichnet sich durch ein drittes UIM aus. Dieses scheint jedoch nicht obligatorisch für die Bindung von Ubiquitin zu sein (Toonen et al., 2017). Die 3a Variante besitzt einen wesentlich unstrukturierteren C-Terminus. Bei der kürzeren 3a Variante liegt eine *Nonsense*-Mutation durch den im Kapitel 1.1.4.1 beschriebenen SNP c.1118A>T vor, welcher in der langen 3a Variante nicht vorkommt. In Untersuchungen zu den verschiedenen Funktionen und Eigenschaften der Isoformen stellte sich heraus, dass Isoform 3aK eine signifikant kürzere Halbwertszeit als die lange Variante 3aL

besitzt. Dies kann mit einem verstärkten Abbau der kurzen Isoform begründet werden. Zudem werden die verschiedenen Isoformen *in vitro* durch verschiedene Proteinabbau-Systeme degradiert. Alle Isoformen werden durch Autophagie abgebaut, Isoform 3aK dagegen zusätzlich über den Proteasomkomplex. Insgesamt weisen die expandierten Isoformen eine längere Halbwertszeit im Vergleich zu den wildtypischen Varianten auf (Weishaupl et al., 2019).

Auch die Lokalisation innerhalb der Zelle ist unterschiedlich, so liegt Isoform 3aK vermehrt im Zellkern vor. Weiterhin unterscheiden sich die Isoformen in der Affinität, mit der sie zelluläre Proteine binden. Unter anderem sind dies Proteine, die an der Pathogenese der Parkinson-Erkrankung oder der Huntington-Erkrankung beteiligt sind. Die beiden ATXN3a-Isoformen bilden im Vergleich zur ATXN3c-Isoform schneller Aggregate. Außerdem unterscheiden sich alle Isoformen in der Anzahl und Größe der Aggregate sowie ihrem generellen mikroskopischen Erscheinungsbild. Auch bei der zytosolischen Löslichkeit der Isoformen konnten Unterschiede entdeckt werden, wobei die 3aS-Form unlöslicher war als die anderen Formen und entsprechend mehr zur Aggregatbildung neigte. Ferner interagieren die verschiedenen Isoformen untereinander und stabilisieren sich gegenseitig. Auch die wildtypischen und expandierten Varianten interagieren, wobei die wildtypischen Isoformen die Löslichkeit der expandierten Isoformen verbessern und der Aggregatbildung entgegenwirken konnten (Weishaupl et al., 2019).

Weiterhin wurde ATXN3 eine Rolle im Transkriptionsprozess zugeschrieben. Durch die Bindung der Co-Aktivatoren *CREB-Binding-Protein* (CBP), p300 und über den P300/CBP-assoziierten-Faktor (PCAF) scheint es die Transkription hemmen zu können. Die Josephin-Domäne kann Histone binden und deren Acetylierungsfunktion hemmen, was ebenso inhibierend auf die Transkription wirkt (Li et al., 2002).

Es konnte gezeigt werden, dass Ubiquitinligasen der Mitochondrien N-terminal verkürztes mutantes ATXN3 ubiquitinieren, was zur Akkumulation des ATXN3 in Mitochondrien führt. Die Mitochondrien werden dabei in ihrem Aufbau und ihrer Funktion behindert. Es wird oxidativer Stress ausgelöst, da die Zellatmung eingeschränkt ist, was zu vermehrtem Zelltod führt. Dies wurde bereits als Pathomechanismus in anderen neurodegenerativen Krankheiten wie Morbus Alzheimer, aber auch für die mit

der SCA3 verwandten HD beschrieben (Costa et al., 2010; Harmuth et al., 2018). Ferner finden sich vermehrt Deletionen der mitochondrialen DNA in manchen an der SCA3 erkrankten PatientInnen wieder (Yu et al., 2009).

### 1.2 SCA3-Tiermodelle

Um die SCA3 besser zu verstehen, wurden verschiedene Tiermodelle, insbesondere Mausmodelle, entwickelt. Es gibt *KnockOut*-Modelle, in denen die Funktion des ATXN3 ausgeschaltet wurde, sowie *KnockIn*-Modelle, die die CAG-Wiederholungen in ihr endogenes murines Allel eingebracht bekommen. Weiterhin werden transgene Modelle, die den humanen Genlocus mitsamt aller regulatorischer Einheiten eingebaut bekommen haben, verwendet. Diese können außer zur Erforschung der Erkrankung selbst auch zur Untersuchung von Therapieansätzen genutzt werden, bevor man solche am Menschen testet.

*KnockOut*-Modelle sind wichtig, um den Einsatz potenzieller Therapieansätze, die sowohl das wildtypische als auch das mutante Ataxin-3 herunterregulieren würden, abzuwägen. Dies sind nur dann sinnvolle Ansätze, wenn das Ausschalten des gesamten Proteins keine großen Nebenwirkungen verursachen würde.

Zuerst wurde der Effekt einer ATXN3-Defizienz in *C. Elegans* durch Rodrigues et al. beobachtet (Rodrigues et al., 2007). Die veränderten Würmer zeigten keinen veränderten Phänotyp und waren lebensfähig. Dies wurde mit der Redundanz der ATXN3-Funktion und einem Ersatz dieser Aufgaben durch andere Proteine erklärt. Dennoch wurden Probleme in der Regulation des Ubiquitin-Proteasom-Signalweges sowie in der Signaltransduktion durch das fehlende ATXN3 beschrieben. Ataxin-3 *KnockOut*-Mäuse wiesen keine besonderen Auffälligkeiten auf (Schmitt et al., 2007; Switonski et al., 2011). Die Tiere zeigten eine unveränderte Lebenserwartung und Fortpflanzungsfähigkeit. In Koordinationstests verhielten sie sich vergleichbar zu wildtypischen Tieren. Histologisch wiesen sie bei Schmitt et al. allerdings mehr ubiquitinierte Proteine auf.

Es zeigten sich auch mögliche Limitationen des *KnockOut*-Prinzips. Warrick et al. konnten 2005 in *Drosophila* zeigen, dass das wildtypische ATXN3 über seine Proteasomfunktion die Neurotoxizität reduzieren kann (Warrick et al., 2005). Analog

## Einleitung

verstärkt sich die Symptomatik in homozygoten SCA3-PatientInnen im Vergleich zu heterozygoten (Lang et al., 1994; Sobue et al., 1996). Es lässt sich allerdings streiten, ob dies dem absoluten Fehlen des wildtypischen Allels oder dem doppelt vorliegenden mutanten Allel zuzuschreiben ist.

Bei *KnockIn*-Tiermodellen handelt es sich um Modelle, bei denen die krankheitsbestimmende Mutation in den endogenen murinen Genlocus integriert wird. Dies bietet den Vorteil, dass die Mutation den physiologischen regulatorischen Abläufen wie dem Spleißen unterliegt, um so ein möglichst realistisches Bild der Symptome zu ergeben. In anderen Modellen wurde nur cDNA, also eine bereits gespleißte Variante des *Atxn3*, eingebracht, sodass Einflüsse des alternativen Spleißens und durch Isoformen nicht zu untersuchen waren.

2015 beschrieben Ramani et al. das erste SCA3-*KnockIn*-Mausmodell. Bei diesem wurden 82 CAG-Wiederholungen mittels homologer Rekombination in den murinen Genlocus eingefügt. Dadurch ergaben sich prominente intranukleäre Ansammlungen des mutanten *Atxn3* sowie extranukleäre Aggregate je nach Hirnregion. Außerdem konnten veränderte Spleißvarianten und entsprechende Isoformen des mutanten *Atxn3* gezeigt werden, die so auch in Mäusen mit Expression des gesamten humanen Genlocus zu finden waren. Dennoch zeigten sich weder ein motorischer Phänotyp noch neurologische Defizite, was mit der generell geringen physiologischen Expression des *Atxn3* in der Maus begründet wurde (Ramani et al., 2015).

Ein weiteres Modell wurde entwickelt, um eine humanisierte Variante des mutanten *Atxn3* mit 91 CAG-Wiederholungen in den murinen Genlocus zu integrieren. Dieses Modell weist ebenso SCA3 typische histologische Veränderungen wie eine Neuroinflammation und Neurodegeneration der Purkinjezellen auf. Motorisch zeigte sich spät (nach 90 Wochen) eine Veränderung der koordinatorischen Fähigkeiten. Es wurde eine abgemilderte Form des SCA3-Phänotyps abgebildet (Switonski et al., 2015).

Haas et al. entwickelten ein SCA3 *KnockIn*-Mausmodell, bei dem die Expansion einer unterbrochenen CAACAG-Sequenz mit 304 Wiederholungen entweder hetero- oder homozygot in das murine *Atxn3* eingefügt wurde. Das Ziel war, den vollständigen SCA3-Phänotyp abzubilden, da die vorherigen Modelle die humane Symptomatik nicht vollständig abbildeten. Die genetische Veränderung rief einen PolyQ-Bereich im murinen

## Einleitung

Atxn3 hervor, was zu der bekannten Aggregation in neuronalen Zellen führte. Auch klinisch zeigten sich typische Symptome der SCA3 wie der Motorphänotyp mit einer Gang- und Gleichgewichtsunsicherheit. Der Koordinationsverlust wurde jedoch nur bei den weiblichen Tieren im Vergleich zu wildtypischen Tieren signifikant, bei den männlichen Tieren deutete er sich nur an. Die Ganganalyse zeigte für beide Geschlechter Ataxie-typische Auffälligkeiten, wie beispielsweise einen breiteren Stand zur Stabilisierung. Der für die SCA3 typische Gewichtsverlust zeigte sich nur für die männlichen Tiere, die weiblichen Tiere hatten diesbezüglich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen. Auch die Lebenserwartung der Mäuse fiel im Gegensatz zur reduzierten Lebenserwartung von SCA3 PatientInnen normal aus. Insgesamt waren die homozygoten Tiere deutlich stärker von den Symptomen betroffen als die heterozygoten Tiere (Haas et al., 2022). Weiterhin konnte in Cerebellum-Analysen der Mäuse entdeckt werden, dass diese - ebenso wie menschliche *post-mortem* Analysen - eine veränderte Genexpression im Bereich der für Myelin zuständigen Gene aufwiesen (Haas et al., 2022).

Transgene Tiermodelle weisen zusätzlich zum endogenen murinen ein artifiziell eingeschleustes humanes Gen auf. Cemal et al. entwickelten 2002 für *ATXN3* transgene YAC84Q-C57Bl6-Mäuse der Linie B6;CBA-Tg(ATXN3\*)84.2Cce/IbezJ (Cemal et al., 2002). Die Tiere tragen hemizygot den gesamten humanen *ATXN3 Locus* mit 84 CAG-Wiederholungen. Das bedeutet, dass sie zusätzlich zu ihren zwei murinen *Atxn3*-Allelen ein weiteres humanes *ATXN3*-Allel aufweisen. Ihr Genotyp kann daher als WT/YAC84Q beschrieben werden. Weisen die Tiere zwei humane *ATXN3*-Allele auf, werden sie als homozygot für das Transgen bezeichnet. Durch Tragen des gesamten humanen *ATXN3*-Genlocus werden alle regulatorischen Einheiten sowie auch der humane Promotor abgebildet. Dadurch soll das Modell die Pathogenese des Menschen besser abbilden und für den Menschen entwickelte Therapien können an den transgenen Mäusen getestet werden. Phänotypisch kann bei den WT/YAC84Q-Mäusen bereits nach 4 Wochen eine leichte Gangstörung gesehen werden. Ebenso sollen mit 24 Wochen stärkere neurologische Symptome wie Tremor, Hypoaktivität oder *Clasping* auftreten. Die Neurodegeneration zeigt sich in den Hauptpathogenese-Orten wie dem Cerebellum. Dort finden sich auch neuronale intranukleäre Einschlüsse des Ataxin-3 mit Ubiquitinierung,

wie sie auch beim Menschen zu finden sind (Cemal et al., 2002). Heutige Analysen in unterschiedlichen Laboren weltweit zeigen allerdings, dass der 2002 beschriebene Phänotyp der Tiere nicht mehr abbildbar ist, wenn die Tiere nicht homozygot 84Q-Wiederholungen tragen (Costa Mdo et al., 2013; Shakkottai et al., 2011; Toonen, Overzier, et al., 2018; Weber et al., 2020). Dennoch eignet sich dieses Modell für die Untersuchung neuer Therapieansätze im Organismus, da die ATXN3-Aggregate sowie sonstigen histologischen Auffälligkeiten weiterhin auftreten (Moore et al., 2017; Toonen et al., 2017).

Insgesamt ergänzen sich alle drei Modellformen in den daraus gelieferten Erkenntnissen und Einsatzbereichen, sodass sie alle ihre Berechtigung und Wichtigkeit besitzen.

### 1.3 Bisherige Therapieansätze

Da bislang keine kausale Therapie der Spinocerebellären Ataxie 3 vorliegt, kann nur symptomatisch behandelt werden (Costa Mdo et al., 2013; Kieling et al., 2007). Ein Ansatz beruht auf intensiver Physiotherapie mit dem Ziel, die Progredienz der Bewegungsstörung zu verlangsamen. Logopädie kann der Dysarthrie und Dysphagie entgegenwirken. Besondere Brillengläser können zudem Abhilfe bei den Augenproblemen verschaffen (D'Abreu et al., 2010; Klockgether et al., 2019; Riess et al., 2008).

Medikamentös werden verschiedene Pharmazeutika getestet, um die Symptome zu lindern. So kann Amantadin bei Dystonie und Bradykinesie helfen (Riess et al., 2008; Woods & Schaumburg, 1972). Aufgrund der Ähnlichkeit zum Parkinsonismus werden auch weitere Medikamente aus diesem Bereich verwendet. Behandlungen sowohl mit L-Dopa als auch mit Dopamin-Agonisten können die Dystonie behandeln und das *Restless-Legs*-Syndrom positiv beeinflussen (Buhmann et al., 1995; Nandagopal & Moorthy, 2004; Schols et al., 2000; Tuite et al., 1995; Wilder-Smith et al., 2003). In Kombination mit Baclofen, Tizanidin oder Memantin kann auch die Spastizität behandelt werden (Riess et al., 2008). Die vorkommenden Muskelkrämpfe können mit Magnesium, Chininen oder Mexiletin therapiert werden (Kanai et al., 2003). Aus dem Bereich der Antiepileptika zeigten sich einige Substanzen wirksam. Lamotrigin förderte bei

PatientInnen mit früher stammbetonter Ataxie die Gangsicherheit und konnte sogar mutante ATXN3-Level in Lymphoblasten reduzieren (Liu et al., 2005). Die Substanzen Sulfamethaxol und Trimethoprim, die eigentlich als Antibiotika verwendet werden, wirkten sich in Studien positiv auf Gang und Koordination der SCA3-PatientInnen aus (Correia et al., 1995; Sakai et al., 1995). Dies konnte allerdings in späteren Studien nicht repliziert werden (Sakai et al., 1996; Schulte et al., 2001).

Die nicht-ataktischen Symptome wie Schmerz, Schlaflosigkeit, Gewichtsverlust bis hin zur Kachexie und Depressionen konnten mit dem Serotonin-Rezeptor-Antagonisten Tansospiron behandelt werden (Takei et al., 2005).

Dennoch handelt es sich bei allen Substanzen nur um Medikamente, die Symptome lindern, nicht aber die Kausalität behandeln. Zudem wurden die Substanzen nur in kleinen PatientInnenkollektiven getestet, sodass eine Verallgemeinerung bzw. Übertragbarkeit infrage zu stellen ist (Klockgether et al., 2019).

## 1.4 Antisense-Oligonukleotide

### 1.4.1 Wirkprinzip einer ASO-Therapie

Antisense-Oligonukleotide (ASO) sind gentherapeutische Mittel, die auf RNA-Ebene in die Proteinbiosynthese eingreifen. Es handelt sich um Nukleotid-Einzelstränge, welche aus einer Sequenz an 18-30 („Oligo“-)Nukleotiden bestehen. Diese werden gegensinnig (*Antisense*) zur Target-RNA zusammengestellt. Das Prinzip beruht darauf, dass die ASOs die funktionelle mRNA mittels *Watson-Crick*-Basenpaarung binden. Der Vorteil liegt darin, dass die Entschlüsselung des krankheitsverursachenden Gens mit zugehöriger RNA ausreicht, um eine passende ASO zu designen und bereits vor der Proteinbiosynthese eingegriffen werden kann. Die tatsächliche Funktion des krankheitsverursachenden Proteins muss zur Therapie nicht gekannt werden (Bennett & Swayze, 2010; Pulst, 2019).

Die Entwicklung der ASOs fing in den späten 1970er Jahren an, ursprünglich, um die Translation viraler RNA in menschlichen Zellen zur Behandlung viraler Infekte zu

## Einleitung

unterbinden (Zamecnik & Stephenson, 1978). 1998 wurde das erste ASO-Medikament zur Behandlung der CMV-Retinitis in Amerika zugelassen (Marwick, 1998).

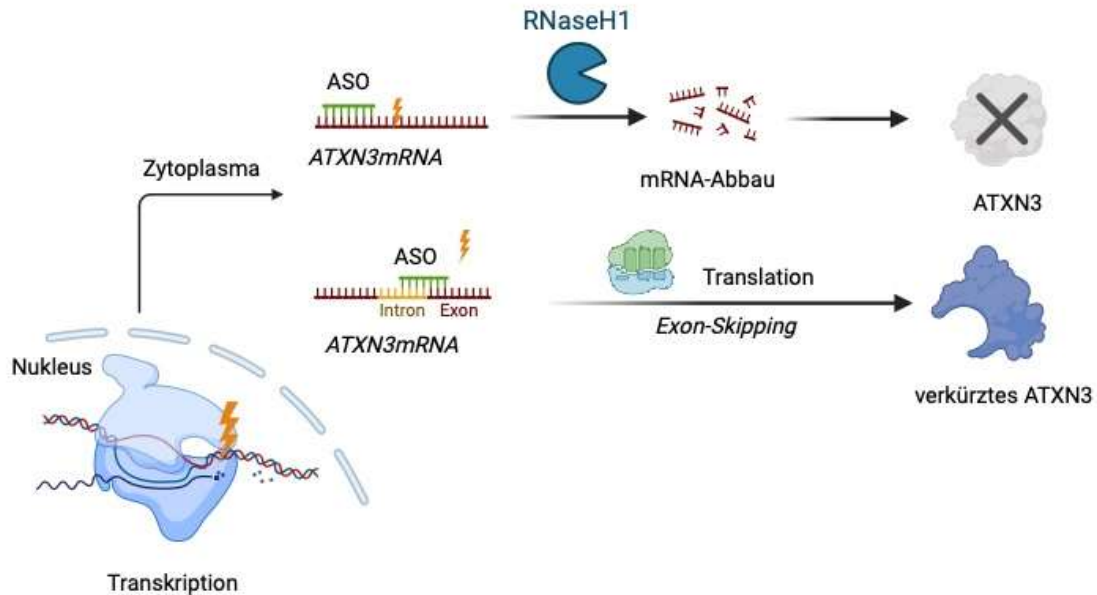


Abbildung 1.1 Funktionsweise der Antisense-Oligonukleotide,

In der Abbildung erkennt man vereinfacht die Wirkweisen der ASOs. In der unteren linken Ecke ist ein Ausschnitt aus dem Nukleus abgebildet, in welchem die DNA transkribiert wird. Diese verlässt den Nukleus in Richtung Zytoplasma, wo sie auf die komplementäre ASO trifft. Im oberen Bereich ist das Wirkprinzip des RNA-Abbaus mittels RNaseH1 dargestellt. Nach Bindung der ASO an ihre spezifische mRNA wird die RNaseH1 rekrutiert, welche die mRNA zerschneidet, wodurch diese nicht mehr translatiert werden kann. Das entsprechende Protein wird nicht mehr translatiert und somit herunterreguliert.

Im unteren Bereich ist der Wirkmechanismus des Exon-Skippings abgebildet. Die ASO bindet ein spezifisches Exon, wodurch dieses bei der Translation übersprungen wird. Es entsteht ein verändertes, verkürztes Protein. Die Abbildung wurde mithilfe von Biorender.com erstellt.

Es gibt zwei Prinzipien, nach welchen ASOs wirken. Einerseits können sie komplementär zur mRNA konfiguriert werden, die reguliert werden soll. Durch die Komplementarität bildet sich ein Doppelstrang aus Ziel-mRNA und ASO, welcher die zelleigenen Abbausysteme aktiviert. Die Ribonuklease (RNase) H1 wird rekrutiert und zerschneidet den Komplex, sodass die RNA nicht mehr translatiert werden kann (Lima et al., 2016; Wu et al., 2004). Folglich wird das zugehörige Protein herunterreguliert (Becker et al., 2017; Benson et al., 2018; DeVos et al., 2017; McCampbell et al., 2018; McLoughlin et al., 2018). Die ASO selbst ist nicht zugänglich für die RNase, da die ASO aus Desoxyribonukleotiden - wie in der DNA vorkommend - aufgebaut wird. Dennoch

werden DNA-ASOs durch zelleigene Nukleasen abgebaut (Bennett & Swayze, 2010; Pulst, 2019).

Alternativ bindet die ASO eine Spleißstelle der mRNA. So kann sie dafür sorgen, dass bestimmte Exone ein- bzw. ausgeschlossen werden. Der zweite Mechanismus wird daher auch als *Exon-Skipping* bezeichnet. Dies ist ein Vorteil bei Mutationen, die ein bestimmtes Exon betreffen, welches durch eine ASO ausgeschlossen werden kann. Ebenso kann bei Krankheiten, bei denen ein Exon, welches entscheidende Bereiche des Proteins codiert, aber nicht translatiert wird, wieder eingeschlossen werden. Für *Exon-Skipping* ASOs werden vor allem modifizierte Ribonukleotide verwendet, da diese besser verträglich sind und eine höhere Target-Affinität aufweisen. (Chang et al., 2018; Finkel et al., 2017; Hinrich et al., 2016; Lim et al., 2017; Mercuri et al., 2018; Toonen et al., 2017).

Die beiden Wirkweisen sind in Abbildung 1.1 vereinfacht dargestellt.

### 1.4.2 Chemische Modifikationen der ASOs

Die ASOs werden immer weiter modifiziert, um ihre Stabilität, Verfügbarkeit, Affinität und Spezifität zu verbessern sowie um ihre Toxizität zu verringern. Dadurch können heutzutage schon verschiedene Generationen an ASOs unterschieden werden, wobei die meisten bereits veröffentlichten und zugelassenen ASOs der 1. und 2. Generation angehören (Egli & Manoharan, 2023). In laufenden Studien werden bereits ASOs der 3. Generation untersucht, die eine verbesserte Stabilität aufweisen und eine geringere Dosis zur Wirkung benötigen sollen (Mansoor & Melendez, 2008).

ASOs werden schneller degradiert, wenn sie als Doppelstrang vorliegen oder eine neutrale Ladung aufweisen. Fallen die ASOs eher klein bzw. kurz aus, wird ihre renale Ausscheidung erhöht, wodurch die Halbwertszeit im Blut verringert wird. Stabiler sind ASOs, je größer sie sind und je mehr Modifikationen sie aufweisen. Ebenso fällt ihre Halbwertszeit höher aus, wenn sie als Einzelstrang vorliegen ebenso wie bei negativer Ladung, da diese ihre Bindung an Serumproteine erhöht.

## Einleitung

Die Modifikationen können das Rückgrat der ASOs betreffen. Der Sauerstoff im Phosphodiester kann durch Sulfur ersetzt werden, sodass ein Phosphothioat entsteht (PS). Dies erhöht die Stabilität aufgrund eines verminderten Abbaus durch Nukleasen. Ebenso wird die Halbwertszeit im Serum und im Liquor durch eine verbesserte Albumin-Bindung mittels Disulfidbrücken erhöht und ihre zelluläre Aufnahme mittels Endozytose verbessert (Bennett & Swayze, 2010; Crooke et al., 2017; Helm et al., 2022; Juliano & Carver, 2015; Pulst, 2019). Andererseits erhöht das PS die Immunreaktion. Dies kann durch ein gemischtes Rückgrat aus Phosphodiestern und PS verhindert werden (Rook & Southwell, 2022). Weiterhin wurde untersucht, dass die stereochemische Konfiguration der PS-ASOs einen Einfluss auf ihre Wirksamkeit hat (Iwamoto et al., 2017).

Auch der Zucker der Nukleotide kann modifiziert werden. Dies führt zu einer erhöhten RNA-Affinität, verhindert das Erkennen der ASO durch die Nuklease und reduziert Protein-Interaktionen (Geary et al., 2001; Scoles et al., 2019). Modifikationen betreffen dabei vor allem das 2'Ende der Ribose. Es wurde ein 2'-O-Methoxyethylrest eingesetzt, was die Bindung an RNA verbesserte, ebenfalls eine verringerte Serumproteinbindung bedeutete und die ASO weniger toxisch gestaltete. Sie werden dadurch weniger hepatisch verstoffwechselt und eher renal ausgeschieden. Diese Modifikation verringert allerdings die Erkennung durch die RNaseH1, da diese auf die Erkennung von RNA-DNA-Doppelsträngen ausgelegt ist (Geary et al., 2001). Daher wurden sogenannte *Gapmers* entwickelt. Dabei wird die innere DNA-Antisense-Sequenz außen von der modifizierten RNA flankiert, sodass die Stabilität erhöht wird, gleichzeitig aber die eigentliche Wirkung erhalten bleibt (Geary et al., 2015; Helm et al., 2022; Lima et al., 2007; Monia et al., 1993; Rook & Southwell, 2022).

Eine weitere Möglichkeit, die Ribose-Konfiguration zu verändern, besteht darin, sogenannte „Schlösser“ zu bilden. Dies wird als *Locked Nucleic Acid* (LNA) bezeichnet. Das 2' Sauerstoffatom wird über eine Methylenbrücke mit dem 4' Kohlenstoffatom verbunden, wodurch die Ribose in einer zirkulären Form fixiert wird. Demzufolge kann die Desoxyribose-Konfiguration wie in DNA-Nukleotiden nicht eingegangen werden, was den Abbau durch Nukleasen verhindert und eine verbesserte Erkennung der Target-mRNA erwirkt. Allerdings zeigt sich für diese Modifikation eine erhöhte hepatische Toxizität (Burdick et al., 2014; Scoles et al., 2019).

Letztlich können die Basen angepasst werden. Diese haben die größte Auswirkung auf die Spezifität der ASOs gegenüber ihrer Target-RNA. Es kommen 5'-Methylierungen, das Anhängen von 5'-Propynylgruppen und 2'-Thio-Pyrimidin-Modifikationen zum Einsatz (Helm et al., 2022; Scoles et al., 2019).

### 1.4.3 Chancen und Grenzen einer ASO-Therapie

Die Bedingung einer ASO-Therapie ist aktuell das Vorliegen einer monogenetischen Erkrankung. Diese sind in der Regel leicht kausal zu behandeln, indem die Expression des Gens und damit des Proteins herunterreguliert oder ganz ausgeschaltet wird.

Weiterhin ist es essenziell, mögliche *Off-Targets* der ASOs zu vermeiden. Sobald die RNA eines anderen Genabschnittes dieselbe oder eine sehr ähnliche Basenabfolge in ihrer Sequenz beinhaltet, binden die ASOs möglicherweise auch diese und regulieren das Protein, was potenziell hoch toxisch für den Organismus sein kann. Durch eine Exom- bzw. Transkriptomanalyse können bereits vorab mögliche *Off-Targets* identifiziert werden. Gegebenenfalls kann die Sequenz der ASO angepasst werden, indem sie beispielsweise verlängert wird, sodass sie die unerwünschte RNA nicht mehr bindet. Letztlich lässt sich über das Vorliegen von *Off-Targets* nur nach der Testung im Organismus eine Aussage treffen. Es kann zum Beispiel mittels qPCR die Expression potenzieller *miss-match* RNAs analysiert und überprüft werden (Scoles et al., 2019).

### 1.4.4 Praktikabilität einer ASO-Therapie

Die meisten ASOs können die Bluthirnschranke (BHS) aufgrund ihrer Größe und Ladung nicht überwinden, was im Falle der neurodegenerativen Erkrankungen eine intrathekale oder intracerebroventrikuläre (ICV) Applikation voraussetzt (Agrawal et al., 1991; Geary et al., 2015). Es wurde gezeigt, dass durch die Zirkulation des Liquor cerebrospinalis die Distribution der ASOs vor allem in das Rückenmark und die kortikalen Bereiche, aber auch in tiefer liegende Hirnareale stattfindet. Es gibt bereits zugelassene ASO-Behandlungen für den Menschen, die mittels intrathekaler Applikation das ZNS erreichen (Finkel et al., 2017; Geary et al., 2015; Scoles et al., 2019)

Zudem wurden Partikel entwickelt, die regulatorische RNA über die BHS transportieren, sodass sie intravenös appliziert werden können (Conceicao et al., 2016; Tang et al., 2023). Dabei stellt sich die Frage der Übertragbarkeit auf ASOs.

## 1.4.5 ASO-Therapien mit Fokus auf neurodegenerativen Erkrankungen

In den letzten Jahren gab es viele Studien zu ASO-Therapien in neurologischen Erkrankungen, aber auch in anderen Krankheitsbildern. Hier soll zuerst auf zugelassene Therapeutika eingegangen werden. Folglich werden Therapieversuche mit ASOs in anderen neurodegenerativen Krankheiten beschrieben und letztlich werden ASO-Therapieansätze in der SCA3 aufgeführt. Ein orientierender Überblick über die aktuelle Studienlage ist in Tabelle 1.1 zu finden.

*Tabelle 1.1 Studienlage zu ASO-Therapien in neurodegenerativen Erkrankungen*

| Krankheit   | Klinische Studien                                                                               | Zugelassene Therapie                         |
|-------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| <b>SCA3</b> | <b>VO659</b><br>NCT05822908 <i>Rekrutierungsphase</i>                                           | -                                            |
|             | ASO BIIB132<br>NCT05160558 <b>abgebrochen</b>                                                   |                                              |
| <b>HD</b>   | <b>Tominersen</b><br>NCT03842969 Phase III <b>abgebrochen</b>                                   | -                                            |
|             | <b>WVE-120101 &amp; 120102</b><br>NCT05032196 Phase I/II <b>abgebrochen</b><br>allel-spezifisch |                                              |
|             | <b>VO659</b><br>NCT05822908 <i>Rekrutierungsphase</i>                                           |                                              |
|             | <b>WVE003</b><br>NCT05032196 <i>Rekrutierungsphase</i>                                          |                                              |
| <b>SCA1</b> | <b>VO659</b><br>NCT05822908 <i>Rekrutierungsphase</i>                                           | -                                            |
| <b>SCA2</b> | <b>ION541 (BIIB105)</b><br>NCT04494256 Phase I/II                                               |                                              |
| <b>ALS</b>  | <b>Jacifusen/ION36</b><br>NCT04768972 Phase III                                                 | <b>Tofersen</b><br><br>(Miller et al., 2020) |
|             | <b>ION541 (BIIB105)</b><br>NCT04494256 Phase I/II                                               |                                              |
|             | <b>IONIS-C9<sub>RX</sub> (BIIB078)</b><br>NCT04288856 Phase I/II <b>abgebrochen</b>             |                                              |
|             | <b>WVE004</b><br>NCT04931862 Phase I/II                                                         |                                              |

| Krankheit    | Klinische Studien | Zugelassene Therapie                        |
|--------------|-------------------|---------------------------------------------|
| <b>SMA</b>   |                   | <b>Nusinersen</b><br>(Mercuri et al., 2018) |
| <b>DMD</b>   |                   | <b>Eteplirsen</b><br>(Lim et al., 2017)     |
| <b>hATTR</b> |                   | <b>Inotersen</b><br>(Benson et al., 2018)   |

#### 1.4.5.1 Bisher zugelassene ASO-Therapien in Amerika und Europa

In den vergangenen Jahren wurden ASOs zur Behandlung der Spinalen Muskelatrophie (SMA), der Duchenne Muskeldystrophie (DMD) und der hereditären Transthyretin-Amyloidose. (hATTR) in Amerika und/ oder Europa zugelassen. Neu zugelassen in Amerika wurde eine ASO, die eine Untergruppe der Betroffenen der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) behandeln kann. Besonders herausstechend ist die ASO Nusinersen zur Behandlung der SMA, die die ansonsten infauste Prognose der betroffenen Kinder massiv verbessern konnte. Doch auch die anderen ASOs leiten eine Zeitenwende in der Therapie monogenetischer Krankheiten ein.

##### 1.4.5.1.1 Behandlung der Spinalen Muskelatrophie mit Nusinersen

Die Spinale Muskelatrophie (SMA) ist eine autosomal rezessive Erkrankung, die bei betroffenen Kindern zu einer fortschreitenden Muskelschwäche und Atrophie führt. Verantwortlich ist eine Deletion oder Mutation im *Survival Motoneuron 1 Gen (SMN1)*, wodurch das entsprechende Protein nicht mehr synthetisiert wird. Die Motoneuronen im Rückenmark und im Hirnstamm degenerieren. Glücklicherweise gibt es ein weiteres Gen (*SMN2*), welches das Protein ebenfalls codiert. Es weist allerdings veränderte Spleiß Eigenschaften auf, wodurch physiologisch verkürzte, nicht funktionsfähige Isoformen des *Survival Motoneuron Proteins (SMN)* entstehen. Mithilfe der ASO Nusinersen, die an dieser Spleißstelle ansetzt, konnte das Spleißen des *SMN2*-Gens so modifiziert werden, dass ein funktionsfähiges Protein entsteht, welches den Ausfall des *SMN1*-Gens kompensiert. Es kommen verschiedene Anzahlen an Kopien des *SMN2*-Gens vor. Nusinersen wirkt umso besser, je mehr Kopien vorliegen, da mehr Target-RNA vorliegt und mengenmäßig mehr verlängertes Protein translatiert werden kann. Das

Medikament erwies sich in Phase III Studien als so wirksam, dass es ethisch nicht länger vertretbar war, eine Kontrollgruppe mit Placebo zu behandeln. Daher wurde die Studie vorzeitig beendet und in eine unverblindete Erweiterungsstudie überführt. Auch in weiteren klinischen Studien mit Einsatz bei der *late-onset* SMA zeigte sich Nusinersen als signifikant wirksam auf die motorische Entwicklung der PatientInnen. Die Kinder verbesserten ihre motorischen Fähigkeiten. Einige, wenn auch keine signifikante Anzahl, konnten weitere motorische Meilensteine der Entwicklung erreichen, was in symptomatischen Kindern typischerweise nicht beobachtet werden kann. In beiden Studien zeigte sich kein erhöhtes Vorkommen an Nebenwirkungen. Typisch für den intrathekalen Applikationsweg, also mittels Lumbalpunktion, sind Rückenschmerzen, Übelkeit, Kopfschmerzen und Unwohlsein. Nusinersen war umso wirksamer, je jünger die behandelten Kinder waren und je kürzer sie Krankheitssymptome aufwiesen, also je weniger fortgeschritten die Krankheit war (Finkel et al., 2017; Mercuri et al., 2018). Dies bestätigte sich in einer offenen Behandlungsstudie an präsymptomatischen Säuglingen, die eine genetische Diagnose der SMA aufwiesen. Ein Großteil erreichte motorische Entwicklungsstufen, die bei einer SMA nicht zu erwarten gewesen wären. Keines der Kinder mit drei SMN2-Kopien und 47% der Kinder mit zwei SMN2-Kopien erfüllten am Ende der Studie die Kriterien zur Diagnose einer SMA (De Vivo et al., 2019). Mittlerweile wurde Nusinersen deshalb nicht nur in den USA, sondern auch in Europa durch die *European Medicines Agency* (EMA) zugelassen (EMA, 2017).

### 1.4.5.1.2 Behandlung der Duchenne Muskeldystrophie mit Eteplirsen

Die Duchenne Muskeldystrophie (DMD) ist eine X-chromosomal rezessiv vererbte Erkrankung und betrifft daher vor allem männliche Patienten. Sie tritt bereits im Kindesalter auf und hat als Leitsymptom eine muskuläre Schwäche, die zu Geh-Unfähigkeit sowie kardialen und pulmonalen Komplikationen führt, was oft den Tod der Betroffenen im Alter von ungefähr 20 Jahren bedeutet. Betroffen ist das Gen des Dystrophins, das *DMD*-Gen. Dieses ist mit 2.4 Mbp das längste menschliche Gen, wodurch dort besonders viele Mutationen auftreten können. Dies führt zu einer Variabilität der krankheitsverursachenden Mutationen wie Deletionen ganzer Exone (60%), Duplikationen (6%) oder kleinerer Mutationen, was auch das veränderte

## Einleitung

Dystrophin verschieden konfiguriert und so die Klinik höchst variabel gestaltet. Eteplirsen ist eine ASO, die mit der prä-mRNA von Dystrophin interagiert und an einer Spleißstelle ansetzt, um Exon 51 auszulassen. Daher können nur PatientInnen damit behandelt werden, deren Mutation in diesem Bereich liegt, dies wären nach aktueller Datenlage 14% der Betroffenen (Lim et al., 2017).

In Phase II und III Studien wurde ein verändertes Dystrophin durch die ASO erreicht, jedoch nur in geringen Mengen. Dies bewog die FDA zur vorläufigen Zulassung. Dennoch werden Zweifel an der tatsächlichen Wirksamkeit geäußert. Eteplirsen verlängerte die Zeit bis zur Gehunfähigkeit und vor allem bis zur Notwendigkeit pulmonaler Unterstützung. Allerdings wurde kritisiert, dass nicht genügend Daten gesammelt wurden und diese nicht statistisch aussagekräftig mit historischen Daten verglichen wurden (Lim et al., 2017). Laut EMA wurde nicht ausreichend gezeigt, dass das veränderte Dystrophin einen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf hat. Daher verweigerte sie die Zulassung in Europa (EMA, 2018a).

### 1.4.5.1.3 Behandlung der hATTR mit Inotersen

Bei der hereditären Transthyretin-Amyloidose (hATTR) liegt eine Punktmutation im Gen des Transthyretin-Rezeptors (TTR) vor, was zu einer Fehlfaltung dessen und einer Destabilisierung des Proteinkomplexes führt. Daraus resultiert eine Amyloidablagerung in den Organen, was unter anderem eine Polyneuropathie, Kardiomyopathie, Nephropathie und gastrointestinale Dysfunktion bewirkt. Da die Leber der Hauptpathogenese-Ort ist, war eine Lebertransplantation lange die einzige wirksame Therapie. Die ASO Inotersen bindet die mRNA des TTR und rekrutiert die RNaseH1, wodurch die mRNA degradiert wird. Die Rezeptorproduktion in der Leber wird unterbunden, was der Bildung der Ablagerungen vorbeugt. Inotersen erhielt die Zulassung, nachdem die Phase III Studie signifikante Vorteile der ASO-Behandlung gegenüber Placebogaben erzielen konnte. Die ASO wurde wöchentlich subkutan durch die PatientInnen selbst zuhause verabreicht. Die unverblindete Erweiterungsstudie konnte die Ergebnisse bestätigen (Benson et al., 2018). Daher ließ die EMA Inotersen zur Behandlung der hATTR zu (EMA, 2018b).

### 1.4.5.1.4 Behandlung der Amyotrophen Lateralsklerose mit Tofersen

Die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist eine schwere neurodegenerative Erkrankung der Motoneurone des motorischen Cortex und des Rückenmarks. Dies führt zu progredienter Muskelschwäche bis hin zu Paralysen und zum Tod. Häufige Komplikationen sind durch die Einschränkung der Lungenfunktion bedingt. Mittlerweile gibt es verfügbare symptomatische Therapien (Riluzol/ Edavaron).

Etwa 2% der PatientInnen insgesamt und 10-20% der Fälle mit familiärer ALS haben eine Mutation im Gen der Superoxiddismutase 1 (*SOD1*), die zur Dysfunktion des zugehörigen Proteins führt, welches den oxidativen Stress in Zellen reduziert. Ist dieses Gen verändert, führt dies zu einem erhöhten oxidativen Stress und zum Zelluntergang. Die ASO Tofersen wurde entwickelt, um das mutante SOD1 herunterzuregulieren (Blair, 2023). In Phase I/II Studien wurde gezeigt, dass die Konzentration der SOD1 im Liquor durch Tofersen um bis zu 33% reduziert werden konnte, ebenso wurde eine Reduktion des Neurofilaments Leichtkette (NFL) beschrieben, was für eine neuroprotektive Wirkung sprach. Dieses wurde lange als Biomarker der ALS genutzt (Blair, 2023; Miller et al., 2020). In einer aktuellen Phase III Studie wird erfasst, wie die Auswirkung auf die Lungenfunktion, auf die motorische Kraft und auf einen spezifisch die ALS objektivierenden *Score* ausfiel. Es konnten signifikante Reduktionen der SOD1 und des NFL im Liquor erreicht werden, jedoch zeigte sich kein signifikanter Unterschied im *Score* und in der motorischen Kraft zwischen Behandlungsgruppe und Placebo. Bei Betrachtung der Vitalkapazität, einem Wert für die Elastizität der Lunge, konnte keine signifikante Verbesserung erreicht werden, es gab aber einen Trend in diese Richtung. (Blair, 2023; Cerillo & Parmar, 2023). Tofersen wurde Anfang des Jahres 2024 vorläufig durch die FDA und die EMA zur Behandlung der ALS bei assoziierter SOD1-Mutation zugelassen (EMA, 2024).

### 1.4.5.2 Klinische Studien zur ASO-Behandlung der HD

Drei ASOs zur Behandlung der mit der SCA3 verwandten HD erreichten Phase III Studien, wurden jedoch abgebrochen. Bei der HD handelt es sich um eine PolyQ-Erkrankung, deren Mutation im Huntingtin-Gen (*HTT*) liegt. Es handelt sich um eine neurodegenerative Erkrankung, die aktuell nicht heilbar ist. PatientInnen weisen einen

progressiven Verlust der willkürlichen motorischen Kontrolle auf, welcher von kognitiver Dysfunktion sowie psychiatrischen Beschwerden begleitet wird. Die HD verläuft innerhalb von 15-20 Jahren nach Symptombausbruch letal. Daher wurden ASOs untersucht, die das mutante Erkrankungsprotein Huntingtin (HTT) herunterregulieren sollten, in der Hoffnung, den Symptomen vorzubeugen bzw. den Progress zu inhibieren (Rook & Southwell, 2022).

In Studien wurde gezeigt, dass HTT eine entscheidende Rolle in der embryonalen Hirnentwicklung spielt, im adulten Gehirn ist seine Aufgabe jedoch noch ungeklärt. In präklinischen Studien wurde beschrieben, dass eine Reduktion des mutanten HTT von 50% bereits eine Verbesserung der Symptomatik bewirkt, eine Reduktion des wildtypischen HTT um bis zu 75% schien dabei in den Mausmodellen außerhalb der Embryonalentwicklung keine fatalen Folgen zu haben (Duyao et al., 1995; Kordasiewicz et al., 2012). Daher wurde die allel-unspezifische ASO Tominersen entwickelt. Die intrathekale Gabe von Tominersen hatte sich zuvor in der Phase I/IIa Studie und einer unverblindeten Erweiterungsstudie bewährt. Eine Reduktion des mHTT fand dosisabhängig im Liquor statt. Es stiegen jedoch das NFL und das Tau Protein im Liquor, was Zeichen eines axonalen Untergangs und damit der Neurodegeneration sind. Die Konzentration sank einige Wochen später wieder auf den Ausgangswert (Giuffre et al., 2023; Moscoso et al., 2021; Rook & Southwell, 2022). Die Phase III Studie wurde abgebrochen, da durch ein unabhängiges Komitee der Nutzen gegenüber dem Risiko als zu gering eingestuft wurde. Eine der beiden Behandlungsgruppen zeigte keinen Unterschied zur Placebo-kontrollierten Gruppe. Die Gruppe mit häufigerem Behandlungsintervall verschlechterte sich sogar in der motorischen und kognitiven Fähigkeit. Außerdem konnte ein Anschwellen der Ventrikel beobachtet werden (Rook & Southwell, 2022).

Weiterhin wurden zwei allel-spezifische ASOs zur Behandlung der HD entwickelt, die mutationsassoziierte SNPs (rs362307 und rs362331) nutzen. In Kombination beider wären 36-70% der europäisch abstammenden Mutationstragenden behandelbar. In der Phase I/IIa Studie wurde keine ausreichende Reduktion des mHTT erreicht. Eine Erhöhung der Dosis konnte keine Steigerung der Reduktion hervorrufen. Es fand sich weder ein Anstieg des NFL im Liquor noch ein Krankheitsprogress, trotzdem brachen 7 der 13 Teilnehmenden die Studie ab. Präklinisch wurden Tests in PatientInnenzellen und

gesunden Mäusen zur Verträglichkeit durchgeführt, es fehlten jedoch Effektivitätsstudien in einem HD-Tiermodell. Diese hätten das Problem der zu geringen Regulation aufzeigen können (Rook & Southwell, 2022). Eine weitere allel-spezifische ASO wurde unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse designt. Aktuell befindet sich diese ASO WVE-003 in der Rekrutierungsphase für eine Phase I/IIa Studie (NCT05032196).

### 1.4.5.3 Bisherige ASO-Therapieansätze in der SCA3

Es wurden bereits ASOs entwickelt, die ATXN3 regulieren sollen. Die meisten wurden in verschiedenen SCA3-Mausmodellen getestet. Die ASO VO659 soll in einer Phase I/IIa Studie getestet werden. Eine weitere Phase I Studie zur ASO BIIB132 wurde aus unbekannten Gründen abgebrochen.

#### 1.4.5.3.1 Präklinische ASO-Studien in der SCA3

Moore et al. haben 2017 eine Reihe ASOs getestet, die allel-unspezifisch ATXN3 regulieren sollten. Zuerst wurden die ASOs in Fibroblasten von PatientInnen auf ihre Wirksamkeit getestet. Sie wirkten sowohl auf das wildtypische als auch auf das expandierte ATXN3. Die wirksamen ASOs wurden weiter *in vivo* untersucht. Nach einem Toxizitätstest an wildtypischen Tieren wurden die ASOs transgenen WT/YAC84Q-Mäusen in den rechten Ventrikel injiziert. Alle verwendeten ASOs konnten im Gehirn nachgewiesen werden, sodass eine gute Verteilung mittels CSF-Fluss garantiert wurde. Bei einigen der ASOs konnte eine signifikante Reduktion des ATXN3 nachgewiesen werden. Diese war je nach Hirnregion verschieden, wobei sie im Frontalen Cortex am geringsten ausfiel. In den tiefen cerebellären Nuclei sowie im Pons konnten sogar ATXN3-Aggregate im Zellkern reduziert werden. Es fand sich kaum ein Anhalt für toxische Effekte der ASOs. Dafür wurden die Transkriptionslevel immunreaktiver Proteine in Astrozyten und Mikroglia getestet. Es fand sich eine generelle Immunreaktion um die Injektionsstelle herum, in welcher auch eine erhöhte ASO-Konzentration zu finden war (Moore et al., 2017). 2019 entwickelten Moore et al. daraufhin das erste humane SCA3-Modell mit embryonalen Zellen. Diese stammten von einem gespendeten Embryo, der heterozygot für die SCA3 war. Auch in diesem humanen Zellmodell konnte die zuvor im Mausmodell getestete ASO das Expressionslevel sowohl des wildtypischen

als auch des mutanten ATXN3 signifikant reduzieren. Dies sorgte auch für eine Reduktion der Proteinaggregate (Moore et al., 2019).

Tonnen et al. testeten 2017 verschiedene das Spleißen modifizierende ASOs. Einige setzten so an, dass Exon 8 und 9 ausgeschlossen wurden, da dort viele proteolytische Spaltstellen liegen. Es wurde angenommen, dass dadurch die Aggregate reduziert würden. Allerdings zeigte sich im Mausmodell, dass die Effizienz des *Exon-Skippings* insgesamt gering ausfiel und dass das veränderte Protein keine Polyubiquitin-Ketten mehr binden konnte, was potenziell die Deubiquitinase-Funktion des ATXN3 behindern könnte. In der Zusammenschau dieser Ergebnisse wurden diese ASOs nicht weiterentwickelt (Toonen et al., 2016). Eine weitere durch Toonen et al. entwickelte ASO setzt an der Spleißstelle für Exon 10 an, welches die CAG-Wiederholungen beinhaltet. Dieses wird exkludiert, sodass das entstehende ATXN3 verkürzt ist und keinen Polyglutamin-Bereich aufweist. Die entstehende Isoform kann Ubiquitin genauso binden und spalten wie das *full-length* ATXN3, da die C-terminal liegende UIM nicht obligatorisch ist und die Enzymfunktion der Josephin-Domäne funktionsfähig bleibt. Im Versuch wurden den transgenen WT/YAC84Q-Mäusen die ASOs erst einmalig und danach eine höhere Dosis über 3 Wochen akkumuliert ICV appliziert. Bei einmaliger Gabe wurde 17% modifiziertes, also verkürztes ATXN3 sowie die veränderte RNA und bei mehrfacher Gabe 37% modifiziertes ATXN3 gefunden. Außerdem wurden verringerte ATXN3-Aggregate sowohl im Zytosol als auch im Nucleus detektiert (Toonen et al., 2017).

### 1.4.5.3.2 Klinische ASO-Studien in der SCA3

Seit Anfang 2023 befindet sich eine Phase I/IIa unverblindete Studie unter der Nummer NCT05822908 in der Rekrutierungsphase, die die ASO VO659 in der SCA1, SCA3 und HD testen soll. Den Teilnehmenden der Studie werden vier verschiedene Dosen der ASO in steigender Konzentration intrathekal verabreicht, um die Sicherheit und Verträglichkeit des Medikaments zu evaluieren. Die verwendete ASO mit einer (CUG)<sub>7</sub> Sequenz bindet an die CAG-Wiederholungen und soll alle drei Krankheiten regulieren können. In der SCA3 zeigte die ASO eine gute Regulation mittels *Exon-Skip* des Exon 10, welches die Mutation trägt. In der SCA1 konnte ein geringfügiger *Exon-Skip* des Exon 8, welches die

CAG-Wiederholungen trägt, festgestellt werden. Im Tiermodell wurde aber vor allem das Gesamtprotein Ataxin-1 durch die ASO reduziert. Auch in der Huntington-Erkrankung wurde HTT durch die ASO herunterreguliert (Datson et al., 2017; Kourkouta et al., 2019). Durchgeführt wird die Studie von VICO *Therapeutics*. Das voraussichtliche Ende der Studie liegt im September 2025. Vorläufige Ergebnisse können eventuell früher eingesehen werden, liegen zum aktuellen Zeitpunkt (20.06.2024) jedoch noch nicht vor. Die ASO wurde bereits einigen PatientInnen in Tübingen verabreicht. ASOs, die die CAG-Wiederholungen tangieren, sind dennoch kritisch zu betrachten, da diese Sequenz in verschiedensten Genen auch ganz physiologisch vorkommt. Es besteht die Gefahr, dass die ASO eher unspezifisch wirken bzw. viele potenzielle *Off-Targets* haben könnte. Die *in vivo* Studien liefern dafür bisher keinen Anhalt bzw. keine Hinweise auf ungewollte *Off-Targets*.

Eine weitere Phase I Studie von Biogen, die die ASO BIIB132 zur Behandlung der SCA3 in PatientInnen unter der Registrierungsnummer NCT05160558 getestet hat, wurde im April 2023 abgebrochen. Offizielle Gründe dafür sind aktuell nicht bekannt (Chuang, 2023). Die ASO wurde in verschiedenen Dosen alle vier Wochen intrathekal verabreicht und auf ihre Verträglichkeit sowie Pharmakokinetik getestet. Es hat sich um eine der ASOs gehandelt, die in den präklinischen Studien von McLoughlin und Moore getestet wurde und sich als wirksam erwiesen hat, wie in wissenschaftlichen Kreisen kommuniziert wurde (McLoughlin et al., 2018; Moore et al., 2017; Paulson & Groff, 2022, p. 34).

### 1.5 Alternative gentherapeutische Therapieansätze der SCA3

Alternativ zum Therapieansatz mit Antisense-Oligonukleotiden wurden gentherapeutische Ansätze mit MikroRNA, *Small Interfering RNA* (siRNA) und *Small Hairpin RNA* (shRNA) durchgeführt. Alle diese Ansätze beruhen auf dem Einbau der jeweiligen regulatorischen RNA in den *RNA Induced Silencing Complex* (RISC). Dies ist ein Proteinkomplex, der seine Target-RNA bindet und in kleine Stücke schneidet. Die Translation wird verhindert, was zu einer Herunterregulation des betreffenden Proteins führt. Dieser Prozess wird als RNA-Interferenz bezeichnet und kommt auch

physiologisch z.B. zur Abwehr viraler RNA vor. Dies bedeutet allerdings auch, dass die regulatorische RNA, sobald sie im Organismus angekommen ist und in den RISC eingebaut wurde, dort immer wieder wirken kann. Nach dem Zerschneiden der Target-RNA wird die Bindestelle frei, sodass wieder eine neue RNA gebunden und degradiert werden kann (Friedrich & Aigner, 2022).

### 1.5.1 Therapieansätze mit MikroRNA

MikroRNA ist eine einzelsträngige nicht-codierende RNA, die in der posttranskriptionalen Phase regulierend auf die Proteinbiosynthese wirkt. Sie beeinflusst ein breites Spektrum an Genen. Daher wirkt sie eher unspezifisch, kann aber entscheidende zelluläre Signalwege verändern. Dies sorgt auch für eine hohe Anzahl potenzieller *Off-Targets* (Diener et al., 2022; Saliminejad et al., 2019).

2013 konnte in einer Studie mit MikroRNA, die die 3' Untranslatierte Region (UTR) der RNA des Ataxin-3 bindet und per RNA-Interferenz wirkt, eine suffiziente Reduktion des mutanten, aber auch des wildtypischen ATXN3 in homozygoten YAC84Q-Mäusen erreicht werden (Rodriguez-Lebron et al., 2013). Costa Mdo et al. erreichten mit der Injektion einer ATXN3 supprimierenden MikroRNA in das Cerebellum transgener homozygoter YAC84Q-Mäuse zwar eine lebenslange Unterdrückung des mutanten ATXN3, das motorische Defizit blieb jedoch erhalten, genauso wie die reduzierte Lebensdauer nicht verlängert werden konnte. Daraus wurde geschlossen, dass eine Regulation im Cerebellum alleine nicht ausreichend zur Behandlung sei (Costa Mdo et al., 2013). 2019 führten auch Martier et al. einen Therapieansatz mit drei verschiedenen MikroRNAs in einem heterozygoten SCA3-*KnockIn*-Mausmodell durch. Es gelang eine starke dosisabhängige Reduktion der *Target*-mRNA und des ATXN3 durch Abbau im RISC. Weiterhin konnten keine *Off-Targets* festgestellt werden. Aufgrund der Allel-Unspezifität der MikroRNAs wurde auch das wildtypische ATXN3 reduziert. Dies schien jedoch keine negativen Effekte zu haben (Martier et al., 2019; Nobrega et al., 2013). Eine dieser MikroRNAs untersuchten Nobre et al. 2022 weiter in einem lentiviral-basierten striatalen Mausmodell der SCA3. Die MikroRNA wurde mittels eines adenoviralen Vektors ins Striatum wildtypischer Mäuse injiziert. Dies führte zu einer dosisabhängigen

Reduktion des ATXN3, wodurch auch die intrazellulären Aggregate deutlich vermindert werden konnten (Nobre et al., 2022).

2023 wurde durch Tang et al. ebenfalls ein MikroRNA-Ansatz getestet. Als Vektor wurde ein modifiziertes Exosom genutzt, das zusammen mit einem Glykoprotein des Rabiesvirus die MikroRNA über die Bluthirnschranke hinweg ins ZNS transportierte. Die Substanz wurde über die Schwanzvene verabreicht. Es wurden zwei MikroRNAs getestet, die auch physiologisch vorkommen und in SCA3-PatientInnen reduziert zu sein scheinen (Tang et al., 2023). Sie binden die 3'UTR Region der RNA des Ataxin-3 und werden nicht in den RISC eingebaut. Dies bietet den Vorteil, dass die MikroRNA wieder abgebaut wird, die Substanz muss aber regelmäßig verabreicht werden. Das mutante ATXN3 und dessen RNA wurden signifikant reduziert. Auch der koordinatorische Phänotyp der Tiere konnte verbessert werden. Weiterhin zeigte sich eine verringerte Apoptose der Purkinjezellen. In den tiefen cerebellären Nuclei schien es unter Therapie keinen Anhalt für eine inflammatorische Reaktion zu geben (Tang et al., 2023).

### 1.5.2 RNA-Interferenz mittels *Small Interfering RNA*

Ein weiterer Therapieansatz ist die Herunterregulation der mRNA mittels *Small Interfering RNA* (siRNA). Die Verwendung von siRNA ist ein physiologischer Mechanismus der Zelle zur Abwehr von Fremd-RNA bei Virusinfektionen. Sie entsteht, indem die Endoribonuclease *Dicer* doppelsträngige RNA oder auch shRNA in kleinere Stücke zerschneidet. Danach wird die siRNA in den RISC integriert, welcher wiederum die Target-RNA in kleine Stücke zerschneiden kann. So hat die siRNA eine regulatorische Wirkung auf die Genexpression (Friedrich & Aigner, 2022; Ketting et al., 2001).

Bereits 2002 konnte eine allel-spezifische siRNA, die den SNP 987 bindet, die Level an mutantem ATXN3 drastisch in humanen Nierenzellen, die gleichzeitig mit einem humanen mutanten ATXN3-Plasmid transfiziert waren, reduzieren. Die siRNA wurde dabei ebenfalls über ein Plasmid eingebracht. (Li et al., 2002). Auch bei Miller et al. 2003 sowie bei Alves et al. 2010 wurde eine siRNA getestet, die den SNP 987 bindet. Dieser wird von 70% aller SCA3-PatientInnen im expandierten Allel getragen. Bei diesen Betroffenen könnten die beiden siRNAs angewandt werden und nur das erkrankte Allel regulieren. Der Unterschied der beiden Studien bestand in der Art der Aufnahme der

siRNA in die Zellen. Bei Miller et al. wurde ein Plasmid verwendet, bei Alves et al. ein lentiviraler Vektor. *In vitro* konnte in beiden Studien das mutante ATXN3 sowie dessen RNA herunterreguliert werden. Die Therapie wirkte sich jeweils kaum auf die Level des wildtypischen Allels aus (Alves et al., 2010; Miller et al., 2003). Alves et al. testeten ihre siRNA daraufhin *in vivo* im SCA3-Rattenmodell mittels Injektion direkt ins Striatum. Die Level an mutantem ATXN3 in den mit siRNA behandelten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren waren signifikant reduziert. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass der Neuronenverlust und die Nucleus-Atrophie, die typischerweise im SCA3 Striatum zu finden sind, reduziert wurden (Alves et al., 2010).

Weiterhin wurden einzelsträngige siRNAs, die die CAG-Wiederholungen binden, in humanen Fibroblasten von SCA3-PatientInnen sowie weiteren PolyQ-KrankheitsträgerInnen getestet. Es konnten relevante allel-spezifische Reduktionen der Krankheitsproteine erreicht werden (Fischer et al., 2016).

2015 entwickelten Conceição et al. *Stable Nucleic Acid Lipid Particles* (SNALPs), die die siRNA über die Bluthirnschranke ins ZNS transportieren und somit eine intravenöse Verabreichung ermöglichen. Der Ansatz wurde im transgenen WT/YAC84Q-Mausmodell und in einem lentiviralen Mausmodell getestet. Es konnte eine gute Akkumulation der siRNA im Gehirn erreicht werden, wodurch die ATXN3-Aggregation verringert werden konnte, was weiterhin die motorischen Defizite der Tiere verringerte (Conceicao et al., 2016).

### 1.5.3 RNA-Interferenz mittels *Small Hairpin RNA*

Den Ansatz der Verwendung von shRNA in der SCA3 wurde 2013 von Nobrega et al. untersucht. Es wurde das transgene WT/YAC84Q-Mausmodell verwendet, welches mit einer shRNA behandelt wurde, die mittels eines lentiviralen Vektors ICV appliziert wurde und spezifisch die mutante RNA des Ataxin-3 herunterregulieren sollte. Histologisch zeigten sich weniger ATXN3-Aggregate, wodurch der Zelltod verringert wurde und folglich mehr Purkinjezellen erhalten blieben. Es lag eine Reduktion sowohl des löslichen als auch des aggregierten ATXN3 vor, während die Expression des endogenen Atxn3s unverändert blieb. In der PCR konnte eine Reduktion der mutanten mRNA in behandelten Mäusen detektiert werden. Phänotypisch blieben die Koordination und Balance erhalten. Es zeigte sich ein stabiles Gangbild und die Tiere ließen die ansonsten beobachtete

Hyperaktivität nicht erkennen (Nobrega et al., 2013). Die getestete shRNA wurde weiterhin in einem Langzeitversuch untersucht, wobei sich zeigte, dass die nach Injektion bestehende vorübergehende inflammatorische Reaktion nach 20 Wochen abklingt und auch der endogene RISC nicht übersättigt ist. Es wurden also keine langfristigen toxischen Effekte durch die shRNA-Behandlung *in vivo* entdeckt (Nobrega et al., 2019).

Zusammenfassend ist die Durchführung klinischer Studien zu Therapien mittels RNA-Interferenz am Menschen besonders im Falle der SCA3 jedoch aus zwei Hauptgründen schwierig. Einerseits kann die in den RISC eingebaute regulatorische RNA nicht mehr aus dem Organismus entfernt werden, sodass damit verbundene Nebenwirkungen nicht zu eliminieren wären, die z.B. durch unvorhersehbare *Off-Targets* entstehen könnten.

Andererseits können PatientInnen, die die regulatorische RNA erhalten haben, an keiner weiteren Studie teilnehmen, da sie immer einem nicht-ausschließbaren Einflussfaktor - nämlich der eingebrachten RNA - unterliegen. Da die SCA3 insgesamt eine seltene Erkrankung ist und eine geringe Anzahl an Betroffenen vorliegt, würde dies die Forschungsmöglichkeiten drastisch reduzieren.

### 1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Die im Rahmen dieser Promotion durchgeführten *in vivo* Studien sollten untersuchen, ob das Expressionslevel des Erkrankungsproteins Ataxin3 sowie dessen RNA mithilfe von Antisense-Oligonukleotiden herunterreguliert werden kann. Dadurch sollen die Symptome der SCA3 langfristig reduziert werden und der Progress der Erkrankung aufgehalten werden. ASOs sind gentherapeutische Mittel, die auf RNA-Ebene in die Proteinbiosynthese eingreifen. Sie binden die RNA komplementär, sodass diese zellintern durch die RNaseH1 abgebaut wird und das zugehörige Protein nicht translatiert werden kann.

In der ersten Studie wurden ASOs verwendet, die allel-unspezifisch ATXN3 herunterregulieren, also sowohl das expandierte als auch das wildtypische ATXN3. Dies scheint ohne Effekte auf den Organismus möglich zu sein, wie in *ATXN3-KnockOut*-Mäusen gezeigt wurde.

## Einleitung

Für die zweite Studie wurden ASOs verwendet, die nur das expandierte Protein herunterregulieren sollten. Dafür wurde ein Polymorphismus genutzt, der sich bei über 70% der Betroffenen weltweit und bei allen Betroffenen in Deutschland in unmittelbarer Nähe zu den CAG-Wiederholungen befindet, während er sehr selten auf dem wildtypischen Allel zu finden ist. Dieser Basenunterschied wird bei der Transkription auch an die mRNA weitergegeben, sodass sich zwischen der allel-spezifischen ASO und der wildtypischen RNA ein *miss-match* ergibt. Die RNA des expandierten ATXN3 dagegen wird gebunden, wenn sie den Polymorphismus trägt.

Der Therapieansatz wurde in einem für die SCA3 transgenen WT/YAC84Q- Mausmodell der Linie B6;CBA-Tg(ATXN3\*)84.2Cce/IbezJ getestet. Vor Durchführung der Versuche wurde die Länge der CAG-Wiederholungen der Versuchstiere bestimmt, um sicher zu stellen, dass diese tatsächlich im pathologischen Bereich liegt. Außerdem wurden die Tiere während der gesamten Studiendauer wöchentlich gewogen, um einen Überblick über ihre Entwicklung zu haben. Die ASOs wurden unter Narkose mittels stereotaktischer bilateraler ICV-Injektion appliziert. Sie sollten mithilfe der Liquorzirkulation im ZNS verteilt werden, um zu den Hauptpathogenese-Orten zu gelangen. Im Falle der allel-spezifischen ASOs wurde vor Durchführung des eigentlichen Versuches eine Toxizitätsstudie an wildtypischen Tieren durchgeführt, um die generelle Verträglichkeit der Substanzen zu evaluieren und die maximal tolerierte Dosis festzustellen. Im Anschluss an die Injektionen wurden die Tiere sowohl in der Toxizitätsstudie als auch in den tatsächlichen Versuchen für drei Tage engmaschig kontrolliert sowie nochmals nach einer Woche nachbeobachtet. Die Tiere wurden gewogen und ihre Körperpflege sowie ihr Sozialverhalten evaluiert. Dies wurde in einem *Score* festgehalten. Des Weiteren wurde ein Koordinationstest, der sogenannte *Wirehang*-Test, durchgeführt. Dadurch sollten Unverträglichkeitsreaktionen der Substanz oder der Intervention an sich detektiert werden. In der Studie zu den allel-spezifischen ASOs wurde das Gangbild vor und nach den Injektionen mittels einer KI-gestützten *Beam-Walk*-Analyse untersucht. 4 Wochen nach den Injektionen zu einem Zeitpunkt, zu welchem erwartet wurde, dass die ASOs ihre Wirkung vollständig entfalten konnten, wurden die Tiere euthanasiert und jeweils das Gehirn, das Blut sowie die inneren Organe entnommen. Das Gehirn wurde in Cerebellum, Hirnstamm und Frontalen Cortex unterteilt. Daraus wurden sowohl die DNA, die RNA als auch die Proteine isoliert.

## Einleitung

Im Rahmen dieser Promotion wurden für die allel-unspezifischen ASOs die Expressionslevel der RNA des Ataxin-3 mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Es sollte geprüft werden, ob durch die ASOs eine Regulation der mRNA stattfinden konnte. In der Studie zu den allel-spezifischen ASOs wurde das Expressionslevel des ATXN3-Proteins untersucht, um zu analysieren, ob dieses durch die Therapie reguliert wurde.

Alle Schritte, die zum Erreichen des formulierten Ziels notwendig waren, sind in Abbildung 1.2 dargestellt.

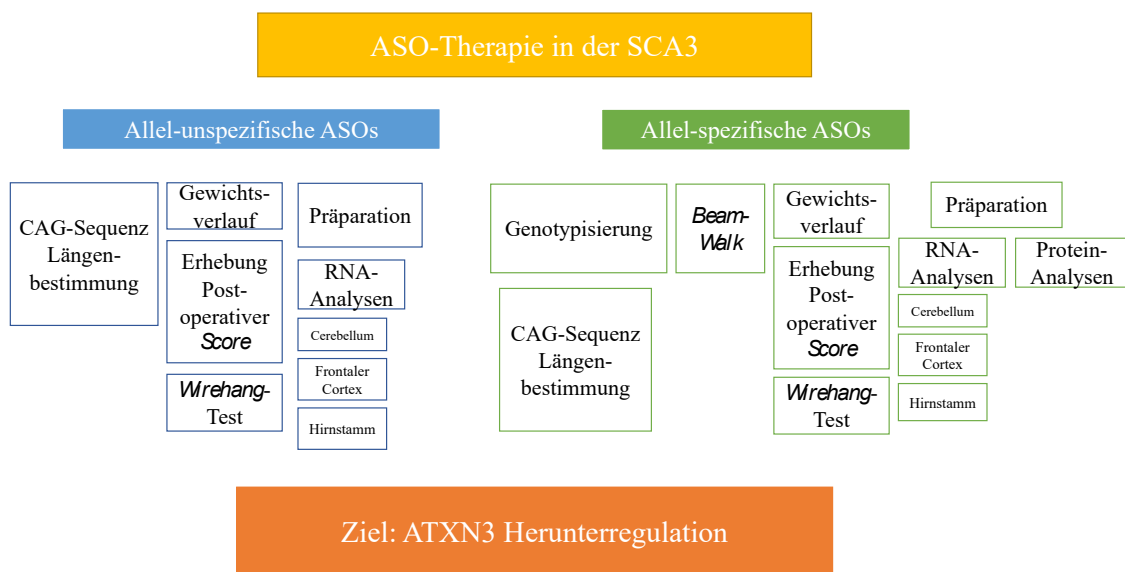


Abbildung 1.2 Aufbau der im Rahmen dieser Promotion durchgeführten Studien

In der Abbildung sind schematisch die Abläufe der beiden ASO-Studien nebeneinander dargestellt. Für die allel-unspezifischen ASOs wurden zuerst die CAG-Wiederholungslängen der Versuchstiere ermittelt. Das Gewicht wurde wöchentlich dokumentiert. Nachdem die Injektionen stattgefunden hatten, wurden der postoperative Score sowie der Wirehang-Test durchgeführt. Abschließend wurden die Tiere präpariert und die RNA aus dem Gehirn isoliert. Diese wurde auf die Expression der RNA des humanen ATXN3-Gens untersucht. In der Studie zu den allel-spezifischen ASOs wurde zusätzlich der Beam-Walk vor und nach den Injektionen aufgenommen, um Ganganalysen durchzuführen. Außerdem wurden Proteinanalysen aus dem gewonnenen Gewebe durchgeführt.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräteverzeichnis

Tabelle 2.1 Geräteverzeichnis

| Name                                             | Gerätetyp/ Verwendung         | Hersteller                                  |
|--------------------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------------|
| AF 800                                           | Eismaschine                   | Scotsman, Ice Systems,<br>Vernon Hills, USA |
| <i>AlphaMetrix G-Storm</i>                       | Thermocycler                  | Biotech GmbH,<br>Wiesbaden, DE              |
| Bio-Rad Gel Dox XR+<br>System                    | Detektion <i>Western Blot</i> | Bio-Rad Laboratories,<br>Hercules USA       |
| BioPhotometer                                    | Photometer                    | Eppendorf, Hamburg,<br>DE                   |
| Centrifuge 5415 R                                | Zentrifuge, gekühlt           | Eppendorf, Hamburg,<br>DE                   |
| Centrifuge 5420                                  | Zentrifuge                    | Eppendorf, Hamburg,<br>DE                   |
| Centrifuge 5804                                  | Zentrifuge                    | Eppendorf, Hamburg,<br>DE                   |
| <i>CEQ 8000 Genetic<br/>Analysis System</i>      | Sequenzierer                  | Beckman Coulter Inc.,<br>Brea, USA          |
| CL 1500 Eco                                      | Lichtquelle                   | Carl-Zeiss AG,<br>Oberkochen, DE            |
| <i>Digital Lab Standard</i>                      | Stereotaktische Injektionen   | Stoelting, Wood Dale,<br>USA                |
| <i>Electrophoresis Power<br/>Supply E835</i>     | Spannungsquelle               | Consort, Turnhout, BEL                      |
| Eppendorf <i>Research</i><br>Pipette 10 µL       | Pipette                       | Eppendorf, Hamburg,<br>DE                   |
| Eppendorf <i>Research</i><br>Pipette 100 µL      | Pipette                       | Eppendorf, Hamburg,<br>DE                   |
| Eppendorf <i>Research</i><br>Pipette 1000 µL     | Pipette                       | Eppendorf, Hamburg,<br>DE                   |
| Eppendorf <i>Research plus</i><br>Pipette 10 µL  | Pipette                       | Eppendorf, Hamburg,<br>DE                   |
| Eppendorf <i>Research plus</i><br>Pipette 100 µL | Pipette                       | Eppendorf, Hamburg,<br>DE                   |
| Fadenhalter                                      | Hautnaht                      | Fine Science Tools,<br>Heidelberg, DE       |
| FST # 19007-07                                   | Bohraufsätze                  | Fine Science Tools<br>GmbH, Heidelberg, DE  |

## Material & Methoden

| <b>Name</b>                            | <b>Gerätetyp/ Verwendung</b> | <b>Hersteller</b>                                         |
|----------------------------------------|------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Gefrierschrank                         | Gefrierschrank -20°C         | Liebherr, Biberach a. d. Riß, DE                          |
| Gelkamm 12 <i>Well</i>                 | Gelkamm                      | PEQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE                  |
| Germinator 500                         | Trockensterilisationsgerät   | Cell Point Scientific Inc., Gaithersburg, USA             |
| GFL 1083                               | Wasserbad                    | GFL, Burgwedel, DE                                        |
| Hamilton Spritze 10 µL                 | Stereotaktische Injektion    | Hamilton, Bonaduz, CH                                     |
| Hamilton Spritze 5µL                   | Stereotaktische Injektion    | Hamilton, Bonaduz, CH                                     |
| <i>Heat Sealer S 100</i>               | Platten Versiegler           | Eppendorf, Hamburg, DE                                    |
| <i>Hera Freeze</i>                     | Gefrierschrank -80°C         | Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE                    |
| <i>HeraTherm Oven</i>                  | Wärmeschrank                 | Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE                    |
| Hobby Drill Kleinbohrmaschine Nr. 0400 | Bohrer                       | Donau Elektronik, Melten, DE                              |
| <i>Homeothermic Monitor</i>            | Wärmekissen                  | Harvard Apparatus, Holliston, USA                         |
| Kocherklemme                           | Hautnaht                     | Fine Science Tools, Heidelberg, DE                        |
| Kühlschrank                            | Kühlschrank 4°C              | Liebherr, Biberach a. d. Riß, DE                          |
| <i>LightCycler 480 II</i>              | Thermocycler                 | Roche, Mannheim, DE                                       |
| LS 320C SCS                            | Waage                        | Wägetechnik Pescale, Bisingen, DE                         |
| Lupe                                   | Lupe                         | Stoelting, Wood Dale, USA                                 |
| Mikrowelle                             | Mikrowelle                   | Siemens, München, DE                                      |
| <i>Mini-PROTEAN Tetra Cell</i>         | Elektrophorese Kammer        | Bio-Rad Laboratories, Hercules USA                        |
| Modell 40-0708                         | Laufkammer                   | PEQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE                  |
| Modell 40-1214                         | Laufkammer                   | PEQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE                  |
| Pinzette, anatomisch                   | Hautnaht                     | Fine Science Tools, Heidelberg, DE                        |
| Pinzette, chirurgisch                  | Hautnaht                     | Fine Science Tools, Heidelberg, DE                        |
| Porzellan Mörser mit Ausguss           | Proteinisolation             | Morgan Advanced Materials Haldenwanger GmbH, Wadkraig, DE |
| Precisa 404 A                          | Waage                        | Wägetechnik Pescale, Bisingen, DE                         |

| <b>Name</b>           | <b>Gerätetyp/ Verwendung</b> | <b>Hersteller</b>                            |
|-----------------------|------------------------------|----------------------------------------------|
| <i>Printer P95</i>    | Drucker Gelbilder            | Mitsubishi, Ratingen, DE                     |
| Quantum™ EX 06196     | Wasseraufbereitungssystem    | Millipore, Eschborn, DE                      |
| Rasierer              | Rasierer                     | Wahl, Twello, NL                             |
| Rotlichtlampe         | Rotlichtlampe                | Sanitas, Ulm, DE                             |
| Schere                | Hautnaht                     | Fine Science Tools,<br>Heidelberg, DE        |
| Spülmaschine          | Spülmaschine                 | Miele Professional,<br>Gütersloh, DE         |
| <i>Sun Lab SU1550</i> | Zentrifuge                   | Labdiscount GmbH,<br>Mannheim, DE            |
| Thermostatplus        | Heizblock                    | Eppendorf, Hamburg,<br>DE                    |
| Tuttnauer 5075 ELV    | Autoklav                     | Systec, Wettenberg, DE                       |
| UV-Gel Studio Plus    | UV-GelStudio Plus            | Analytic Jena, Jena, DE                      |
| Vortex Mixer          | Vortexer                     | NeoLab, Heidelberg, DE                       |
| VortexGenie 2         | Vortexer                     | Scientific Industries Inc.,<br>New York, USA |

### 2.1.2 Reagenziensets (Kits)

Tabelle 2.2 Verzeichnis der verwendeten Reagenziensets

| <b>Bezeichnung</b>                                   | <b>Verwendung</b>     | <b>Hersteller</b>                              |
|------------------------------------------------------|-----------------------|------------------------------------------------|
| <i>High Pure PCR Template Preparation Kit</i>        | DNA Isolation         | Roche, Mannheim, DE                            |
| <i>LightCycler EvoScript RNA SYBR Green I Master</i> | qRT-PCR               | Roche, Mannheim, DE                            |
| <i>Luna Universal One-Step RT-qPCR Kit</i>           | qRT-PCR               | New England Bio Labs,<br>Frankfurt a. Main, DE |
| <i>Pierce BCA Protein Assay Kit</i>                  | <i>Western Blot</i>   | Thermo Fisher Scientific<br>Inc., Waltham, USA |
| <i>QuantiNova SYBR Green PCR Kit</i>                 | qRT-PCR               | Qiagen, Hilden, DE                             |
| <i>QuantiNova SYBR Green RT-PCR Kit</i>              | qRT-PCR               | Qiagen, Hilden, DE                             |
| <i>QuantiTect Reverse Transkription Kit</i>          | Reverse Transkription | Qiagen, Hilden, DE                             |
| <i>QuantiTect SYBR Green PCR Kit</i>                 | qRT-PCR               | Qiagen, Hilden, DE                             |

## 2.1.3 Chemikalien und Biochemikalien

Tabelle 2.3 Verzeichnis der verwendeten Chemikalien und Biochemikalien

| Bezeichnung                                            | Verwendung                                                 | Hersteller                                           |
|--------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| 10x PCR Puffer                                         | PCR                                                        | Qiagen, Hilden, DE                                   |
| 2-Propanol                                             |                                                            | Honeywell/ Riedel-de-Haën <sup>TM</sup> , Seelze, DE |
| 5x Q-Solution                                          | PCR                                                        | Qiagen, Hilden, DE                                   |
| Acrylamid                                              | <i>Western Blot</i>                                        | AppliChem, Darmstadt, DE                             |
| <i>Dubeccos Phosphate Buffered Saline Gibco (DPBS)</i> |                                                            | Life Technologies Europe, NL                         |
| Ethanol absolut                                        |                                                            | Pan Reac Applichem, ITW Reagents, Darmstadt, DE      |
| Ethidiumbromidlösung 1% (10 mg/mL)                     | Gelelektrophorese                                          | Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, DE                   |
| <i>Gene Ruler Mix 500 ng/μL</i>                        | Größen Standard Gelelektrophorese, 10-10.000 bp, 21 Banden | PEQLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE             |
| <i>GenomeLab<sup>TM</sup> DNA Size Standard 600</i>    | Fragmentlängenanalyse                                      | Beckman Coulter Inc., Brea, USA                      |
| <i>GenomeLab<sup>TM</sup> Sample Loading Solution</i>  | Fragmentlängenanalyse                                      | Beckman Coulter Inc., Brea, USA                      |
| <i>GenomeLab<sup>TM</sup> Separation Buffer</i>        | Fragmentlängenanalyse                                      | Beckman Coulter Inc., Brea, USA                      |
| <i>GenomeLab<sup>TM</sup> Separation Gel</i>           | Fragmentlängenanalyse                                      | Beckman Coulter Inc., Brea, USA                      |
| Mineral Öl                                             | Fragmentlängenanalyse                                      | Beckman Coulter Inc., Brea, USA                      |
| MOPS                                                   | <i>Western Blot</i>                                        | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE                        |
| Non-Fett Trockenmilch-Pulver                           | <i>Western Blot</i>                                        | AppliChem, Darmstadt, DE                             |
| <i>PCR Grade Nucleotide Mix, 10 mM je Nukleotid</i>    | PCR Nukleotide                                             | Roche, Mannheim, DE                                  |
| <i>Pierce Lane Marker Reducing Sample Buffer</i>       | <i>Western Blot</i>                                        | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA               |
| Ponceau S                                              | <i>Western Blot</i>                                        | Sigma-Aldrich, Darmstadt, DE                         |
| <i>Precision Plus Protein Dual Color Standards</i>     | Protein-Konzentrationsbestimmung                           | Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA                  |
| <i>Protease Inhibitor, 25x Complete</i>                | Proteinisolation                                           | F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH                   |
| RNAse ZAP <sup>TM</sup>                                | qRT-PCR                                                    | Sigma-Aldrich, Darmstadt, DE                         |

| <b>Bezeichnung</b>               | <b>Verwendung</b>   | <b>Hersteller</b>             |
|----------------------------------|---------------------|-------------------------------|
| SeaKem® LE-Agarose               | Gelelektrophorese   | Lonza, Rockland ME, USA       |
| TEMED                            | <i>Western Blot</i> | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE |
| Tween-20                         | <i>Western Blot</i> | AppliChem, Darmstadt, DE      |
| <i>Western Blocking Reagents</i> | <i>Western Blot</i> | Roche, Mannheim, DE           |

#### 2.1.4 Medikamente

*Tabelle 2.4 Verzeichnis der verwendeten Medikamente*

| <b>Bezeichnung</b>                                   | <b>Verwendung</b>                             | <b>Hersteller</b>                                          |
|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Buprenoret 0,3 mg/ mL                                | Antidot 3K Narkose                            | Richter Pharma AG, Wels, AT                                |
| Dormilan 1 mg/ mL                                    | Medetomidinhydrochlorid, 1 mg/ mL, 3K Narkose | Vetpharma animal health, Barcelona, SP                     |
| Fentadon 50 µg/ mL                                   | Fentanyl, Opioid, Bestandteil 3K Narkose      | Dechra Veterinary Products Deutschland GmbH, Aulendorf, DE |
| Flumazenil Kabi 0,1 mg/ mL                           | Antidot 3K Narkose                            | Fresenius Kabi, Bad Homburg, DE                            |
| Metacam Injektionslösung für Katzen 2 mg/ mL         | Meloxicam, subkutanes Analgetikum             | Boehringer, Ingelheim, DE                                  |
| Metacam Suspension zum Eingeben für Hunde 1,5 mg/ mL | Meloxicam, orales Analgetikum                 | Boehringer, Ingelheim, DE                                  |
| Midazolam-Hameln 5 mg/mL                             | Benzodiazepin, 3K Narkose                     | Hameln pharma GmbH, Hameln, DE                             |
| Nosedorm 5 mg/ mL                                    | Atipamezolhydrochlorid, Antidot 3K Narkose    | Alfavet Tierarzneimittel GmbH, Neumünster, DE              |
| Xylocain 1%                                          | Lokalanästhetikum                             | Aspen Pharma Trading Limits, Dublin, IR                    |

#### 2.1.5 Enzyme

*Tabelle 2.5 Verzeichnis der verwendeten Enzyme*

| <b>Name</b>                | <b>Verwendung</b> | <b>Hersteller</b>  |
|----------------------------|-------------------|--------------------|
| Taq Polymerase 5 units/ µL | PCR               | Qiagen, Hilden, DE |

## 2.1.6 Puffer und Lösungen

Tabelle 2.6 Verzeichnis der verwendeten Puffer und Lösungen

| Bezeichnung                                   | Verwendung          | Zusammensetzung                                                                              |
|-----------------------------------------------|---------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3,5X Puffer                                   | <i>Western Blot</i> | 52,32 g Bis-Tris<br>200 mL Wasser<br>pH = 6,5-6,8 mit HCl                                    |
| Ammonium Persulfat (APS) 10%                  | <i>Western Blot</i> | 10 mL Wasser<br>1 g(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>             |
| Bis-Tris Puffer                               | <i>Western Blot</i> | Wasser<br>261,6 g/ Bis-Tris                                                                  |
| <i>MOPS SDS Running Buffer</i> (1x)           | <i>Western Blot</i> | Wasser<br>1x MOPS SDS Running Buffer                                                         |
| NuPAGE MOPS SDS <i>Running Buffer</i> (20x)   | <i>Western Blot</i> | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA                                                       |
| NuPAGE Transferpuffer für Bis-Tris Gele (1x)  | <i>Western Blot</i> | Wasser<br>20% Methanol<br>1x NuPAGE Transfer Puffer für Bis-Tris Gele                        |
| NuPAGE Transferpuffer für Bis-Tris Gele (20x) | <i>Western Blot</i> | Wasser<br>81,6 g/ L Bicine<br>104,64 g/ L Bis-Tris<br>G g/ L Disodium EDTA                   |
| Orange G Ladepuffer                           | Gelelektrophorese   | 30% Glycerol<br>Orange G nach Belieben                                                       |
| <i>Pink Buffer</i> (5x)                       | <i>Western Blot</i> | Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA                                                       |
| RIPA-Puffer                                   | <i>Western Blot</i> | Sigma-Aldrich, Darmstadt, DE                                                                 |
| <i>Separating Gel</i> Bis-Tris, 8 mL, 10%     | <i>Western Blot</i> | 2,20 mL 3,5x Puffer<br>2 mL 40% Acrylamid<br>3,63 mL Wasser<br>80 µL 10% APS<br>8 µL TEMED   |
| <i>Stacking Gel</i> Bis-Tris, 3,5 mL, 4%      | <i>Western Blot</i> | 0,86 mL 3,5x Puffer<br>0,3 mL 40% Acrylamid<br>1,81 mL Wasser<br>30 µL 10% APS<br>3 µL TEMED |
| Tris EDTA (10x)                               | Gelelektrophorese   | 89 mM Tris Basis<br>89 mM Borsäure.<br>2 mM EDTA                                             |

| Bezeichnung                                    | Verwendung          | Zusammensetzung                                    |
|------------------------------------------------|---------------------|----------------------------------------------------|
| Tris gepufferte Saline                         | <i>Western Blot</i> | Wasser<br>6,0568 g/ L Tris Base<br>8,766 g/ L NaCl |
| Tris-gepufferte Saline – 0,1% Tween-20 (TBS-T) | <i>Western Blot</i> | Tris-gepufferte Saline<br>1 mL/ L Tween-20         |

## 2.1.7 Primer

Tabelle 2.5 Verzeichnis der verwendeten Primer

| Gen                      | Sequenz 5'-3'               | Verwendung                       |
|--------------------------|-----------------------------|----------------------------------|
| Hum ATXN3 A Exon 2/4 f   | TGGATGAGGAGGAGAGGATG        | qPCR                             |
| Hum ATXN3 A Exon 2/4 r   | CAAGGCATTGCTTATAACCTGA      | qPCR                             |
| Hum ATXN3 B f            | GAGAGGATGAGAATGGCAGAAG      | qPCR                             |
| Hum ATXN3 B r            | CTAAACCCCAAACCTTTCAAGGC     | qPCR                             |
| Hum ATXN3 C Exon 10/11 f | TCAGGACAGAGTTCACATCCAT      | qPCR                             |
| Hum ATXN3 C Exon 10/11 r | GCATGTCTTCTTCACTCATAGCA     | qPCR                             |
| Hum ATXN3 r              | TGGCCTTTCACATGGATGTGAA      | Fragmentlängen-analyse           |
| Hum ATXN3 f              | GAATATTTTAGCCCTGTGGAATT     | Genotypisierung der YAC84Q-Mäuse |
| Hum ATXN3 r              | AGTTTAAAATCAGTACCTGTAAAAACG | Genotypisierung der YAC84Q-Mäuse |
| Mur Actin f              | CCACACCCGCCACCAGTTCG        | qPCR                             |
| Mur Actin r              | TACAGCCCGGGGAGCATCGT        | qPCR                             |
| Mur Atxn3 f              | AGGCAAGCAGTGGTTTAACT        | qPCR                             |
| Mur Atxn3 r              | TGGCAGATCACCTTAACAACA       | qPCR                             |
| Mur Pdh f                | GTAGAGGACACGGGCAAGAT        | qPCR                             |
| Mur Pdh r                | TGAAAACGCCTCTTCAGCA         | qPCR                             |
| Mur Sdha f               | GCAGCACAGGGAGGTATCA         | qPCR                             |
| Mur Sdha r               | CTCAACCACAGAGGCAGGA         | qPCR                             |
| Mur Tbp f                | TCTATTTTGGAAGAGCAACAAAGAC   | qPCR                             |
| Mur Tbp r                | GAGGCTGCTGCAGTTGCTA         | qPCR                             |

## 2.1.8 Antikörper

Tabelle 2.6 Verzeichnis der verwendeten Antikörper

| <b>Primärantikörper</b>   | <b>Wirt</b> | <b>Verdünnung</b> | <b>Hersteller</b>                        |
|---------------------------|-------------|-------------------|------------------------------------------|
| Anti-ATXN3 (13H9L9)       | Hase        | 1:2.000/ 1:5.000  | Invitrogen AG, Carlsbad, USA             |
| Anti-ATXN3 (2SCA1H9)      | Maus        | 1:2500            | Thermo Fisher Scientific, Dreieich, DE   |
| Anti-VCL (V9131)          | Maus        | 1:100.000         | Merck KGaA, Darmstadt, DE                |
| <b>Sekundärantikörper</b> |             |                   |                                          |
| <i>Anti-Mouse-IgG</i>     |             | 1:5.000           | Jackson Immuno Research, West Grove, USA |
| <i>Anti-Rabbit-IgG</i>    |             | 1:5.000           | Jackson Immuno Research, West Grove, USA |

## 2.1.9 Antisense-Oligonukleotide

Tabelle 2.7 Verzeichnis der verwendeten Antisense-Oligonukleotide

| <b>Name</b>                                                | <b>Sequenz 5'-3'</b> | <b>Molekular-Gewicht (Da)</b> | <b>Hersteller</b>   |
|------------------------------------------------------------|----------------------|-------------------------------|---------------------|
| ASO 1                                                      | unbekannt            | unbekannt                     | Kooperationsfirma   |
| ASO 2                                                      | unbekannt            | unbekannt                     | Kooperationsfirma   |
| ASO 3                                                      | unbekannt            | unbekannt                     | Kooperationsfirma   |
| ASO 4                                                      | unbekannt            | unbekannt                     | Kooperationsfirma   |
| ASO Roche, interne ID A51_1122_67, Patent Nr. WO2020/45233 | AATCTTATTTACATCTTCC  | unbekannt                     | Roche, Mannheim, DE |
| ATXN3_Mut (mutASO)                                         | GGTCCCGCTGCTGC       | 4566.63                       | Qiagen, Hilden, DE  |
| ATXN3_WT (wtASO)                                           | GGTCCCCCTGCTGC       | 4526.6                        | Qiagen, Hilden, DE  |
| Random ASO                                                 | unbekannt            | unbekannt                     | Kooperationsfirma   |

## 2.1.10 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.8 Verzeichnis der verwendeten Verbrauchsmaterialien

| <b>Name</b>                                                           | <b>Verwendung</b>                                         | <b>Hersteller</b>                                   |
|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Bepanthen Augen- & Nasensalbe                                         | Stereotaktische Injektionen                               | Bayer Vital GmbH, Leverkusen, DE                    |
| Blotting Papier 1 mm                                                  | <i>Western Blot</i>                                       | Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE                       |
| Cellstar® Tubes 15 mL                                                 | 15 mL Falcon                                              | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE             |
| <i>Cleaning Clothes</i>                                               | Tücher                                                    | Tork, Dunstable, UK                                 |
| Ethilon Polyamid 6 5-0                                                | Monofiles, chirurgisches Nahtmaterial, nicht resorbierbar | Ethicon, Hallbergmoos, DE                           |
| <i>Feather disposable scalpel</i>                                     | Skalpell                                                  | Pfm medical, Köln, DE                               |
| <i>FrameStar 384 Well Skirted PCR Plate Roche StylePlus qPCR Seal</i> | qPCR Platte                                               | FrameStar, Wotton, Surrey, UK                       |
| <i>FrameStar 96 Well Skirted PCR Plate Roche StylePlus qPCR Seal</i>  | qPCR Platte                                               | FrameStar, Wotton, Surrey, UK                       |
| Joza Einmal Nitril Untersuchungshandschuhe Größe M                    | Handschuhe                                                | Medbet GmbH, Münster, DE                            |
| Kapillaren NA-HEP 9 µL                                                | Kapillaren retrobulbäre Blutentnahme                      | Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, DE |
| <i>Micro Fine 0,5 mL</i>                                              | Subkutane Injektionsspritzen                              | Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, DE               |
| <i>Microplate 96 Well, PS, F-Bottom</i>                               | Separation Buffer Plate                                   | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE             |
| Omnican F 0,01-1 mL                                                   | Subkutane Injektionsspritzen                              | B. Braun SE, Melsungen, DE                          |
| <i>PCR Consumables</i>                                                | <i>PCR-Stripes</i>                                        | Star-Lab, Hamburg, DE                               |
| <i>PCR Plate, 96x0,2 mL</i>                                           | PCR Platte                                                | Nerbe-Plus GmbH und Co. KG, Winsen/ Luhe, DE        |
| <i>Pipette tip 10 µL</i>                                              | Pipettenspitzen 10 µL                                     | Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE                 |
| <i>Pipette tip 100 µL</i>                                             | Pipettenspitzen 100 µL                                    | Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE                 |
| <i>Pipette tip 1000 µL</i>                                            | Pipettenspitzen 1000 µL                                   | Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE                 |
| <i>Reaction Tubes 1,5 mL</i>                                          | Reaktionsgefäße 1,5 mL                                    | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE             |

## Material & Methoden

| <b>Name</b>                                              | <b>Verwendung</b>           | <b>Hersteller</b>                               |
|----------------------------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------------------|
| <i>Reaction Tubes</i> 2 mL                               | Reaktionsgefäße 2 mL        | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE         |
| <i>Safe Lock Tubes</i> 1,5 mL<br>amber                   | UV-Schutz<br>Reaktionsgefäß | Eppendorf AG, Hamburg, DE                       |
| <i>Safe Lock Tubes</i> 2 mL                              | Sicherheitsreaktionsgefäße  | Eppendorf AG, Hamburg, DE                       |
| <i>Thermowell 96 Well PCR Platte No Lid, Non-treated</i> | <i>Sample Plate</i>         | Corning Incorporated, Salt Lake City, 84107 USA |
| Wattestäbchen steril                                     | Stereotaktische Injektionen | Heinz Herenz Medizinerbedarf GmbH, Hamburg, DE  |

### 2.1.8 Software und Internetressourcen

*Tabelle 2.9 Verzeichnis der verwendeten Software und Internetressourcen*

| <b>Name</b>                                  | <b>Verwendung</b>                                     | <b>Entwickler</b>                                      |
|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| <i>BioRender</i>                             | Erstellung wissenschaftlicher Abbildungen             | BioRender, Toronto, CA                                 |
| <i>ClinicalTrials.gov</i>                    | Datenbank klinische Studien (NCT-Seriennummern)       | National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, USA |
| Excel                                        | Datenverarbeitung und Auswertung                      | Microsoft Corporation, Redmond, USA                    |
| <i>GraphPad Prism 9</i>                      | Statistik und Erstellung Graphen                      | GraphPad Software, San Diego, USA                      |
| <i>Image J</i>                               | Bilderstellung und Bearbeitung<br><i>Western Blot</i> | Wayne Rasband NIH, Maryland, USA                       |
| <i>Image Lab</i>                             | Bilderstellung und Bearbeitung<br><i>Western Blot</i> | Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA                    |
| <i>iMovie</i>                                | Video-Schnitt Programm                                | Apple, Cupertino, USA                                  |
| <i>LightCycler® 480 Software-Version 1.5</i> | Software qPCR                                         | Roche, Mannheim, DE                                    |
| <i>MicroplateManager® Software</i>           | Proteinkonzentrationsbestimmung                       | Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA                    |
| PowerPoint                                   | Graphiken-Erstellung und Bearbeitung                  | Microsoft Corporation, Redmond, USA                    |
| <i>Primer Blast</i>                          | Design der Primer                                     | National Library of Medicine, 8600 Rockville Pike, USA |
| SCA3 Diagnostik Programm                     | Software Fragmentlängenanalyse                        | Intern                                                 |
| <i>VisionWorks® Software</i>                 | Software Gel                                          | Analytic Jena, Jena, DE                                |
| Word                                         | Kommunikation und Dokumentation                       | Microsoft Corporation, Redmond, USA                    |

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Tiere und Tierhaltung

#### 2.2.1.1 Tiermodell

In dieser Studie wurde das Tiermodell der transgenen WT/YAC84Q-C57Bl6-Mäuse der Linie B6;CBA-Tg(ATXN3\*)84.2Cce/IbezJ verwendet. Diese wurden erstmals durch Cemal et al. 2002 beschrieben (Cemal et al., 2002). Die Tiere tragen hemizygot den gesamten humanen *ATXN3 Locus* mit 84 CAG-Wiederholungen, was den Vorteil mit sich bringt, dass alle regulatorischen Einheiten sowie der humane Promotor ebenfalls abgebildet werden. Phänotypisch kann bereits ab 4 Wochen eine leichte Gangstörung gesehen werden. Ebenso sollen mit ca. 24 Wochen stärkere neurologische Symptome wie Tremor, Hypoaktivität oder *Clasping* gezeigt werden. Ebenso zeigt sich eine Neurodegeneration in den Hauptpathogenese-Orten wie dem Cerebellum. Dort finden sich auch neuronale intranukleäre Einschlüsse des Ataxin-3 mit Ubiquitinierungen, wie sie auch beim Menschen zu finden sind. (Cemal et al., 2002). Heutige Analysen in unterschiedlichen Laboren weltweit zeigen allerdings, dass der 2002 beschriebene Phänotyp der Tiere nicht mehr abbildbar ist, wenn die Tiere nicht homozygot die 84Q Wiederholungen tragen (Costa Mdo et al., 2013; Shakkottai et al., 2011; Toonen, Overzier, et al., 2018; Weber et al., 2020). Die Aggregate und histologischen Veränderungen sind dagegen weiterhin zu finden. Dies ist wichtig, da für Therapiestudien nicht nur phänotypische Veränderungen zu beobachten sind, sondern auch histologische und/oder molekularbiologische Methoden verwendet werden sollten.

Für den ersten Teil der Versuche, in welchem die Antisense Oligonukleotide (ASOs) in Zusammenarbeit mit einer Firma getestet werden sollten, wurden 102 Mäuse verwendet, die im *Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME, USA) gezüchtet wurden. Mit 2 weiteren Tieren wurden die 39 Versuchstiere für den zweiten Teil der Versuche mit den allelspezifischen ASOs selbst gezüchtet.

Das Regierungspräsidium Tübingen hat die entsprechenden Tierversuche unter den Versuchsnummern HG06/21G und HG07/21G genehmigt.

### 2.2.1.2 Tierhaltung

Die Versuchstiere wurden in einer offenen Tierhaltung in Typ 2 Langkäfigen zu maximal 5 Tieren pro Käfig gehalten und mit Standardfutter gefüttert. Ebenfalls stand allen Tieren ein Zellstoff als Nistmaterial zur Verfügung. Die Temperatur lag bei  $22\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  und die Luftfeuchtigkeit bei  $55\% \pm 2\%$ . Es bestand ein 12 h Tag/ Nacht Rhythmus. Eine Gruppenhaltung wurde präferiert, Weibchen erhielten ein aus Holz bestehendes Spielzeug. Um Revierkämpfe um ein Spielzeug bei den männlichen Tieren zu vermeiden, erhielten nur einzeln sitzende Männchen Spielzeug zur Beschäftigung.

### 2.2.1.3 Gewinnung von Ohrstanzen

Um die Mäuse auf die entsprechende genetische Veränderung hin zu analysieren, wurden Ohrstanzen zur Isolation von DNA gewonnen. Dafür erfolgte eine kurze Ventilationsanästhesie mit 5% Isofluran. Nachdem die Maus narkotisiert war, wurde mithilfe einer Lochstanze die Markierung nach dem Schema aus Abbildung 2.1 gestanzt. Mithilfe dieser Ohrlochmarkierung konnten die Tiere im Käfig voneinander unterschieden werden. Die gewonnene Probe wurde in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß aufbewahrt und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20\text{ °C}$  eingefroren.

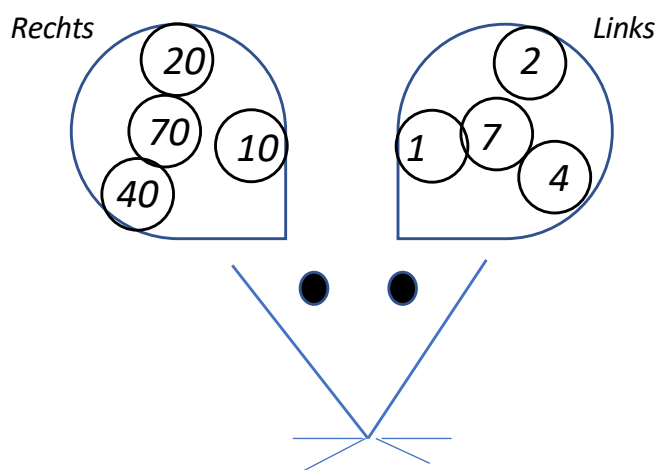


Abbildung 2.1 Schema zur Markierung mittels Ohrstanze

Auf dem linken Ohr der Maus fanden sich die Zahlen 1-9, die aus den Stanzstellen, die die entsprechenden Zahlen bedeuten, zusammengesetzt werden konnten. So würde man für eine 3 die Positionen 1 und 2 mit einer Stanze markieren. Sollte eine Zahl höher als 9 markiert werden, dann wurde auch das rechte Ohr entsprechend dazu markiert.

### 2.2.1.4 Gewichtserhebung

Ab Ankunft der Versuchsmäuse in der Tierhaltung wurde ihr Gewicht wöchentlich erhoben. Es war zu erwarten, dass dieses im Verlauf zunimmt, da sich die Tiere im Alter von 4 Wochen bis 12 Wochen noch im Wachstum befinden.

### 2.2.1.5 Stereotaktische Injektionen

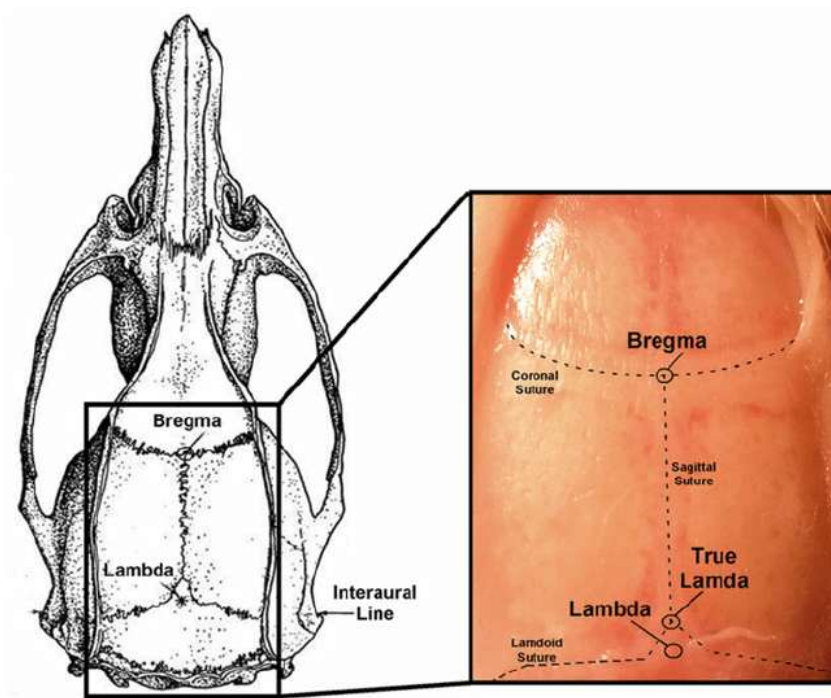


Abbildung 2.2 Die Schädelnähte Lambda und Bregma am Maus-Schädel

Die Abbildung wurde aus Ferry, B., Gervasoni, D., Vogt, C. (2014), *Preparation of the Stereotaxic Surgical Procedure*, In: *Stereotaxic Neurosurgery in Laboratory Rodent*. Springer, Paris. [https://doi.org/10.1007/978-2-8178-0472-9\\_5](https://doi.org/10.1007/978-2-8178-0472-9_5) übernommen. Auf der linken Seite ist eine Abbildung des Mausschädels zu erkennen, in welchen die Schädelnähte eingezeichnet sind. Rechts findet sich eine Aufnahme des tatsächlichen Maus-Schädels. Rostral liegt Bregma, das über eine von rostral nach okzipital laufende Schädelnaht mit Lambda verbunden ist. Entscheidend war es, den Nullpunkt über Bregma zu definieren, um von dort die vorgegebenen Koordinaten zu erreichen.

Die stereotaktischen Injektionen dienen der ICV-Injektion der Antisense-Oligonukleotide anhand vorgegebener Koordinaten.

Zuerst wurde die Maus gewichtsadaptiert mittels intraperitoneal verabreichter 3K Narkose narkotisiert. Sobald die Maus sichtbar bewusstlos war, wurde subkutan 2 mg/ kg als 0,1 mL/ 10 g Körpergewicht an Metacam zur systemischen Analgesie gespritzt. Nach

Rasur des Fells über dem Schädel wurde die Haut mittels 100% Ethanol desinfiziert und anschließend 5 mg/ kg 2% Lidocain zur Lokalanästhesie unter die Haut injiziert. Nach Verreiben des Lokalanästhetikums mittels Tupfer und Ethanol wurde die Narkosetiefe anhand der Reaktion auf den Zwischenzehenreflex geprüft. Sobald dieser Reflex erloschen war, wurde mit dem Skalpell die Haut über dem Schädel in Längsrichtung eröffnet. Ethanol diente dabei als Desinfektionsmittel. Orientierend sollten Bregma und Lambda sichtbar werden, die Landmarken für die stereotaktische Injektion. Dabei handelt es sich um Punkte, an denen sich jeweils zwei Schädelnähte der Maus treffen. Eine Darstellung dieser findet sich in Abbildung 2.2. Die entstandene Wunde wurde während der gesamten Injektion mit PBS feucht gehalten. Anschließend wurde die Maus in die stereotaktische Apparatur eingebracht. Diese Apparatur ist in Abbildung 2.3 zu erkennen. In die Hamilton-Spritze wurden 3  $\mu\text{L}$  der jeweiligen ASO aufgezoogen (10, 30 oder 100  $\mu\text{g}$ ). Aufgrund der bilateralen Injektion ergaben sich 1,5  $\mu\text{L}$  injiziertes Volumen je Ventrikelseite. Mithilfe der stereotaktischen Apparatur wurde der Nullpunkt über Bregma definiert. Von dort wurden die Injektionsstellen aufgesucht, indem die Koordinaten medial-lateral  $\pm 2,6$  mm und anterior-posterior 0,9 mm aufgesucht wurden. An dieser Stelle wurde ein Loch in den Schädel gebohrt und dorsal-ventral = 0 auf das Knochenniveau eingestellt. Anschließend wurde die Koordinate dorsal-ventral -2,3 mm in langsamen Schritten erreicht, um möglichst gewebeschonend zu arbeiten. Die Injektion erfolgte je Seite mit einer ungefähren Geschwindigkeit von 0,1-0,5  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Nach der Injektion wurde die Spritze für 5 Minuten in der injizierten Position gelassen, damit das vollständige Volumen in den Ventrikel diffundieren konnte. Anschließend wurde die Spritze schrittweise entfernt, um so wenige Strukturen wie möglich zu verletzen. Mit der zweiten Seite wurde ebenso verfahren. Nach der bilateralen Applikation wurde die Maus aus der stereotaktischen Apparatur ausgespannt. Nun erfolgte das Vernähen der Inzision durch 3 Einzelknopfnähte mit Polyamidfäden. Um die Maus aus der Narkose erwachen zu lassen, wurde ein Antagonist der 3K Narkose gewichtsadaptiert, subkutan appliziert und die Maus zum Aufwachen zurück in ihren Heimatkäfig unter Rotlicht gelegt. Postoperativ bis zum Aufwachen und in der Zeit danach erfolgte eine regelmäßige Kontrolle der Tiere sowie die Versorgung mit Nassfutter. Die Versuchstiere befanden sich während der gesamten Operationsvorbereitung, der Operation selbst sowie dem anschließenden Nähen auf einem Wärmekissen, um die Körpertemperatur zu erhalten.

Für die zweite Studie mit den allel-spezifischen ASOs wurden die Konzentrationen auf 150 µg in der Toxizitätsstudie bzw. 30 und 60 µg im tatsächlichen Versuch verändert. Ebenfalls wurde die medial-laterale Koordinate auf  $\pm 0,26$  mm verschoben.

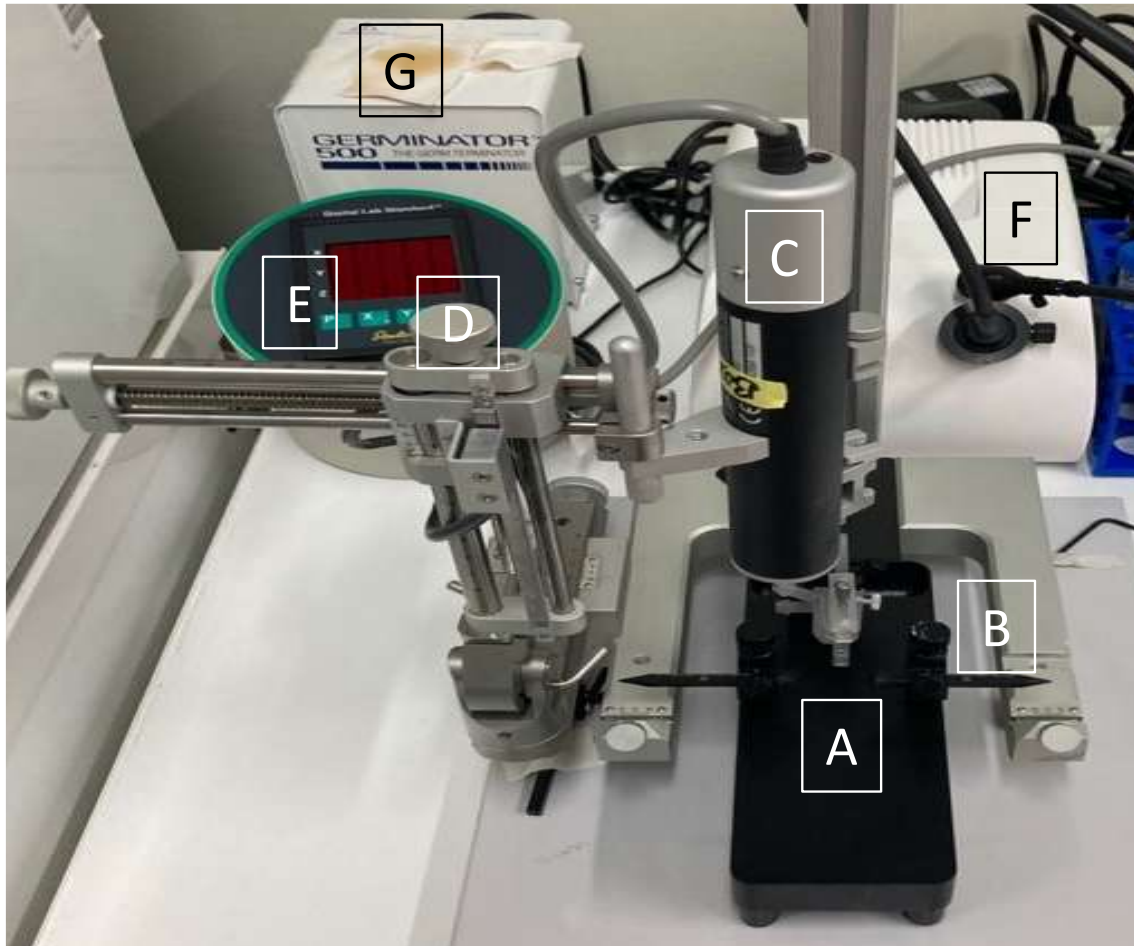


Abbildung 2.3 Stereotaktische Apparatur

**A** Im schwarzen Bereich wurde die Maus auf ein Wärmekissen gebettet **B** Mit den schwarzen Stäben rechts und links wurde sie am kraniocervikalen Übergang fixiert **C** Halterung, in die die Hamiltonspritze geklemmt wurde **D** Halteapparat des gesamten Aufbaus, welcher mit einem Drehrädchen versehen ist, um die genaue Position der Spritze einzustellen **E** Anzeige der eingestellten Koordinaten **F** Lampe zur Beleuchtung **G** Trocken-Sterilisations-Gerät.

### 2.2.1.6 Nachsorge

Angeschlossen an die Operationen erfolgte eine Nachsorge für drei Tage. Dabei wurde anhand eines *Scoresheets* vorgegangen (*Scoresheet* I & II, siehe Anhang Tabelle A und B). Weiterhin wurde das *Scoresheet* auch am 7. Tag postoperativ erhoben. Das Vorgehen beinhaltete einerseits eine Gewichtsmessung, da zu erwarten war, dass die Mäuse mit

einer Gewichtsabnahme auf die Operation reagieren würden, im Verlauf aber wieder zunehmen würden. Außerdem wurde die Sauberkeit von Fell und Körperöffnungen beurteilt, um zu überprüfen, ob eine verminderte oder übermäßige Körperpflege vorlag, was jeweils durch Stress bedingt sein könnte. Ebenso wurde das Sozialverhalten beurteilt, also ob die Maus neugierig und aktiv war oder apathisch oder aggressiv, was beides auch Stress anzeigen könnte. Abschließend erfolgte die Inspektion der Wunde und der Naht. Im Optimalfall waren weder eine Rötung noch Sekrete zu erkennen und die Naht blieb intakt. Der so erhobene *Score* wurde dokumentiert. Wurde ein *Score* von 20 in Studie 1 bzw. 10 in Studie 2 oder höher dokumentiert, bedeutete dies den humanen Endpunkt und die Maus wurde euthanasiert.



Abbildung 2.4 Maus beim Wirehang-Test

*In der Abbildung erkennt man eine der Versuchsmäuse, die postoperativ den Wirehang-Test absolviert. Dabei musste sie für bis zu 5 Minuten kopfüber an einem Gitter hangeln, welches über einem Käfig platziert wurde. Man erkennt gut, wie sich die Maus mit den Pfoten an den Stäben festhält und zusätzlich mit ihrem Schwanz stabilisierenden Kontakt zum Gitter herstellt. Eine Pfote hängt leicht frei in der Luft, da sich die Maus zu dem Zeitpunkt in Bewegung befand, was dem natürlichen Verhalten der Tiere entspricht, die sehr agil klettern und hangeln können.*

Zusätzlich zum *Scoresheet* sollte jede Maus den *Wirehang*-Test absolvieren. Dabei wurde die Maus auf ein Gitter gesetzt und langsam umgedreht, sodass sie sich kopfüber befand. Damit die Maus bei einem Absturz weich fallen würde, wurde das Gitter in ca. 20 cm Entfernung über einen mit Einstreu gepolsterten Käfig gehalten. Es wurde die Zeit gemessen, die sie in dieser Position aushielt. Die maximale Testzeit betrug 5 Minuten.

Der Test sollte neurologisch auffällige Mäuse mit Koordinationsproblemen anzeigen, wie sie nach einer Operation am Gehirn zu erwarten sein könnten. Jedoch ist die Aussagekraft des Tests fraglich, da sich viele Mäuse aus mangelnder Motivation fallen ließen oder beim Klettern am Gitter den Halt verloren.



*Abbildung 2.5 Schmerzmittelgabe in der postoperativen Nachsorge*

*In der Abbildung erkennt man eine der Versuchsmäuse, der das orale Metacam in der postoperativen Nachsorge verabreicht wurde. Da die Mäuse sehr agile und flinke Tiere sind, mussten sie im Nackengriff gehalten werden, während ihr Schwanz mit dem kleinen Finger festgehalten wurde, damit die Maus kurzfristig stillhielt. Dieser Griff entspricht der Art, in welcher Muttertiere ihre Jungen tragen, wodurch sich die Mäuse durch einen angeborenen Reflex still verhalten. Das Schmerzmittel konnte der Maus über die Pipettenspitze gegeben werden, was diese freiwillig aufnahm.*

Um postoperative Schmerzen zu unterbinden, erhielten die Tiere für drei Tage 2 mg pro kg Körpergewicht Mecaptam oral. Es wurden zwischen 20 und 30  $\mu$ L je nach Körpergewicht verabreicht. Dazu wurde die Maus durch einen Nackengriff fixiert und die Metacam-Lösung der Maus mittels Pipette dargeboten. Unter normalen Voraussetzungen tranken die Mäuse die Metacam-Lösung freiwillig von der Pipettenspitze.

### 2.2.1.7 Ablauf des *Beam-Walk*

In Studie 2 zu den allel-spezifischen ASOs wurde eine Ganganalyse prä- und postoperativ integriert, um mögliche Auswirkungen der Injektionen festzustellen. Dafür wurde der

sogenannte *Beam-Walk* genutzt (Lang et al., 2020). Der Stab, über welchen die Maus laufen sollte, wurde an zwei Halterungen befestigt. Auf der Seite, zu der die Maus laufen sollte, befand sich ein Häuschen, welches dem Tier als Schutzort diente und sie so motivieren sollte, dort hinzulaufen (Abbildung 2.6). Die Maus wurde in einem definierten Abstand gefilmt, während sie sich frei in Richtung Häuschen bewegte. Entscheidend war, dass der Gang flüssig und ohne Unterbrechungen erfolgte, also mindestens 5-7 Schritte nacheinander stattfanden. Das entstandene Video wurde mithilfe von *iMovie* in der Version 10.3.3 in Einzelclips, die die jeweiligen durchgängigen Laufstrecken zeigen, geschnitten. Diese Clips konnten durch die Analysesoftware *DeepLabCut* untersucht werden (Lang et al., 2020). Diese erkannte die einzelnen Pfoten und konnte so das genaue Gangmuster, ein eventuelles Abrutschen der Maus oder ein Schleifen des hinteren Körperanteils zeigen. Ebenso wurde die ausbalancierende Funktion des Schwanzes analysiert. Dadurch ergab sich die sogenannte *Rhythmicity of Gait* (ROG), welche die genannten Kriterien als Zahlenwert ausdrückte und so quantifizieren und objektivieren sollte.



Abbildung 2.6 *Beam-Walk-Apparatur*

In der Abbildung erkennt man den Holzstab, über welchen die Maus läuft, sowie das Häuschen auf der rechten Seite, das als Ziel für die Maus dienen sollte. Die Kamera zeichnete den gezeigten Ausschnitt auf, wodurch die Maus nach der Aufnahme durch die KI bei ihrer Überquerung aufgezeichnet und ihr Gangbild analysiert werden konnte.

### 2.2.1.8 Gewinnung Blutserum

In Studie I zu den allel-unspezifischen ASOs sollten 4 Wochen nach den Injektionen und in Studie II zu den allel-spezifischen ASOs 4 Wochen vor und zwei Wochen nach der OP

Blutserumproben der Tiere gewonnen werden, um Biomarker zu bestimmen, die aktuell im Kontext der SCA3 und neurodegenerativer Erkrankungen untersucht werden.

Zuerst wurde während einer kurzen 5% Isofluran-Narkose Blut aus dem retrobulbären Venenplexus entnommen. Dafür wurde das jeweilige Tier im Nackengriff gehalten, um die Halsvene zu stauen und die Blutentnahme zu erleichtern. Mithilfe einer nicht heparinisierten Kapillare mit 0,8 mm Außendurchmesser konnte das Blut durch leicht kreisende Bewegungen und etwas Druck gewonnen werden. Maximal konnten 100 µL Blut pro Tier gewonnen werden, aufgrund des Körpergewichts zwischen 20-25 g. Bei leichteren Tieren konnte entsprechend weniger Blut gewonnen werden (maximal 10% des Körpergewichtes). Das abgenommene Blut wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen, um es zur Gerinnung zu bringen. Anschließend wurden die Proben für 15 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert, sodass sich die zellulären Bestandteile absetzten und der Überstand, also das Serum, abpipettiert werden konnte. Die Proben wurden dann bei -80 °C eingefroren.

### 2.2.1.9 Maus-Präparationen

4 Wochen nach den stereotaktischen Injektionen wurden die Gewebeproben der Mäuse gewonnen sowie Liquor und Blut entnommen, um diese auf eine Herunterregulation des Erkrankungsproteins (Ataxin-3 RNA und ATXN3-Proteinlevel) oder Anzeichen einer Immunabwehr zu untersuchen.

Die Maus wurde dafür in eine tiefe und längerfristige Narkose mittels Xylazin (8 mg/ kg) und Ketamin (100 mg/ kg) gelegt. Sobald sie nicht mehr auf das Auslösen des Zwischenzehenreflex reagierte, wurde der Nacken überstreckt und die Haut und Muskulatur über der *Cisterna Magna* entfernt, sodass diese mit einer Nadel punktiert werden konnte. Der austretende Liquor cerebrospinalis wurde mit einer Pipettenspitze aufgenommen. Darauffolgend wurde der Thorax mit einer Schere eröffnet, sodass das Herz einer Punktion zugänglich wurde. Aus dem rechten Vorhof wurde das gesamte mögliche Blut mit einer Insulinspritze entnommen, um später erneut das Serum zu gewinnen (siehe Kapitel 2.2.1.8 Gewinnung Blutserum). Anschließend erfolgte die Dekapitation, wodurch Cerebellum, Hirnstamm, Frontaler Cortex sowie die weiteren Cortexanteile und das Rückenmark entnommen werden konnten. Ebenso erfolgte die Präparation der peripheren Organe (Herz, Lunge, Leber, Niere und Milz) sowie ein Teil

eines Skelettmuskels. Dabei wurde auch auf makroskopische Veränderungen der Organe geachtet, die eine aktivierte Immunabwehr im Sinne einer Abwehrreaktion anzeigen könnten. Für Studie 2 wurden nur die Leber und Niere als Haupt-Stoffwechselorgane entnommen, da dort am wahrscheinlichsten periphere Reaktionen auf ASOs zu erwarten wären, hätten diese das Gehirn verlassen.

### 2.2.2 DNA

#### 2.2.2.1 DNA-Isolation aus Gewebe

Zur DNA-Isolation wurden die gewonnen Ohrstanzen aus Kapitel 2.2.1.3 verwendet. Sie erfolgte nach dem *High Pure PCR Template Preparation Kit* in der Version 26 von November 2019.

Zuerst wurden die Ohrstanzen in 200 µL Gewebe-Lysepuffer sowie 40 µL Proteinase K aufgenommen und für mindestens 3 h bei 55 °C inkubiert. Anschließend wurden 200 µL Bindepuffer und 100 µL Isopropanol hinzugefügt und das Ganze für 5 Minuten bei 13.000 g zentrifugiert. Die abzentrifugierte Flüssigkeit wurde in ein *High Pure* Filter Tube pipettiert, das mit einem Sammelgefäß assembliert wurde. Beides wurde für 1 min bei 8000 g zentrifugiert. Daraufhin wurde das Filter Tube in ein neues Sammelgefäß gesetzt und es wurden 500 µL *Inhibitor Removal Buffer* hinzu pipettiert. Es folgte das Zentrifugieren für eine Minute bei 8000 g. Weiterhin wurde das Filter Tube zweimal mit je 500 µL Waschpuffer bei 1 min und 8000 g gewaschen. Nach jedem Vorgang wurde ein neues Sammelgefäß verwendet. Abschließend wurde für 10 Sekunden bei maximaler Beschleunigung zentrifugiert. Daraufhin wurden 200 µL vorgewärmter Elutionspuffer in das Filter Tube pipettiert, das nun mit einem sterilen 1,5 mL Eppendorf Reaktionsgefäß assembliert war und für eine Minute bei 8000 g zentrifugiert wurde, um die DNA von der Säule zu eluieren.

#### 2.2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, kurz PCR) dient der Amplifikation eines gewünschten DNA-Bereichs.

Es werden ein vorwärts und ein rückwärts Primer verwendet, die jeweils auf einem der beiden DNA-Stränge binden und so die gewünschte Sequenz umrahmen. Die Taq-Polymerase kann dadurch nur im ausgewählten Bereich binden und amplifizieren. Die PCR durchläuft mehrere Zyklen, in denen die Doppelstränge zuerst durch Hitze von ca. 95 °C voneinander getrennt werden, die DNA also denaturiert wird. Aufgrund dessen wird eine thermostabile Polymerase verwendet, die durch die Hitze aktiviert und nicht denaturiert wird. Anschließend lagern sich an beide Stränge während einer leichten Temperatursenkung Primer an, welche durch die Taq-Polymerase gebunden werden (Anlagerung). Bei der anschließenden Temperaturerhöhung wird die Taq-Polymerase aktiviert und führt mithilfe der zugegebenen Desoxy-Nukleotide die Elongation entlang der DNA-Stränge vom 5' in Richtung des 3' Ende durch. Das heißt, die DNA wird amplifiziert. Beide Stränge können kontinuierlich verlängert werden. Diese Zyklen werden 35-55 Mal wiederholt, sodass sich die DNA der Zielsequenz exponentiell vermehrt.

### 2.2.2.2.1 PCR zur Genotypisierung von YAC84Q-Mäusen

Um zu überprüfen, ob die WT/YAC84Q-Mäuse tatsächlich das humane *ATXN3*, also das Transgen trugen, wurden Primer verwendet, die im humanen expandierten *ATXN3* binden. Der Reaktionsansatz wurde gemäß Tabelle 2.12 pipettiert und in die PCR-Stripes pipettiert. Anschließend wurde das Programm aus Tabelle 2.13 im Zykler gestartet. Die PCR-Produkte wurden bis zur weiteren Verwendung bei bis zu 5 °C gelagert.

*Tabelle 2.10 Mastermix für die PCR zur Genotypisierung*

| Reagenz                | Volumen in µL |
|------------------------|---------------|
| Ampuwa Wasser          | 13,8          |
| PCR Puffer 10x, Qiagen | 2             |
| Primer F (10 pmol)     | 1             |
| Primer R (10 pmol)     | 1             |
| dNTPs (10 µM)          | 0,5           |
| Taq-Polymerase, Qiagen | 0,2           |
| Isolierte DNA          | 1,5           |
| <b>Total</b>           | <b>20</b>     |

Tabelle 2.11 Programm der PCR zur Genotypisierung

| Schritt                | Temperatur in °C | Dauer in min | Zyklen |
|------------------------|------------------|--------------|--------|
| Initiale Denaturierung | 94               | 3            |        |
| Denaturierung          | 94               | 0,5          | 35     |
| Primeranlagerung       | 55               | 0,5          | 35     |
| Elongation             | 72               | 1            | 35     |
| Finale Elongation      | 72               | 10           |        |
| Lagerung               | 10               | ∞            |        |

## 2.2.2.2.2 PCR zur Fragmentlängenanalyse

Um die CAG-Wiederholungslänge der Mäuse zu bestimmen, wurde eine PCR für das humane expandierte *Ataxin-3* durchgeführt. Der Vorwärts-Primer trug dabei einen Fluoreszenzmarkierung am 5' Ende, um bei der späteren Fragmentlängenanalyse detektiert zu werden.

Die Amplifikation erfolgte unter Verwendung des Mastermixes aus Tabelle 2.14. Nachdem das Reaktionsgemisch in die PCR-Stripes verteilt worden war, konnte das Amplifikationsprogramm aus Tabelle 2.15 gestartet werden. Die Taq-Polymerase wurde beim Pipettieren möglichst lange auf Eis gelagert, um ein frühzeitiges Aktivieren durch Wärme zu verhindern.

Tabelle 2.12 Mastermix für die PCR zur Fragmentlängenanalyse

| Reagenz                | Volumen in µL |
|------------------------|---------------|
| Ampuwa Wasser          | 12,8          |
| Q-Solution, Qiagen     | 4,0           |
| PCR Puffer 10x, Qiagen | 2,5           |
| dNTP Mix (10 mM)       | 0,5           |
| Primer F (10 µmol)     | 1,0           |
| Primer R (10 µmol)     | 1,0           |
| Taq-Polymerase, Qiagen | 0,2           |
| Isolierte DNA          | 3,0           |
| <b>Total</b>           | <b>25</b>     |

*Tabelle 2.13 Programm der PCR zur Fragmentlängenanalyse*

| Schritt                | Temperatur in °C | Dauer in min | Zyklen |
|------------------------|------------------|--------------|--------|
| Initiale Denaturierung | 94               | 5            |        |
| Denaturierung          | 94               | 1            | 30     |
| Primeranlagerung       | 60               | 1            | 30     |
| Elongation             | 72               | 2            | 30     |
| Finale Elongation      | 72               | 10           |        |
| Lagerung               | 10               | ∞            |        |

Nach Durchführen der PCR konnten die Produkte bei 5 °C gelagert werden, bis sie weiterverwendet wurden. Besonders war zu beachten, sie vor Licht zu schützen, da dies zu einem Abschwächen der Fluoreszenz führen konnte, die nun in die PCR-Produkte integriert war.

### 2.2.2.3 Agarosegelelektrophorese

Um das Gelingen einer PCR zu überprüfen, also um sicherzustellen, dass die Ausgangs-DNA amplifiziert wurde, kam eine Gelelektrophorese zum Einsatz. Ebenso konnte durch das Auftrennen im Gel die Produktlänge abgeschätzt werden.

Für ein einprozentiges Gel wurden 0,6 g Agarose in 60 mL 1x Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) gegeben und erhitzt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Außerdem wurden 3 µL Ethidiumbromid hinzugegeben, welches mit den Doppelsträngen der DNA interkalierte und dabei durch UV Licht sichtbar gemacht werden konnte. Diese Gel-Mischung wurde auf einen Gelträger aufgetragen und zwei Kämme wurden eingebracht, um taschenförmige Hohlräume entstehen zu lassen. Nach dem Erkalten des Gels konnten die Kämme entfernt werden. Das Gel wurde in der Laufkammer platziert, welche mit TBE-Puffer gefüllt war. Nach Entfernen der Kämme wurde darauf geachtet, dass die Taschen und das gesamte Gel von Puffer bedeckt war. Vorbereitend wurden je 5 µL des PCR-Produktes mit 5 µL 6x Orange G Ladepuffer versehen. Dieses Gemisch aus Proben und Orange G wurde jeweils in die Taschen des Gels pipettiert. Anschließend

wurde die Laufkammer an die Spannungsquelle angeschlossen. Die Auftrennung erfolgte bei 100 mV für 15-20 Minuten.

Aufgrund der negativen Ladung von DNA und den daraus resultierten PCR-Produkten wanderten diese im Gel zum Pluspol (in Richtung Anode) und wurden dabei nach ihrer Größe aufgetrennt. Je geringer die Prozentigkeit eines Gels ist, desto größer sind die Poren, die im Gel entstehen. Je kleiner dann ein PCR-Produkt ist, desto schneller kommt es im Gel vorwärts, da es seltener an Porenrändern hängen bleibt. Je höher man die Prozentigkeit des Gels wählt, desto kleinere Poren entstehen. Dementsprechend brauchen die PCR-Produkte länger, um es zu passieren, was zu einer genaueren Größenauftrennung führt. Da Ethidiumbromid positiv geladen ist und somit entgegengesetzt im Gel wandert und in die große Furche der DNA interkaliert, konnten die PCR-Produkte als Banden im Gel mittels UV-Licht detektiert werden. War keine Bande zu sehen, so konnte das humane *ATXN3* nicht nachgewiesen werden. Die Stärke der Banden hatte auch eine Aussagekraft über die Konzentration der PCR-Produkte. Je stärker eine Bande war, desto mehr amplifizierte DNA wurde nachgewiesen. In die erste Geltasche wurde außerdem der *Gene Ruler Mix* mit 10–10.000 Basenpaaren und 21 Banden als *Size Standard* pipettiert, um die Größe der aufgetrennten PCR-Produkte vergleichend abschätzen zu können. Außerdem wurden jeweils eine Negativkontrolle sowie eine Positivkontrolle aufgetragen, um Verunreinigungen auszuschließen bzw. das grundsätzliche Funktionieren der PCR zu kontrollieren.

### 2.2.2.4 Fragmentlängenanalyse

Bei der Fragmentlängenanalyse werden PCR-Produkte in einem Gel nach ihrer Größe aufgetrennt. Durch Einsatz eines fluoreszenzmarkierten Primers tragen alle PCR-Produkte eine Fluoreszenzmarkierung und können damit sichtbar gemacht werden.

In dieser Studie sollte die genaue Länge des PCR-Produkts bzw. der enthaltenen CAG-Wiederholungen bestimmt werden. Dazu wurde der *Genome Lab Size Standard 600* verwendet, der als Referenz diente und dem Programm bekannt war. Dieser ist mit einer andersfarbenen fluoreszierenden Fluoreszenzmarkierung versehen, um diesen von den zu analysierenden Proben zu unterscheiden.

In eine 96-Well Platte wurden 4,5 µL *Sample Loading Solution*, 0,5 µL *Size Standard 600* sowie 5 µL PCR-Produkt je *Well* pipettiert und mit je einem Tropfen Mineralöl als Verdampfungsschutz versehen. Die PCR-Produkte wurden umso stärker verdünnt, je stärker sie sich als Bande in der vorherigen Gelelektrophorese darstellten. Es wurden Verdünnungen von 1:10, 1:20, 1:50 bzw. 1:100 verwendet. In einer zweiten 96-Well Mikroplatte wurden die der ersten Platte entsprechenden *Wells* mit *Separation Buffer* gefüllt. Anschließend wurden die Platten in den *Beckmann CEQ 8000* eingebracht und das Programm Frag3 ausgewählt (Tabelle 2.16).

*Tabelle 2.14 Ablauf des Programmes Frag 3 zur Fragmentlängenanalyse*

| Schritt       | Temperatur/ Spannung | Dauer  |
|---------------|----------------------|--------|
| Kapillare     | 50 °C                |        |
| Denaturierung | 90 °C                | 120 s  |
| Injektion     | 2.0 kV               | 30 s   |
| Separierung   | 6.0 kV               | 35 min |

Nach Ablauf des Programms erfolgte die Auswertung anhand des SCA3-Diagnostikprogramms. Dies ist ein Labor internes Diagnostikprogramm zur Bestimmung der Anzahl der CAG-Wiederholungen. Die Gesamtlänge, angegeben in Basenpaaren, konnte durch den Vergleich mit dem bekannten Size Standard ermittelt werden.

Anhand der verwendeten Primer kann man sagen, dass vor und nach der verlängerten CAG-Sequenz zusammen 159 Basen im PCR-Produkt inklusive der Primersequenzen vorkommen, die aber nicht Teil der Poly-CAG-Sequenz sind. Das PCR-Produkt ist also um diese 159 Basenpaare länger als die enthaltenen Wiederholungen. Jede CAG-Sequenz wird aus den drei Basen Cytosin (C), Adenin (A) und Guanin (G) aufgebaut, die jeweils ein Glutamin codieren, sodass die Basenanzahl der CAG-Sequenz durch drei geteilt werden muss, um die Anzahl an CAG-Wiederholungen zu ermitteln. Man nimmt also die Anzahl an Basen am Gipfel, an welchem sich die PCR-Produkte im Gel gesammelt haben, zieht 159 Basen ab und teilt das Ergebnis durch drei.

PolyQ Wdh 1.7.H08\_21111615F1

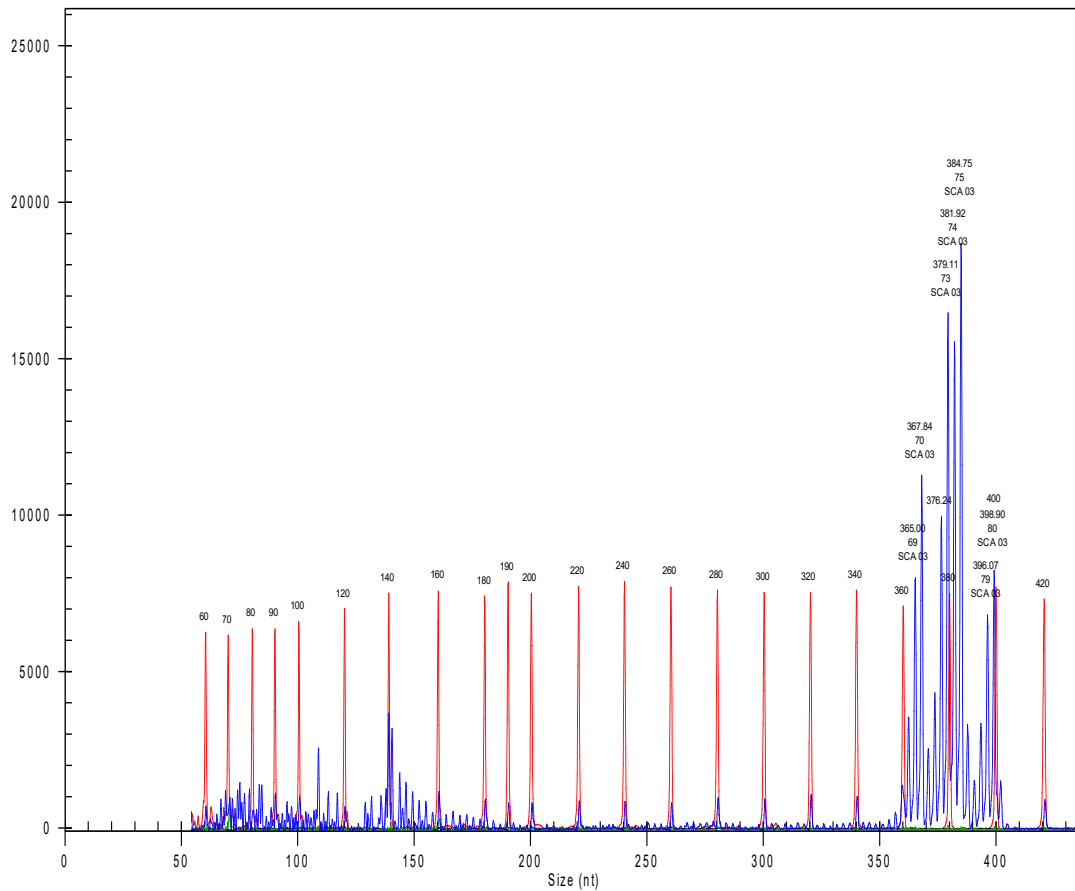


Abbildung 2.7 Beispielhaftes Ergebnis einer Fragmentlängenanalyse

Man erkennt in Blau die Auftrennung der PCR-Produkte. In Rot wird der Size Standard angezeigt. Die CAG-Wiederholungen stellen sich im rechten Bereich der Auftrennung dar. Ebenso sieht man die PCR-Produkte des expandierten ATXN3 in verschiedenen Längen, die durch das Slippage-Phänomen der Polymerase entstanden sind und sich als mehrere Gipfel direkt nebeneinander darstellen. Zur Auswertung wird der höchste Gipfel mit 75 sowie die 2 weiteren hohen Gipfel in unmittelbarer Umgebung angegeben, hier 73 und 74. Dies wird als Bereich angegeben, in welchem sich die tatsächliche Wiederholungsanzahl der CAG-Sequenz befindet.

Da CAG-Wiederholungen eine repetitive Sequenz darstellen und lange CAG-Bereiche von einer Polymerase nur schwer amplifiziert werden können, zeigt diese oft das sogenannte *Slippage*-Phänomen. Dabei entstehen je Probe PCR-Produkte mit leicht unterschiedlichen Längen und unterschiedlichen Wiederholungsanzahlen der CAG-Sequenz. Dies ist dadurch bedingt, dass die Polymerase beim Amplifizieren eines Bereichs, der über einen langen Abschnitt eine sehr ähnliche Sequenz aufweist (hier die CAG-Wiederholungen) von der Sequenz abrutschen und wieder neu binden kann, wobei ein oder mehrere Wiederholungen ausgelassen bzw. hinzugefügt werden können. Um also der tatsächlichen Anzahl an CAG-Wiederholungen im analysierten Genabschnitt

möglichst nahezukommen, wird bei der Auswertung der höchste Gipfel ausgewählt sowie die zwei weiteren höchsten/ niedrigsten Gipfel daneben und somit eine Anzahl an CAG-Wiederholungen  $\pm$  zwei Wiederholungen angegeben (siehe dazu Abbildung 2.7).

### 2.2.3 RNA-Analysen

#### 2.2.3.1 RNA-Isolation

Die Isolation der RNA aus den Gewebeproben wurde freundlicherweise von den Mitarbeitenden des NCCT des Instituts für Genetik und angewandte Genomik mittels eines robotergesteuerten Systems durchgeführt und mir für die weiteren Analysen zur Verfügung gestellt. Es wurde der *Qia Symphony* verwendet. Danach erfolgte eine photometrische Qualitätsanalyse mittels Tecan (*Infinite Plate Reader 200*), woraus sich die Konzentrationsangabe in ng/  $\mu$ L ermitteln ließ. Weiterhin wurden die Proben mittels Kapillarelektrophorese vermessen, was eine noch genauere Konzentration sowie die RNA *Integrity Number* (RIN) ergab (Programm *Agilent PROsize*). Dieser Wert gibt die Integrität der RNA an, also wie gut sie erhalten wurde, indem ihre Degradation vermieden wurde. Dabei konnten sich Werte zwischen 1-10 ergeben, wobei 10 bedeutete, dass gar keine Degradation vorlag. Somit waren Werte von 7-8 gut und von 9-10 optimal. Die hier analysierten Proben wiesen eine RIN von 8,1 bis 9,1 aus, einige wenige hatten auch nur eine RIN von 7.

#### 2.2.3.2 Reverse Transkription für die *Two-Step* Teststrategie

Um RNA mittels quantitativer PCR (qRT-PCR) analysieren zu können, musste sie zuerst in cDNA umgeschrieben werden. Dafür wurde ein Primer verwendet, der an den Poly-A-Schwanz der RNA bindet. Die Reverse Transkriptase setzte am Primer an und führte mit den eingesetzten Desoxy-Nukleotiden die Elongation durch. Da RNA als Einzelstrang vorliegt, ist sie deutlich instabiler als DNA. Deshalb musste besonders sauber gearbeitet werden und die Arbeitsfläche mit RNase ZAP gesäubert werden, um Verunreinigungen mit DNAsen oder RNAsen zu vermeiden. Außerdem wurden die RNA-Proben, die Enzyme sowie der Mastermix auf Eis gestellt, um ein Zerfallen der RNA oder eine vorzeitige Aktivierung der Enzyme zu verhindern.

Zuerst wurden die verwendeten RNA-Proben von eventuell vorhandener genomischer DNA bereinigt. Dazu wurden 2 µL *Wipe Out Buffer* zu 6 µL der RNA-Probe sowie 6 µL RNase freiem Wasser pipettiert. Alles zusammen wurde für 2 min bei 42 °C inkubiert und anschließend umgehend auf Eis gelagert.

Von dieser RNA-Lösung wurden je 14 µL zum Mastermix aus Tabelle 2.17 pipettiert. Daraufhin wurden die Reaktionsmischungen bei 42 °C für 15 min inkubiert. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase bei 95 °C für 3 min deaktiviert. Zur Reinheitskontrolle wurden alle Reagenzien außer der reversen Transkriptase zusammen pipettiert. In dieser Probe sollte sich daraufhin keine cDNA mehr befinden, sodass in der darauffolgenden PCR keine Amplifikation zu erwarten war. Diese Probe wird im folgenden RT-Kontrolle genannt.

*Tabelle 2.15 Mastermix zur Reversen Transkription*

| Reagenz                           | Volumen in µL |
|-----------------------------------|---------------|
| RT-Puffer                         | 4             |
| Primer Mix                        | 1             |
| Reverse Transkriptase             | 1             |
| RNA-Lösung aus vorherigem Schritt | 14            |
| <b>Total</b>                      | 20            |

Die entstandene cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei bis zu 5 °C gelagert oder für längere Zeit bei -20 °C eingefroren.

### 2.2.3.3 Quantitative *Real-Time*-PCR mittels *Two-Step* Verfahren

Das Prinzip der quantitativen PCR (qPCR) beruht darauf, dass die amplifizierten PCR-Produkte durch eine Fluoreszenzmarkierung quantitativ bestimmt werden können. Dabei wird die Stärke der Fluoreszenz simultan zur Amplifikation detektiert. So kann erkannt werden, nach wie vielen Zyklen die Anzahl der PCR Produkte beginnt exponentiell zu wachsen. Je früher der Zyklus ist, ab dem ein spezifisches Fluoreszenzsignal über dem Hintergrundsignal detektiert werden kann, desto höher ist im Rückschluss die Ausgangskonzentration der Probe. Teilweise zeigt sich im Verlauf der PCR ein nicht-

exponentielles Wachstum des Fluoreszenzsignals, welches durch die Anzahl der eingesetzten Primer und Nukleotide determiniert ist.

Um das gemessene Signal einordnen zu können, wurde eine Standardreihe eingesetzt, die aus drei zufällig ausgewählten Proben pipettiert wurde. In der vorliegenden Arbeit wurden die Verdünnungen 1:10, 1:50, 1:250 und 1:1250 mit cDNA-Mengen von 10, 2, 0,4 und 0,08 ng eingesetzt. Es ist wichtig, dass die zu messenden Proben innerhalb des Standards liegen. Das bedeutet, dass die Proben nicht vor dem ersten Standard bzw. nach dem letzten Standard positiv werden dürfen. Nur so können die Proben aussagekräftig quantifiziert werden. Dies konnte über eine pipettierte cDNA-Menge von 1 ng pro Probe sichergestellt werden. Um die Sauberkeit und Genauigkeit des Pipettierens einzuschätzen, wurde eine Negativkontrolle eingesetzt, in welcher sich anstatt der Probe nur RNase freies Wasser befand. Außerdem wurden der Standard und die Proben als Duplikate in die Reaktion eingesetzt, um zu sehen, ob beide - wie erwartet - gleichzeitig anfangen, ein Signal aufzuweisen, um damit die Pipettiergenauigkeit aufzuzeigen.

Bei der Analyse der Signale wurde die Standardkurve aus der Standardreihe berechnet. Das Analyseprogramm der *LightCycler 480 II* Software zeigte die Effizienz der PCR-Amplifikation sowie den Fehler beim Pipettieren der Standardreihe an. Ebenso war darauf zu achten, dass die Cp-Werte (die den Zyklus anzeigen, ab dem ein spezifisches Fluoreszenzsignal detektiert wurde) zwischen den Duplikaten möglichst identisch waren und untereinander einen regelmäßigen Abstand aufwiesen, da jede Verdünnung der Standardreihe jeweils 1:5 geringer konzentriert war (1:10, 1:50, 1:250 und 1:1250).

Nach der Amplifikation wurde ein Schmelzprogramm an das PCR-Programm angeschlossen, bei dem die entstandenen PCR-Produkte durch Hitze wieder aufgeschmolzen wurden. Dabei verloren sie ihr Fluoreszenzsignal wieder. Durch das nun abnehmende Signal konnte ein Schmelzpunkt bestimmt werden, der für jedes PCR-Fragment individuell durch dessen Länge und Verhältnis zwischen A/ T bzw. G/ C Basenpaarungen bestimmt wurde. Damit konnte die Reinheit der PCR-Produkte beurteilt werden, die möglichst hoch sein sollte, um zu zeigen, dass sich keine *Off-Targets* durch die Primer oder andere Verunreinigungen ergeben hatten. Sollte eine Negativkontrolle oder eine Probe, bei der keine Amplifikation erwartet wurde, doch ein positives Fluoreszenzsignal aufweisen, konnte durch das Schmelzprogramm unterschieden

werden, ob dies durch das amplifizierte PCR-Produkt oder eventuell durch eine Verunreinigung und damit durch ein unabhängiges PCR-Produkt bedingt war.

Für die qPCR wurde der Mastermix aus Tabelle 2.18 pipettiert und mit den Proben auf eine 384-Well Platte aufgetragen. Nach Programmieren des Programmes aus Tabelle 2.19 konnte die Platte in den *LightCycler 480 II* eingebracht werden und das Programm gestartet werden.

*Tabelle 2.16 Mastermix zur quantitativen PCR*

| Reagenz                     | Volumen in $\mu\text{L}$ |
|-----------------------------|--------------------------|
| SYBR Green Lösung           | 5                        |
| Primermix                   | 1                        |
| Ampuwa Wasser               | 2                        |
| cDNA (1 ng/ $\mu\text{L}$ ) | 2                        |
| <b>Total</b>                | 10                       |

*Tabelle 2.17 Programm zur quantitativen PCR mit Schmelzprogramm*

| Schritt                | Temperatur in $^{\circ}\text{C}$ | Dauer in s | Zyklen                                   |
|------------------------|----------------------------------|------------|------------------------------------------|
| Initiale Denaturierung | 95                               | 900        |                                          |
| Denaturierung          | 94                               | 15         | 55                                       |
| Primeranlagerung       | 55                               | 30         | 55                                       |
| Elongation             | 72                               | 30         | 55                                       |
| Schritt                | Temperatur in $^{\circ}\text{C}$ | Dauer in s | Ramp Rate in $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ |
| Schmelzen              | 95                               | 10         | 0,04                                     |
|                        | 60                               | 15         |                                          |
|                        | 60-90                            |            |                                          |
| Abkühlen               | 40                               | 10         |                                          |

Anschließend erfolgte die Analyse mittels der *LightCycler 480 II* Software von Roche.

#### 2.2.3.4 *One-Step Kits*

Da für diese Dissertation sehr viele quantitative RNA-Analysen durchgeführt werden sollten, wurde überprüft, ob mithilfe der *One-Step Kits* verschiedener Hersteller vergleichbare Ergebnisse zum verwendeten *Two-Step* Verfahren (wie in Kapitel 2.2.3.3 beschrieben) erzielt werden konnten. Der Vorteil dabei ist, dass die Reverse Transkription und qPCR in einem Reaktionsgemisch anstatt in zwei getrennten Verfahren hintereinander ablaufen. Dies bedeutet eine Zeit- und Aufwandseinsparung, die bei der vorliegenden Anzahl an Proben sehr wertvoll wäre. Außerdem wurde zwischen verschiedenen Herstellern verglichen, welches davon die meisten Vorteile und wenigsten Nachteile mit sich brachte.

##### 2.2.3.4.1 *One-Step Kit von Luna Universal*

Einerseits wurde das Luna Universal *One-Step* RT-qPCR Kit des *New England BioLabs* getestet. Für die Reverse Transkription und die qPCR in einem Schritt wurde der Mastermix aus Tabelle 2.20 pipettiert und mit den Proben auf eine 384-Well Platte aufgetragen. Es wurde eine Standardreihe mit den Verdünnungen 1:10, 1:50, 1:250 und 1:1250 mit RNA-Mengen von 10, 2, 0,4 und 0,08 ng pipettiert. Je zu analysierende Probe wurde 1 ng RNA eingesetzt. Die Platte wurde in den *LightCycler 480 II* eingebracht und das Programm aus Tabelle 2.21 gestartet. Als Negativkontrollen wurde Wasser bzw. eine Reaktion ohne Reverse Transkriptase eingesetzt, um die Verunreinigung mit genomischer DNA auszuschließen.

Tabelle 2.18 Mastermix zur Luna Universal RT-qPCR

| Reagenz                              | Volumen in $\mu\text{L}$ |
|--------------------------------------|--------------------------|
| Luna Universal One Step Reaction Mix | 5                        |
| Luna Warm Start Rt Enzyme Mix        | 0,5                      |
| Primer Mix (10 $\mu\text{M}$ )       | 0,8                      |
| RNAse freies Wasser                  | 3,2                      |
| RNA (1 ng/ $\mu\text{L}$ )           | 1                        |
| <b>Total</b>                         | 10                       |

Tabelle 2.19 Programm zur Luna Universal RT-qPCR mit Schmelzprogramm

| Schritt                                        | Temperatur in °C   | Dauer in s | Zyklen             |
|------------------------------------------------|--------------------|------------|--------------------|
| Reverse Transkription                          | 55                 | 600        |                    |
| Initiale Denaturierung                         | 95                 | 60         |                    |
| Denaturierung                                  | 95                 | 10         | 45                 |
| Kombinierte Primeranlagerung und Amplifikation | 60                 | 60         | 45                 |
| Schritt                                        | Temperatur in °C   | Dauer in s | Ramp Rate in °C/ s |
| Schmelzen                                      | 95<br>60.<br>60-90 | 10<br>15   | 0,04               |
| Abkühlen                                       | 40                 | 10         |                    |

Anschließend erfolgte die Analyse mittels der *LightCycler 480 II* Software von Roche.

#### 2.2.3.4.2 One-Step Kit von Roche

Vergleichend wurde das *One-Step Kit LightCycler EvoScript RNA SYBR Green I* Master des Herstellers Roche getestet. Für die Reverse Transkription und die qPCR in einem Schritt wurde der Mastermix aus Tabelle 2.22 pipettiert und mit den Proben auf eine 384-Well Platte aufgetragen.

Tabelle 2.20 Mastermix zur RT-qPCR von Roche

| Reagenz                | Volumen in µL |
|------------------------|---------------|
| Mastermix 5x           | 5             |
| Primer Mix (20 µM)     | 4             |
| Nuclease freies Wasser | 0,5           |
| RNA (0,4 ng/ µL)       | 2,5           |
| <b>Total</b>           | 10            |

Es wurde eine Standardreihe mit den Verdünnungen 1:10, 1:50, 1:250 und 1:1250 mit RNA-Mengen von 10, 2, 0,4 und 0,08 ng pipettiert. Je Probe wurde 1 ng RNA eingesetzt. Die Platte wurde in den *LightCycler 480 II* eingebracht und das Programm aus Tabelle

2.23 gestartet. Als Negativkontrollen wurde Wasser bzw. eine Reaktion ohne Reverse Transkriptase eingesetzt, um die Verunreinigung mit genomischer DNA auszuschließen.

Tabelle 2.21 PCR-Programm zur RT-qPCR von Roche mit Schmelzprogramm

| Schritt                                        | Temperatur in °C | Dauer in s | Zyklen             |
|------------------------------------------------|------------------|------------|--------------------|
| Reverse Transkription                          | 60               | 900        |                    |
| Initiation                                     | 95               | 600        |                    |
| Denaturierung                                  | 95               | 10         | 45                 |
| Kombinierte Primeranlagerung und Amplifikation | 58               | 30         | 45                 |
| Schritt                                        | Temperatur in °C | Dauer in s | Ramp Rate in °C/ s |
| Aufschmelzen                                   | 95               | 60         | -0,11              |
|                                                | 25               | 60         |                    |
|                                                | 95               |            |                    |
| Abkühlen                                       | 40               | 30         |                    |

Anschließend erfolgte die Analyse mittels der *LightCycler 480 II* Software von Roche.

#### 2.2.3.4.3 One-Step Kit von Qiagen

Abschließend wurde das *One-Step* Verfahren des QuantiNova *SYBR Green* RT-PCR Kit von Qiagen getestet.

Für die Reverse Transkription und die qPCR in einem Schritt wurde der Mastermix aus Tabelle 2.24 pipettiert und mit den Proben auf eine 384-Well Platte aufgetragen. Es wurde eine Standardreihe mit den Verdünnungen 1:10, 1:50, 1:250 und 1:1250 mit RNA-Mengen von 10, 2, 0,4 und 0,08 ng pipettiert. Je Probe wurde 1 ng RNA eingesetzt. Die Platte wurde in den *LightCycler 480 II* eingebracht und das Programm aus Tabelle 2.25 gestartet. Als Negativkontrollen wurde Wasser eingesetzt bzw. eine Reaktion ohne Reverse Transkriptase eingesetzt, um die Verunreinigung mit genomischer DNA auszuschließen.

Tabelle 2.22 Mastermix zur RT-qPCR von Qiagen

| Reagenz                                      | Volumen in $\mu\text{L}$ |
|----------------------------------------------|--------------------------|
| SYBR Green RT-PCR Mastermix                  | 5                        |
| QN SYR Green RT-Mix                          | 0,1                      |
| Primer Mix 20x, (5 $\mu\text{M}$ ) je Primer | 0,5                      |
| RNAse freies Wasser                          | 3,9                      |
| RNA (2 ng/ $\mu\text{L}$ )                   | 0,5                      |
| <b>Total</b>                                 | 10                       |

Tabelle 2.23 PCR-Programm zur RT-qPCR von Qiagen mit Schmelzprogramm

| Schritt                                        | Temperatur in $^{\circ}\text{C}$ | Dauer in s | Zyklen                                   |
|------------------------------------------------|----------------------------------|------------|------------------------------------------|
| Reverse Transkription                          | 50                               | 600        |                                          |
| Initiation                                     | 95                               | 120        |                                          |
| Denaturierung                                  | 95                               | 5          | 40                                       |
| Kombinierte Primeranlagerung und Amplifikation | 60                               | 10         | 40                                       |
| Schritt                                        | Temperatur in $^{\circ}\text{C}$ | Dauer in s | Ramp Rate in $^{\circ}\text{C}/\text{s}$ |
| Aufschmelzen                                   | 95<br>60<br>60-90                | 10<br>15   | 0,04                                     |
| Abkühlen                                       | 40                               | 10         |                                          |

Anschließend erfolgte die Analyse mittels der *LightCycler 480 II* Software von Roche.

## 2.2.4 Protein

### 2.2.4.1 Proteinisolation

Die Proteinisolation wurde aus den Gewebeproben aus dem Cerebellum, Hirnstamm, Frontalem Cortex und der Leber der Versuchstiere aus Studie 2 zu den allel-spezifischen ASOs durchgeführt. Dafür wurde das bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefrorene Gewebe auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde es mit dem Mörser zermahlen, um die Zellverbände zu lösen und

das Protein zugänglich zu machen. Zu je 10 µg Gewebe wurden 100 µL Ripa-Puffer gegeben, der einen Protease-Inhibitor-Cocktail zur Verhinderung des Abbaus der enthaltenen Proteine enthielt. Das zermahlte Gewebe wurde in die Pufferlösung aufgenommen und mittels Pipette gut vermischt. In den folgenden 30 Minuten wurde das Gewebe-Puffer-Gemisch auf Eis gelagert und alle 10 Minuten gevortext. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Proben für 30 Minuten bei 4 °C und 13 000 rcf zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abpipettiert, wovon 10 µL zur Konzentrationsbestimmung entnommen wurden. Die übrige Probe konnte bei -80 °C aufbewahrt werden, bis die weiteren Analysen erfolgten.

### 2.2.4.2 Protein-Konzentrationsbestimmung

Für die Konzentrationsbestimmung des isolierten Proteins wurde das *Pierce BCA (Bicinchoninic Acid Assay) Protein Assay Kit* von *Thermo Scientific* verwendet. Die Proben wurden 1:10 in Milli-Q Wasser verdünnt, wovon je 10 µL mit 80 µL des Reaktionsgemisches aus dem Kit versehen wurden. Die Standardreihe wurde entsprechend dem Kit Handbuch hergestellt und ebenfalls mit 80 µL des Reaktionsgemisches je Standard versehen. Alle Proben und Standards wurden als Duplikate auf eine 96 *Well* Platte pipettiert. Diese wurde zuerst für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und die Absorption bei 562 nm mithilfe des *Microplate Managers* von *BioRad* gemessen. In einem Diagramm, in welchem die Absorption bei 562 nm auf der y-Achse und die Konzentration in µg/ mL auf der x-Achse abgebildet waren, wurden die gemessenen Werte der Standardreihe eingetragen, was die Standardkurve ergab. Mithilfe von Excel konnte für die entstehende Kurve die Funktionsgleichung mit Achsenabschnitt und Steigung berechnet werden. In das entstandene Schaubild konnten anschließend die Absorptionswerte der zu messenden Proben eingetragen werden und so die zugehörigen Konzentrationen abgelesen werden bzw. mithilfe der Funktionsgleichung genau berechnet werden.

### 2.2.4.3 Western Blot

Der *Western Blot* ist eine Methode zur Protein-Analyse. Dabei werden Proteine in ihre Primär-Struktur überführt und anschließend ihrer Länge nach aufgetrennt. Durch

spezifische Antikörper können Proteine gezielt angefärbt werden, um so ihr Expressionslevel zu bestimmen. Als Vergleichswerte sollten immer Haushaltsproteine analysiert werden sowie verschiedene Positiv- und Negativkontrollen mitbestimmt werden. Der *Western Blot* wird über 3 Tage durchgeführt, dementsprechend werden die Abläufe in chronologischer Reihenfolge dargestellt.

### 2.2.4.3.1 Gelelektrophorese

Am ersten Tag mussten die Gele sowie die Proben vorbereitet werden. Es wurden ein Sammelgel und ein Trenngel benötigt, die gemäß Tabelle 2.26 zubereitet wurden. Zuerst wurde das Sammelgel in die jeweilige Laufkammer gegossen. Nachdem es dort ca. 30 Minuten ausgehärtet war, wurde das Trenngel darauf gegossen und für weitere 30 Minuten zur Polymerisation stehen gelassen. In das Trenngel wurden Kämme eingebracht, die taschenförmige Hohlräume entstehen ließen, in welche später die Proben pipettiert werden konnten.

Tabelle 2.24 Bestandteile des Sammel- und des Trenngels

| Inhaltsstoff              | 4% <i>Sammelgel</i> | 10% <i>Trenngel</i> |
|---------------------------|---------------------|---------------------|
| 3,5x Puffer (mL)          | 0,57                | 1,71                |
| 40% Acrylamid (mL)        | 0,2                 | 1,5                 |
| Wasser (mL)               | 1,21                | 2,73                |
| 10% APS (mL)              | 0,02                | 0,06                |
| TEMED (µL)                | 2                   | 6                   |
| <b>Gesamtvolumen (mL)</b> | <b>4</b>            | <b>12</b>           |

Die Proteinproben mussten auf eine einheitliche Konzentration gebracht werden, um sie vergleichbar quantifizieren zu können. Es wurden 50 µg Protein je Probe auf jedes Proteingel geladen. Diese wurden jeweils mit 5x *Pink Buffer* und Milli-Q Wasser auf ein Gesamtvolumen von 15 µL aufgefüllt. Um die Proteine zu degenerieren, wurden sie für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert, um sie daraufhin wieder auf 4 °C abkühlen zu lassen. Das im *Pink Buffer* enthaltene *Sodium Dodecyl Sulfat* (SDS) konnte dabei an die Primärstruktur binden, um die Proteine in dieser Form zu halten. Die so vorbereiteten Proben sowie ein Marker wurden anschließend in die Taschen im Gel pipettiert, welches

in die Laufkammer eingebracht und mit MOPS/ SDS Laufpuffer aufgefüllt worden war. Es war zu beachten, dass der Puffer immer das gesamte Gel bedeckte. Die Laufzeit betrug 30 Minuten bei 80 V, bis die Proben das Sammelgel durchlaufen hatten und im Trenngel angekommen waren. Dann wurde die Spannung auf 120 V eingestellt. Da das Sammelgel deutlich niederprozentiger ist, kamen auch die größeren Proteine leichter durch die entstandenen Poren und konnten sich zu einer einheitlichen Bande formatieren. Im höherprozentigen Trenngel wurden sie dann deutlich nach ihrer Größe aufgetrennt. Der Lauf wurde beendet, sobald der Marker (*Pierce<sup>TM</sup> Marker Reducing Sample Buffer*) den Unterrand des Gels erreicht hatte.

### 2.2.4.3.2 Immunoblot

Anschließend wurde das Gel in eine Blotkammer eingebracht, welche mit NuPAGE Transferpuffer gefüllt war. Der Aufbau der Blotkammer ist in Abbildung 2.8 dargestellt.

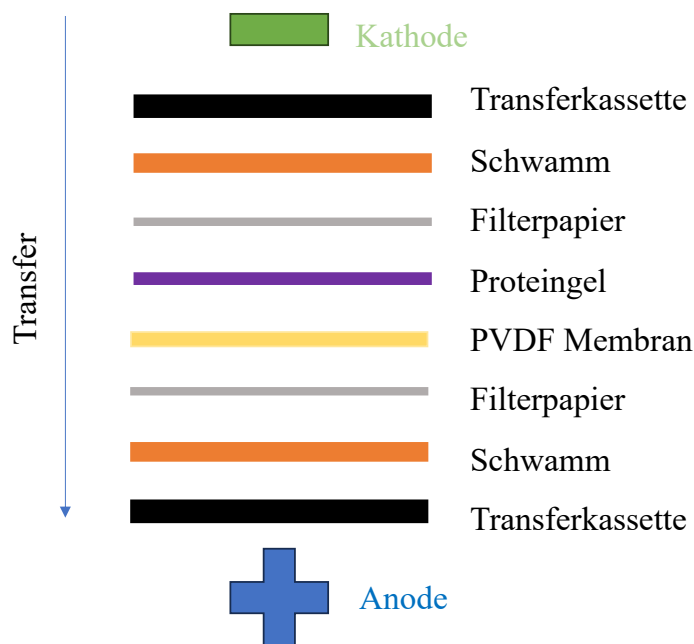


Abbildung 2.8 Aufbau der Blotkammer

*In der Abbildung ist der Aufbau einer Blotkammer dargestellt. Außen befinden sich die Transferkassetten, an welche innen jeweils ein Schwamm sowie ein Filterpapier anliegen. Diese umschließen wiederum das Proteingel, welches auf der Seite der Kathode liegt, sowie daneben die PVDF-Membran, auf welche das Protein übertragen wird und welche anodenwärts liegt. Die Transferrichtung ist mittels eines Pfeils von Kathode zu Anode eingezeichnet.*

Das Proteingel und die Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF), auf welche die Proteine übertragen werden sollten, wurden jeweils von einem innenliegenden Filterpapier, einem darauffolgenden Schwamm und zuletzt der Transferkassette umschlossen. Der Transfer auf die Membran erfolgte mit 20 V von der Kathode in Richtung der Anode bei 4 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurde der Transfer für 1 Stunde bei 100 V vervollständigt. Danach wurde die Membran einmal mit destilliertem Wasser gewaschen, woraufhin der Transfererfolg mittels Ponceau Lösung, die für 10 Minuten auf der Membran inkubiert wurde, überprüft werden konnte. Bei bestätigtem Erfolg wurde die Membran so geschnitten, dass sich die Haushaltsproteine sowie das zu untersuchende Protein auf zwei verschiedenen Teilen der Membran befanden, um sie so mit den verschiedenen Antikörpern anfärben zu können.

Nach dem Schneiden wurden die Membranen drei Mal für 10 Minuten mit TBS-T gewaschen. Daraufhin wurde sie auf dem Rotator für 1 Stunde mit 5% Magermilch in TBS-T bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend konnte die Membran mit dem Primärantikörper (siehe Tabelle 2.8) inkubiert werden. Dafür musste ein ausgewogenes Verhältnis zwischen TBS-T mit 5% *Western Blocking* Reagens sowie 1%  $\text{NaN}_3$  vorliegen. Das Ganze erfolgte bei 4 °C auf dem Rotator über Nacht.

Am nächsten Tag wurde die Membran drei Mal für 10 Minuten mit TBS-T gewaschen, bevor sie auf dem Rotator für 1 Stunde mit dem Sekundärantikörper im Verhältnis 1:5.000 in 1% Magermilch in TBS-T inkubiert werden konnte. Danach wurde die Membran wieder drei Mal für 10 Minuten mit TBS-T sowie einmal mit TBS gewaschen. Anschließend konnte die Detektion stattfinden: Dafür wurden 700  $\mu\text{L}$  des *ECL Western Blotting* auf die Membran gegeben. Dieser wird 1:1 aus zwei Lösungen, die vom Hersteller mit A und B bezeichnet werden, hergestellt. Danach wird die Membran nochmals mit TBS gewaschen und wieder mit dem bereits verwendeten und aufgehobenen *ECL Western Blotting* versehen. Anschließend wurde die Membran in den *BioRad* Detektor eingebracht. Nach stattgefundener Detektion wurde die Membran bei -20°C zur Lagerung eingefroren. Es wurde eine Chemilumineszenz-Detektion mittels *ImageLab* und *ImageJ* durchgeführt.

### 2.2.5 Statistische Analysen

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde *GraphPad Prism* in der Version 9.4.0 genutzt. Vor der Auswertung wurden die Daten mittels Shapiro-Wilk Test auf Normalverteilung geprüft. War die Stichprobengröße gering, wurde außerdem graphisch analysiert, ob eine Normalverteilung der Daten angenommen werden durfte. Ausreißerwerte wurde mittels des *Outlier Calculators* von *GraphPad Prism* bestimmt. Das Signifikanzniveau wurde auf 5% festgelegt.

Für die Auswertung der Gewichtsverläufe der beiden Studien wurde eine *Mixed-Effects Analysis* durchgeführt, welche für *Repeated Measurements* korrigiert wurde. Die Ergebnisse der Studie zu den Allel-unspezifischen ASOs zum postoperativen Gewichtsverlauf - sowohl die absoluten als auch die relativen Veränderungen -, der postoperative *Score* sowie die Werte des *Wirehang*-Tests wurden mittels einer *TwoWay* ANOVA berechnet. Fehlten Daten, wurden eine *Mixed-Effects Analysis* gerechnet. Für die Auswertung der RNA-Expressionen im Cerebellum, Hirnstamm und Frontalen Cortex wurde eine *OneWay* ANOVA durchgeführt.

Im Falle der Studie mit den allel-spezifischen ASOs wurde für den postoperativen Gewichtverlauf, für den postoperativen *Score* sowie den *Wirehang*-Test eine *TwoWay* ANOVA zur statistischen Analyse ausgewählt, die im Falle von fehlenden Werten als *Mixed-Effects Analysis* gerechnet wurde. Die Ergebnisse des *Beam-Walks* zum ersten Zeitpunkt wurden mithilfe eines ungepaarten T-Tests ausgewertet.

Für alle statistischen Analysen wurde ein Signifikanzniveau von 5% festgelegt. Ein p-Wert ab 0,05 wurde mit einem \* markiert, ab  $p < 0,01$  mit \*\*, \*\*\* entsprachen einem p-Wert ab  $<0,001$  und für ein  $p < 0,0001$  wurden \*\*\*\* für ein hochsignifikantes Ergebnis vergeben.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Inhalt des Ergebnisteils

Im folgenden Abschnitt sollen in Teil A die Ergebnisse der Etablierung der quantitativen *Real-Time* PCR dargestellt werden, da diese das Fundament für die Auswertung der folgenden Studien bildete. Anschließend werden in Teil B zuerst die Ergebnisse aus Studie 1 zu den allel-unspezifischen ASOs gezeigt. Daraufhin wird auf die Toxizitätsstudie der allel-spezifischen ASOs eingegangen. Zuletzt werden die Ergebnisse der Studie 2 zu den allel-spezifischen ASOs beschrieben.

#### 3.2 Teil A: Etablierung der qRT-PCR

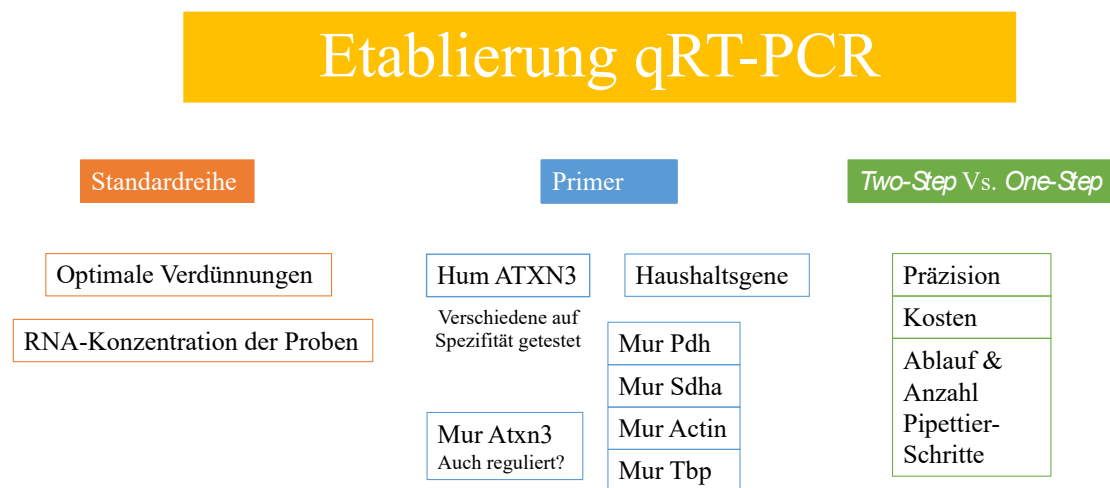


Abbildung 3.1 Ablauf der Etablierung der RNA-Analysen

Zuerst wurden Bedingungen für die Standardreihe sowie die eingesetzte RNA-Menge festgelegt. Daraufhin wurden die Primer für ATXN3 sowie die Haushaltsgene auf ihre Spezifität getestet. Dafür wurde ein in der Abteilung standardmäßig verwendeter Two-Step-Assay zur Validierung genutzt. Zuletzt wurde dieser Assay mit 3 alternativen One-Step Verfahren unter den drei Gesichtspunkten Präzision, Kosten und Handhabung verglichen.

Um in den ASO-basierten Studien eine potenzielle Herunterregulation des humanen Ataxin-3 auf RNA-Ebene festzustellen, mussten vorbereitend die Versuchsbedingungen der qRT-PCR etabliert und optimiert werden. Die dafür notwendigen Schritte sind in Abbildung 3.1 dargestellt und sollen im Folgenden genauer beschrieben werden.

### 3.2.1 Etablierung der Standardreihe

Zuerst sollte die Standardreihe mit zugehöriger Standardkurve und daraus errechneter Effizienz etabliert werden. Daher musste eine Verdünnungsreihe erstellt werden. Für diese wurden je Versuchsgruppe und Hirnbereich drei Proben zufällig ausgewählt und verdünnt. Auch die optimale Konzentration der cDNA-Proben bzw. der RNA-Proben (Probenmaterial je nach Teststrategie siehe Kapitel 3.2.3) musste ermittelt werden.

In Abbildung 3.2 erkennt man eine beispielhafte Standardreihe, die aus einer Verdünnungsreihe von 1:10, 1:50, 1:250 und 1:1250 pipettiert wurde. Dabei enthielt die erste Verdünnung absolut gesehen 10 ng cDNA bzw. RNA. Dementsprechend enthielten die folgenden Verdünnungen 2 ng, 0,4 ng und 0,08 ng der cDNA bzw. RNA.

Auf der x-Achse wird die Anzahl der PCR-Zyklen angezeigt, die bereits absolviert wurden. Auf der y-Achse ist das Fluoreszenzsignal der Proben aufgetragen. Daraus ergibt sich für jede der Verdünnungen eine der rotbraunen Kurven. Die früheren Signale entsprachen den höher konzentrierten Proben mit der meisten cDNA bzw. RNA (1:10 bzw. 10 ng in der Ausgangsprobe). Diese zeigten einen niedrigeren Schwellenwert (Cp-Wert, *Crossing-Point*). Der Cp-Wert ist der Moment, in dem sich das Fluoreszenzsignal zum ersten Mal signifikant vom Hintergrundrauschen abhebt. Je später das Signal aufgetreten ist, also je größer der Cp-Wert war, desto weniger Target-cDNA bzw. RNA war in der Probe enthalten. Die grünen Kurven bzw. geradlinig verlaufenden Signale entstanden durch die Negativkontrollen. Da in diesen anstatt cDNA bzw. RNA nur Wasser enthalten war, konnte keine Amplifikation stattfinden. So entstand auch kein spezifisches Fluoreszenzsignal. Dies diente der Kontrolle, ob etwaige Verunreinigungen beispielsweise mittels DNA vorlagen. Für die *One-Step* Kits wurde zusätzlich eine Negativkontrolle ohne Reverse Transkriptase etabliert, im Folgenden als RT-Kontrolle bezeichnet. In dieser wurde auch keine Amplifikation erwartet, da die RNA nicht in cDNA umgesetzt werden konnte.

Entscheidend für eine gute Standardreihe war, dass der Abstand der Cp-Werte zwischen den Verdünnungen konstant ausfällt, da jeweils 1:5 aus der vorherigen Konzentration verdünnt wurde. Es sollte also  $Cp_{1+x} = Cp_2$  und  $Cp_{2+x} = Cp_3$  gelten. Außerdem sollten die Duplikate je Probe als interne Qualitätskontrolle des Pipettierens möglichst identische Cp-Werte aufweisen.

## Ergebnisse

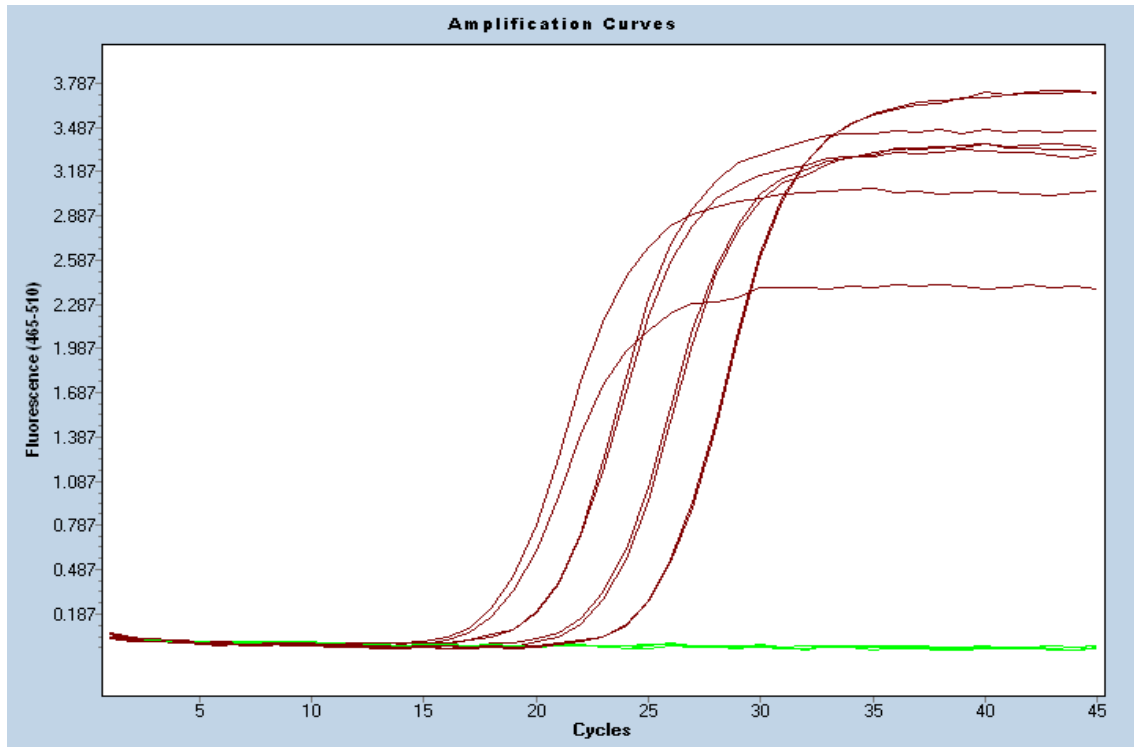


Abbildung 3.2 Standardreihe in der One-Step qRT-PCR

Diese beispielhafte Standardreihe wurde aus Proben aus dem Hirnstamm für das murine Haushaltsgen *Sdh* pipettiert. Es lag eine Verdünnungsreihe von 1:10, 1:50, 1:250 und 1:1250 mit dem absoluten Gehalt von 10 ng RNA in der ersten Verdünnung vor. Auf der x-Achse finden sich die abgelaufenen PCR-Zyklen. Die y-Achse spiegelt das Fluoreszenzsignal wider. Die rotbraunen Linien zeigen die Signale der Standardreihe, die aufgrund der Amplifikation exponentiell zunehmen. Man sieht, dass die Verdünnungen immer einen regelmäßigen Abstand zueinander hatten, also jede weitere Verdünnung ca. 3 Zyklen nach der vorherigen anfang, ein Signal zu zeigen. Dies sprach für eine saubere und präzise Verdünnung. Die aus der Standardreihe berechnete PCR-Effizienz betrug 1,966. Der Moment, ab dem das Fluoreszenzsignal exponentiell anfang zu wachsen und sich vom Hintergrundrauschen abhob, wurde *Cp*-Wert genannt und sollte möglichst identisch zwischen den Duplikaten sein. Auch dies konnte hier erreicht werden, da die Signale der Duplikate fast zeitgleich sichtbar wurden. Die grünen Linien, die mit einem niedrigen Fluoreszenzsignal bei null verlaufen, stellten die Negativkontrolle sowie die RT-Kontrolle dar. Hier ist nur das Hintergrundrauschen sichtbar, also keine Amplifikation eines PCR-Produktes zu erkennen, wie es auch gewünscht war.

Aus den *Cp*-Werten der Standardreihe ließ sich mithilfe der *LightCycler* Software anschließend die Standardkurve und daraus die Effizienz der PCR berechnen. Abbildung 3.3 illustriert die berechnete Standardkurve zur Standardreihe aus Abbildung 3.2. Auf der x-Achse wurde die Konzentration der *Target*-cDNA bzw. RNA in der Probe logarithmisch aufgetragen. Diese kann das Programm berechnen, indem die absoluten cDNA bzw. RNA-Konzentrationen der Verdünnungsproben vorher ins Programm eingetragen wurden. Das Programm zeichnet eine Kurve durch die aufgetragenen Werte. Das logarithmische Auftragen ist entscheidend, um optisch eine Gerade zu erreichen. Aus

dieser kann dann wiederum die Effizienz der PCR bestimmt werden. Das Optimum liegt bei 2,0, wenn man davon ausgeht, dass jedes PCR-Produkt je Zyklus verdoppelt wird. Im Beispiel konnte eine Effizienz von 1,966 erzielt werden. Tolerierbar für die späteren Auswertungen waren PCR-Effizienzen zwischen 1,7 und 2,1.

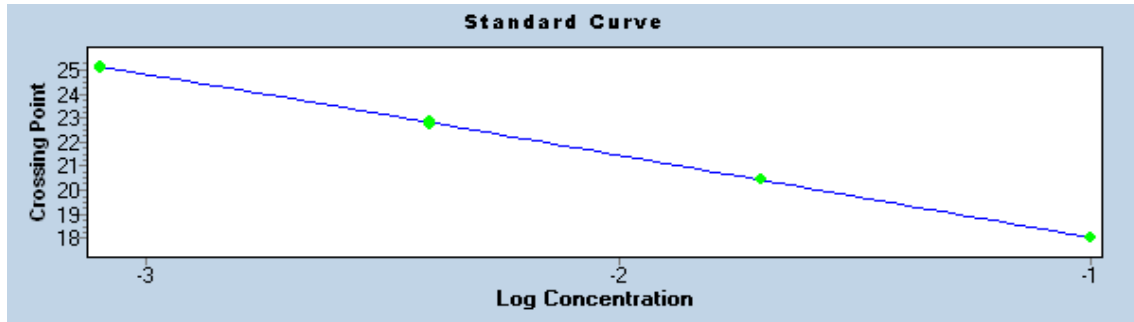


Abbildung 3.3 Standardkurve in der One-Step qRT-PCR

Auf der x-Achse wird die Konzentration der Standardproben in logarithmischer Skalierung aufgetragen. Auf der y-Achse befindet sich der Schwellenwert, kurz Cp-Wert. Es wurden die 4 Cp-Werte der 4 Verdünnungen der Standardreihe eingetragen. Die zur Verdünnung gehörigen Konzentration wurde vorher im Programm eingegeben. So konnte eine Gerade durch die 4 Punkte gelegt werden. Aus dieser konnte das LightCycler Programm die PCR-Effizienz berechnen. Die hier gezeigte Standardkurve erzielte eine PCR-Effizienz von 1,966.

### 3.2.2 Etablierung der Konzentration der Proben

Nachdem die Standardreihe etabliert war und eine gute Effizienz der PCR erreicht war, wurde die cDNA bzw. RNA-Konzentration der Proben festgelegt. Es war wichtig, dass die Proben ein Signal innerhalb der Standardreihe aufwiesen, um die Ausgangsmenge der Target-cDNA bzw. RNA mithilfe der Standardreihe quantifizieren zu können. In Abbildung 3.4 stellen die hellroten Kurven die verschiedenen Proben dar. Wie gewünscht zeigten sie ein Signal ab durchschnittlich 20 Zyklen, nachdem eine cDNA bzw. RNA-Menge von absolut 1 ng eingesetzt wurde. Damit lagen sie hinter dem ersten Standard mit einem Cp-Wert von 15 und vor dem vierten Standard mit einem Cp-Wert von ca. 25.

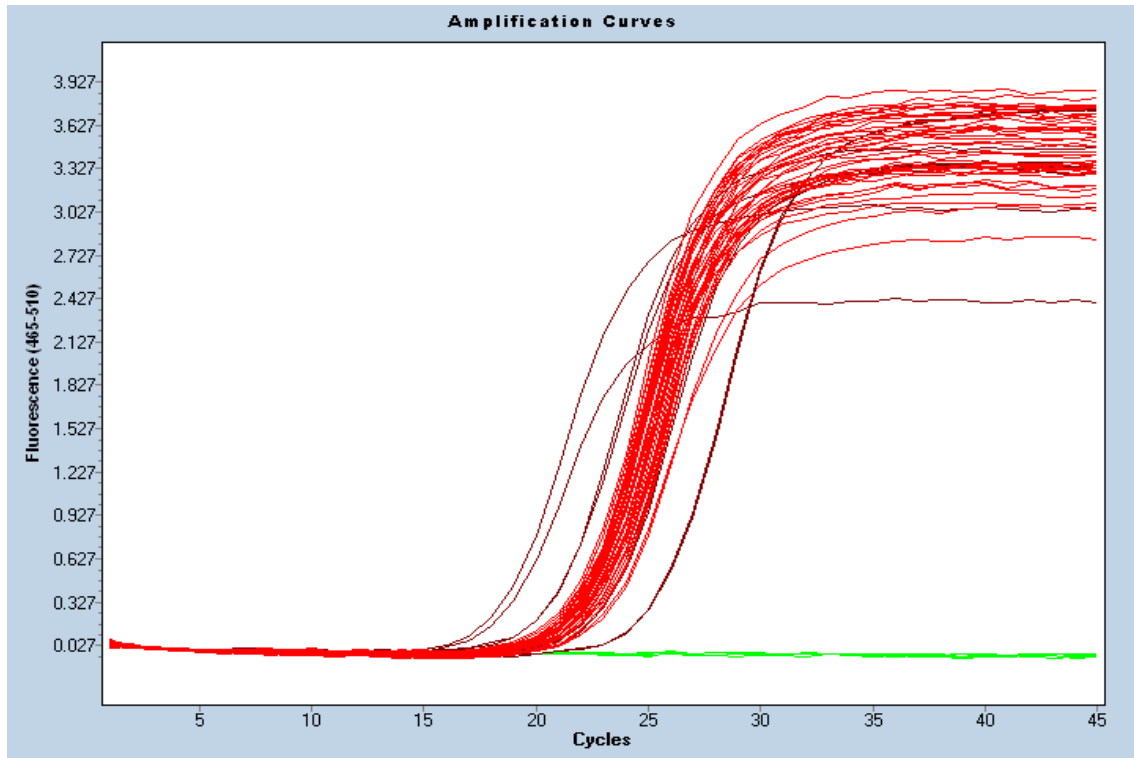


Abbildung 3.4 Signale der Proben innerhalb der Standardreihe.

Auf der x-Achse werden die abgelaufenen PCR-Zyklen dargestellt, während die y-Achse das Fluoreszenzsignal abbildet. Die braunen Kurven entsprechen den Signalen der Standardreihe, die optimalerweise in regelmäßigen  $C_p$ -Wert Abständen auftreten. Die hellroten Kurven entsprechen den Signalen der zu analysierenden Proben. In Grün werden die Negativkontrolle und die RT-Kontrolle dargestellt, diese sollten keine Amplifikation zeigen.

## 3.2.3 Etablierung der Primer

Ferner stellte sich die Frage, welche Primer verwendet werden sollten. Einerseits musste ein spezifischer Primer für das humane *ATXN3* ausgewählt werden. Dieser sollte zuverlässig das humane *ATXN3*-Gen erkennen, gleichzeitig jedoch nicht das murine *Atxn3* oder andere *Off-Targets* binden. Ebenso wichtig waren die Primer für die murinen Haushaltsgene, da diese für die spätere Quantifizierung der Ergebnisse entscheidend waren. Es wurden Primer für das murine Pyruvatdehydrogenase-Gen (*Pdh*), für das murine Gen des Flavoproteins der Succinatdehydrogenase (*Sdha*), für murines Actin sowie für das murine *TATA-Box-binding-protein* (*Tbp*) getestet. Zuerst wurden die optimalen Anlagerungstemperaturen mittels des *in silico* Vorhersageprogramm von *Primer Blast* ermittelt. Daraufhin wurden alle Primer zunächst im *Two-Step* Verfahren angewendet und später auch im *One-Step* Verfahren getestet, weshalb hier exemplarisch

## Ergebnisse

Darstellungen aus beiden Verfahren gezeigt werden. Es wurde die beschriebene Verdünnungsreihe von 1:10, 1:50, 1:250, 1:1250 sowie die Konzentration der cDNA bzw. RNA Proben von 1 ng/ µl eingesetzt. Als Negativkontrolle wurden Wasser anstatt der Probe und im *One-Step* Verfahren das Reaktionsgemisch ohne Reverse Transkriptase eingesetzt. Eine Übersicht der getesteten Primerpaare mit ihrem *Target*-Genabschnitt sowie ihrer Anlagerungstemperatur sind in Tabelle 3.1 gezeigt.

Tabelle 3.1 Vorstellung der getesteten Primerpaare

| Name    | Gebundenes Gen                  | Anlagerungstemperatur in °C |
|---------|---------------------------------|-----------------------------|
| ATXN3 A | Humanes <i>ATXN3</i>            | 58                          |
| ATXN3 B | Humanes <i>ATXN3</i> Exon 2/4   | 57                          |
| ATXN3 C | Humanes <i>ATXN3</i> Exon 10/11 | 56                          |
| Atxn3   | Murines <i>Atxn3</i>            | 58,5                        |
| Pdh     | Murine <i>Pdh</i>               | 58,5                        |
| Sdha    | Murine <i>Sdha</i>              | 59                          |
| Tbp     | Murines <i>Tbp</i>              | 59                          |
| Actin   | Murines <i>Actin</i>            | 66                          |

### 3.2.3.1 Relevanz der Schmelzkurven und Schmelzpunkte

Für die Evaluierung der PCR-Güte war einerseits entscheidend, wie die Cp-Werte der Proben ausfielen und wie identisch sie zwischen den Duplikaten waren. Besonderes Augenmerk war auf die Schmelzkurven der entstandenen PCR-Produkte zu legen, um die Reinheit der PCR-Produkte zu analysieren. Deshalb sollen nun zuerst die Begriffe Schmelzkurven und Schmelzpunkte eingeführt werden:

Nach Ablauf der qPCR wurden die Proben durch ein Ansteigen der Temperatur im *LightCycler* wieder aufgeschmolzen. Sobald das PCR-Produkt aufgeschmolzen war, verlor es seine Struktur, sodass auch der interkalierende fluoreszierende Farbstoff nicht mehr im Doppelstrang binden konnte. Folglich nahm das Fluoreszenzsignal ab, bis es ganz verschwand, die beiden Doppelstränge also vollständig aufgeschmolzen waren. Die Temperatur, bei welcher das PCR-Produkt seine Struktur verliert, ist durch dessen Länge

## Ergebnisse

und Basenzusammensetzung vor allem dem G-C-Gehalt bestimmt und somit spezifisch für jedes PCR-Produkt.

In Abbildung 3.5 sind die Schmelzkurven zur Standardreihe aus Abbildung 3.4 zu sehen. Auf der x-Achse wird die Temperatur aufgetragen. Auf der y-Achse wird das Fluoreszenzsignal der Proben gezeigt. Wenn in allen Proben mit demselben Primer einheitliche PCR-Produkte entstanden sind, dann zeigten sich auch einheitliche Schmelzkurven wie die blauen Kurven im vorliegenden Beispiel. Die roten Kurven entsprechen den Negativkontrollen (zuvor Grün dargestellt). Da in diesen wie erwünscht keine Amplifikation stattgefunden hat, gab es auch keine PCR-Produkte, die nun aufgeschmolzen werden konnten. Ihre Kurven verliefen dauerhaft niedrig, was einem Hintergrundrauschen entsprach.

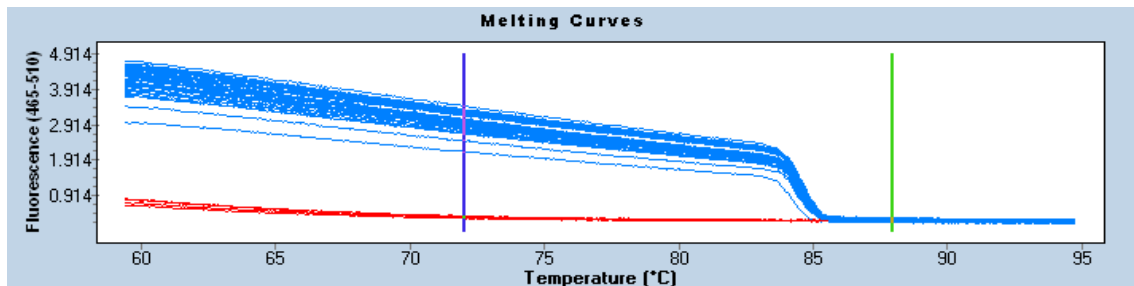


Abbildung 3.5 Beispielhafte Schmelzkurve der PCR-Produkte.

Auf der x-Achse wird die Schmelztemperatur in °C angezeigt, die y-Achse zeigt das Fluoreszenzsignal. Die blauen Linien entsprechen den Schmelzkurven der verschiedenen Proben sowie denen der Standardreihe. Optimalerweise weisen alle dasselbe Schmelzprodukt auf. Die roten Linien, die auf einem niedrigen Fluoreszenzlevel verlaufen, stellen die Negativkontrolle sowie die RT-Kontrolle dar. In diesen lag kein PCR-Produkt vor, weshalb kein Schmelzprodukt entstehen konnte.

Um noch spezifischer zu erkennen, ob einheitliche PCR-Produkte vorlagen, konnten aus den Schmelzkurven die Schmelzpunkte der Proben errechnet werden, was in Abbildung 3.6 zu erkennen ist. Deshalb werden in der späteren Auswertung der Primer-Etablierung auch nur die Schmelzpunkte gezeigt. Auf der x-Achse ist die Temperatur aufgetragen, während die y-Achse die Veränderung des Fluoreszenzsignals abbildet. Dadurch zeigt sich ein Ausschlag für die Temperatur, bei welcher eine massive Abnahme des Fluoreszenzsignals durch das Aufschmelzen der Doppelstränge vorlag. Dies ist der spezifische Schmelzpunkt des PCR-Produkts. Auch hier entsprechen die blauen Kurven den Proben, die alle mit demselben Primer untersucht wurden. Daher weisen sie einen

## Ergebnisse

identischen Schmelzpunkt auf, was dem optimalen Ergebnis entsprach. Die Negativkontrollen sind als rote Linien zu erkennen.

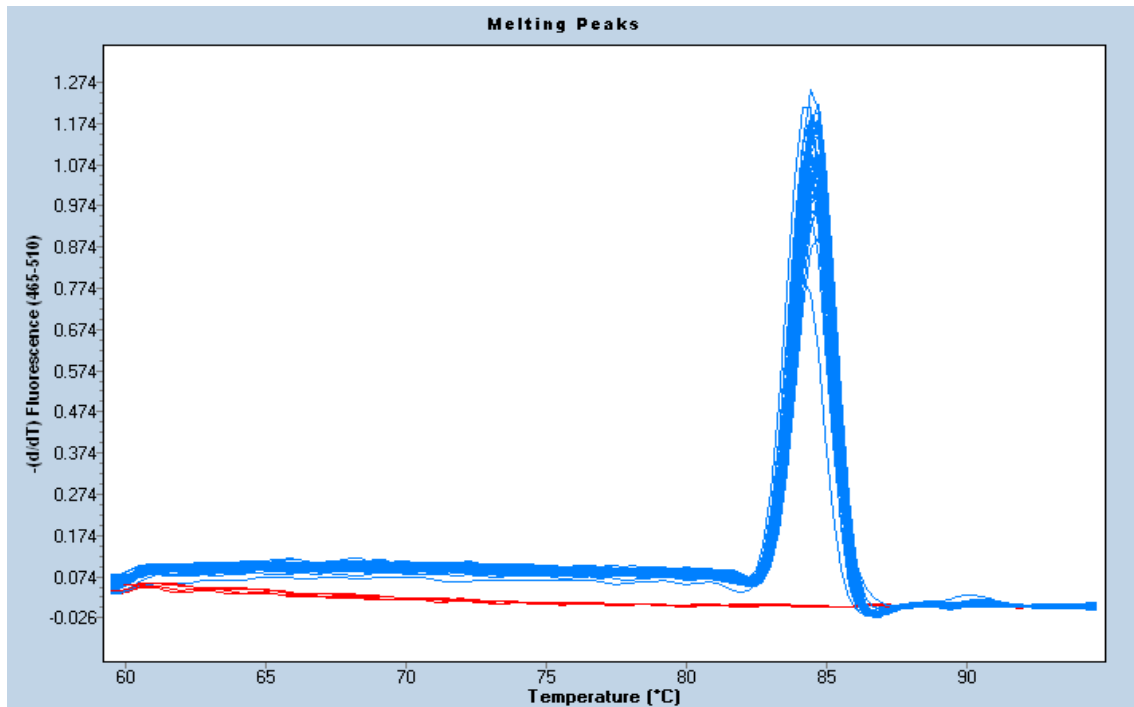


Abbildung 3.6 Aus den Schmelzkurven errechnete Schmelzpunkte

Auf der x-Achse wird die Schmelztemperatur in °C dargestellt, während die y-Achse die Änderung des Fluoreszenzsignals abbildet. Die blauen Linien stellen die Proben bzw. die Standardreihe dar und zeigen den spezifischen Schmelzpunkt der PCR-Produkte an. Auch hier war zu erzielen, dass alle Produkte denselben Schmelzpunkt aufwiesen. Die roten Linien entsprechen der Negativkontrolle und der RT-Kontrolle, sie sollen kein Aufschmelzen zeigen.

### 3.2.3.2 Ergebnisse der Primerpaar-Testung

Im Folgenden werden die verschiedenen Primerpaare aus Tabelle 3.1 auf ihre Fluoreszenzsignale und auf die entstandenen Schmelzpunkte überprüft. Damit wird getestet, wie zuverlässig sie ihre *Target*-Gene binden und die Amplifikation induzieren.

#### 3.2.3.2.1 Primerpaare für murines *Tbp* sowie für murines *Actin*

Unter den Haushaltsgenen erwiesen sich die Primer für murines Actin sowie für murines *Tbp* als ungeeignet, da sie unter den getesteten Bedingungen keine zuverlässige Amplifikation zeigten, wie in Abbildung 3.7 zu erkennen ist. Diese zeigt ein

## Ergebnisse

beispielhaftes Ergebnis für murines *Tbp*, welches nicht auswertbar war. Vergleichbar sah das Ergebnis für murines *Actin* aus. Auch beim Wiederholen des Versuchs konnte kein aussagekräftiges Ergebnis erreicht werden. Betrachtet man die sehr geringe Skalierung (hier von 0.0 bis 0,15 im Vergleich bei den anderen Graphiken von 0 bis 4) der y-Achse, erkennt man, dass die vermeintliche Steigung der Kurven gar keine reale ist. Es entsteht also keine tatsächliche Zunahme des Fluoreszenzsignals über die Zeit. Die Signale entsprechen vertikal verlaufenden Linien.

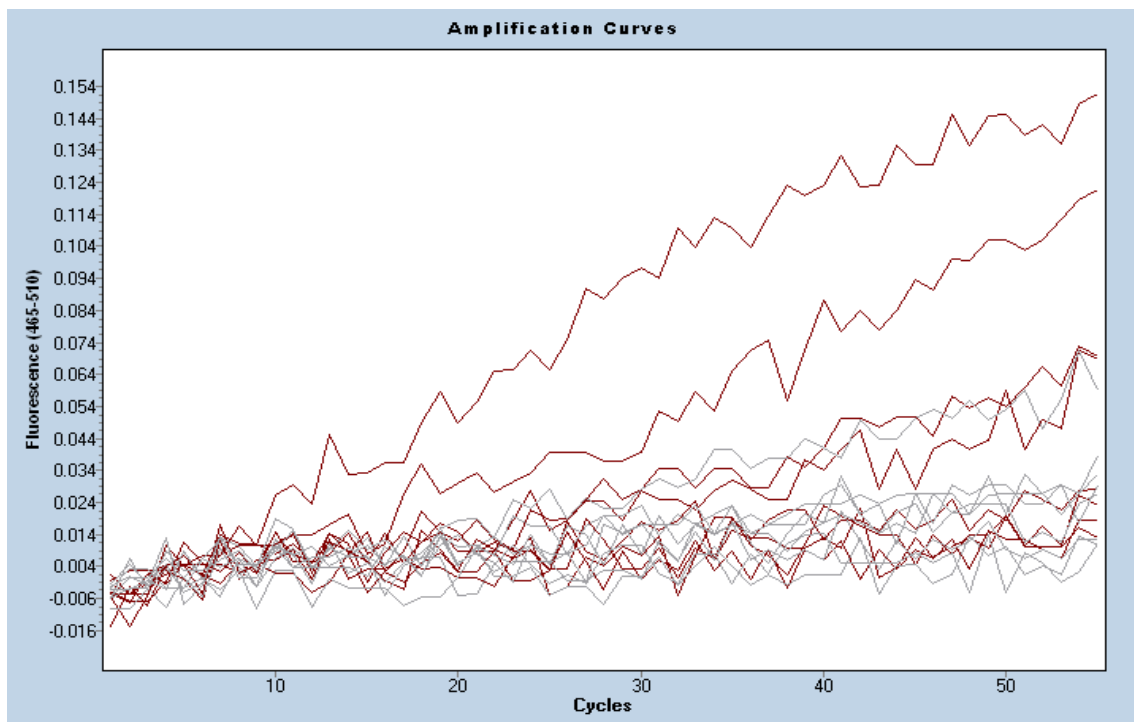


Abbildung 3.7 Ergebnisse für das Primerpaar für murines *Tbp*

Auf der x-Achse werden die abgelaufenen PCR-Zyklen aufgetragen. Die y-Achse zeigt das Fluoreszenzsignal. Die braunen Linien entsprechen der Standardreihe, in grau werden die Signale der Proben abgebildet. Die Primer wurden im Two-Step Verfahren getestet. Es zeigte sich kein spezifisches Signal, welches eine Amplifikation darstellt. Ähnlich sahen die Ergebnisse des Primerpaares für murines *Actin* aus.

### 3.2.3.2.2 Primerpaare für murine *Pdh* sowie für murine *Sdha*

Die Primer für die murine *Pdh* sowie für das murine *Sdha* zeigten zuverlässige Ergebnisse mit einheitlichen Schmelzprodukten. Dies ist beispielhaft in Abbildung 3.8 für das murine *Sdha* zu erkennen. Alle analysierten Proben und die Standardreihe zeigten gute, exponentiell wachsende Fluoreszenzsignale.

## Ergebnisse

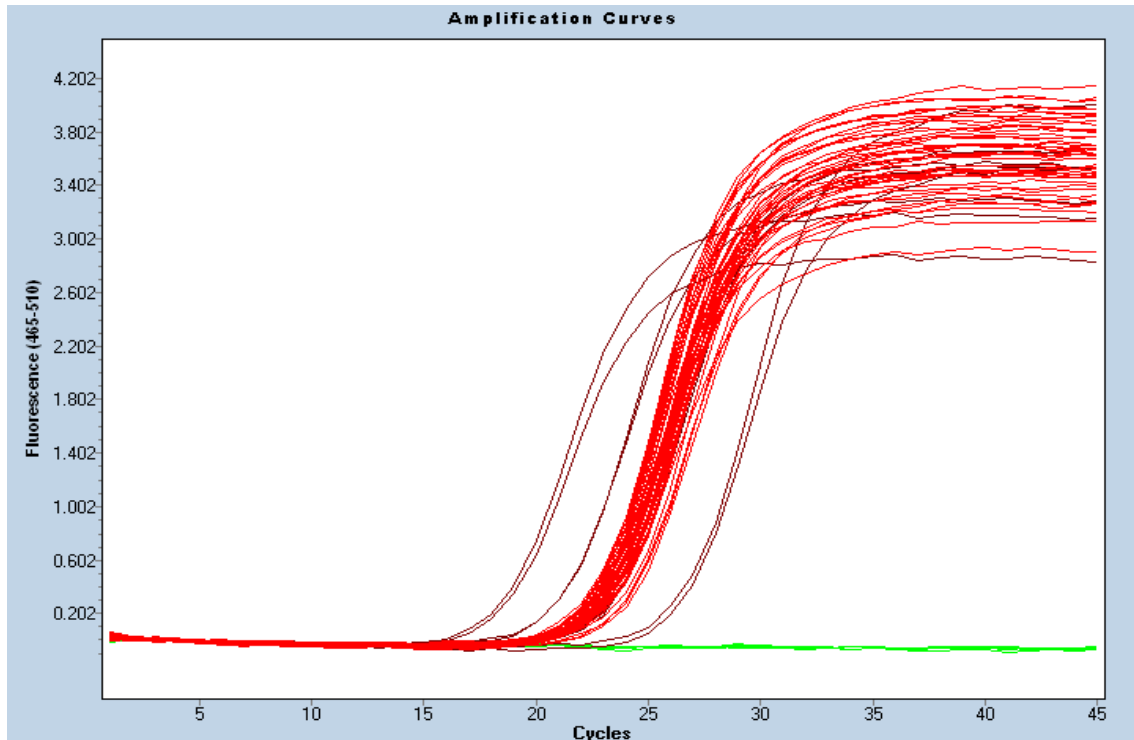


Abbildung 3.8 Ergebnisse für das Primerpaar für murines Sdha

Auf der x-Achse sind die abgelaufenen PCR-Zyklen zu erkennen, die y-Achse zeigt das Fluoreszenzsignal. Die braunen Linien entsprechen der Standardreihe, die roten Linien gehören zu den Signalen der Proben. In Grün sind die Negativkontrollen zu erkennen. In allen Proben fand wie erwartet eine zuverlässige Amplifikation statt, während in der Negativkontrolle sowie der RT-Kontrolle keine Bildung von PCR-Produkten vorlag.

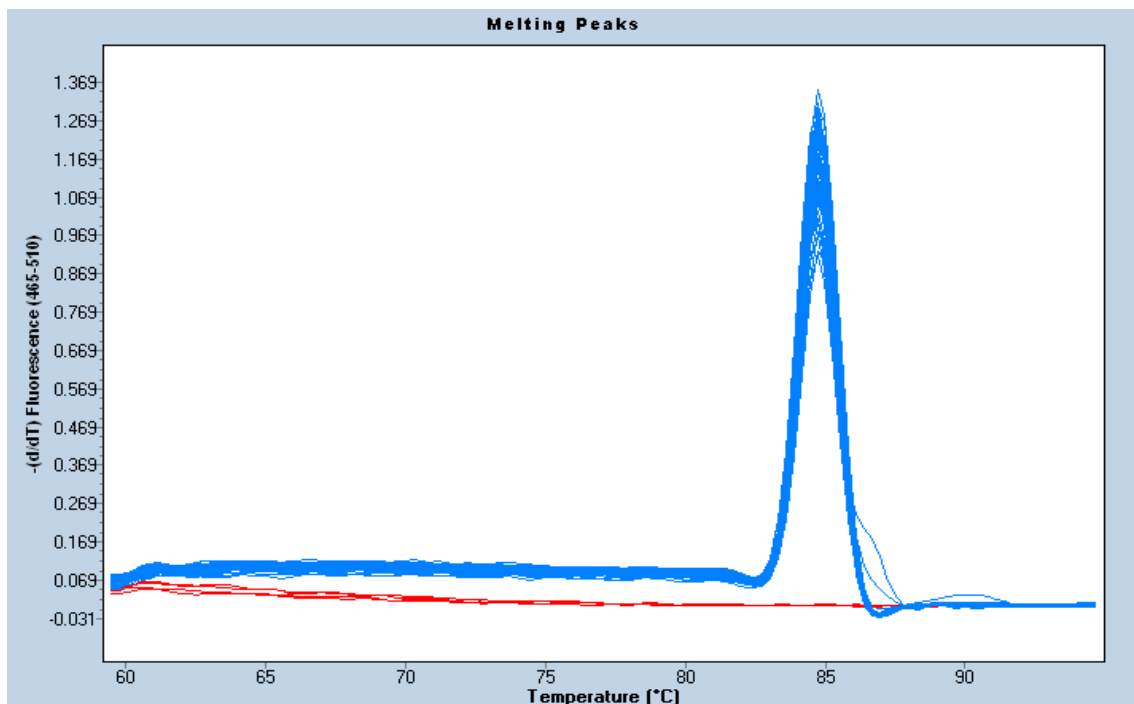


Abbildung 3.9 Schmelzpunkte zum Primerpaar für murines Sdha

## Ergebnisse

Die Abbildung zeigt die Schmelztemperatur auf der x-Achse, während die y-Achse die Veränderung des Fluoreszenzsignals über die Zeit veranschaulicht. In Blau sind die Schmelzkurven der Standardreihe sowie der Proben zu erkennen. Alle Proben und Standards wiesen ein einheitliches Schmelzprodukt auf, was auf eine gute Präzision und Spezifität des Primerpaares hindeutete. Die roten Linien gehören zur Negativkontrolle und zur RT-Kontrolle, in welchen kein PCR-Produkt aufgeschmolzen werden konnte.

Im Aufschmelzen zeigten sich für die PCR-Produkte einheitliche Schmelzkurven (Abbildung 3.9), was für eine gute Präzision und Spezifität des Primerpaares sprach.

### 3.2.3.2.3 Primerpaare für humanes *ATXN3*

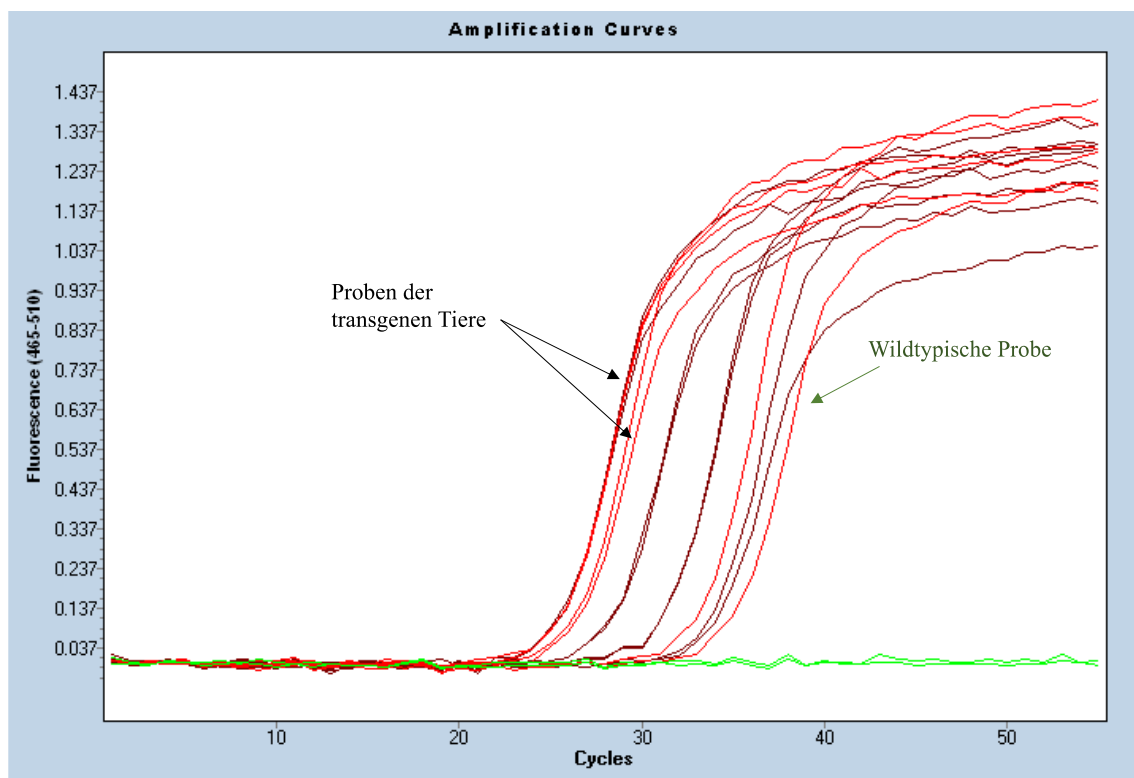


Abbildung 3.10 Ergebnisse für das Primerpaar *ATXN3 A*

Auf der x-Achse sind die abgelaufenen PCR-Zyklen zu erkennen. Auf der y-Achse ist das Fluoreszenzsignal der Proben dargestellt. Die braunen Linien entsprechen den Signalen der Standardreihe, die roten Linien denen der untersuchten Proben. Die grünen Linien, die auf dem niedrigen Niveau laufen, gehören zu den Negativkontrollen. Dabei sind zwei Proben (je als Duplikate) zu erkennen, die bereits in einem früheren Zyklus ( $C_p$  bei ca. 25) ein Signal zeigen. Sie waren zwei Proben zuzuordnen, die das humane *ATXN3* exprimierten. Die Probe, die die Signale der beiden Duplikate erst bei einem höheren  $C_p$ -Wert zeigte, gehörte zu einer wildtypischen Maus. Diese enthielt also nur ihr endogenes murines *Atxn3* und wurde unspezifisch vom Primer detektiert.

## Ergebnisse

Für den Primer des humanen *ATXN3* war entscheidend, dass er präzise das humane Transgen in den WT/YAC84Q Mäusen erkannte, jedoch nicht das endogene murine *Atxn3* amplifizierte. Zuerst wurde das Primerpaar ATXN3 A getestet (Abbildung 3.10). Es wurden zwei Proben eingesetzt, die aus für das humane ATXN3 transgenen Mäusen stammten, in denen also das humane *ATXN3* exprimiert wurde und demnach auch eine Bindung durch die Primer und ein Fluoreszenzsignal zu erwarten war (siehe Pfeil-Beschriftung). Zusätzlich wurde die Probe einer wildtypischen Maus eingesetzt, in der nur endogenes *Atxn3* exprimiert wurde und demnach keine Detektion durch die Primerpaare zu erwarten war. Wie jedoch zu erkennen ist, wurde auch die wildtypische Probe amplifiziert. Sie wies zwar einen deutlich höheren Cp-Wert auf, die Amplifikation sprach dennoch für eine Ungenauigkeit des Primerpaares.

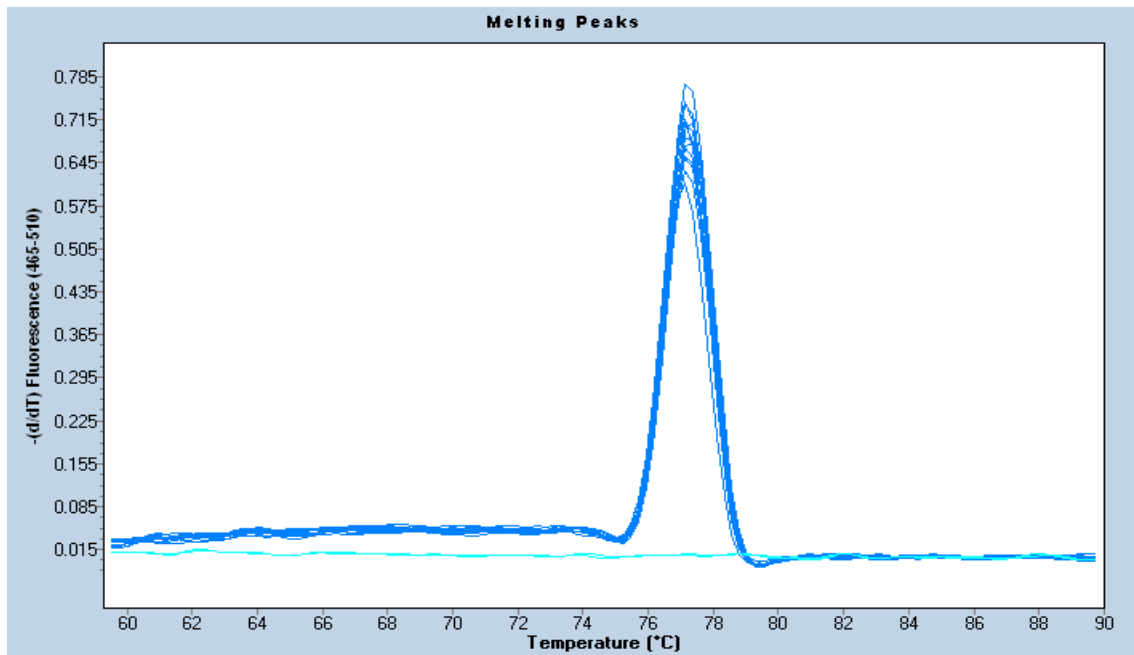


Abbildung 3.11 Schmelzpunkte zum Primerpaar ATXN3 A

Auf der x-Achse erkennt man die Schmelztemperatur, die y-Achse zeigt die Veränderung des Fluoreszenzsignals. Dadurch ergeben sich die Schmelzpunkte, die spezifisch für jedes PCR-Produkt sind. Es bestätigte sich hier, dass das Primerpaar des humanen *ATXN3* sowohl die transgenen als auch die wildtypischen Mausproben erkannt und amplifiziert hatte, da in allen Proben dasselbe PCR-Produkt entstanden war. Die hellblauen Linien gehören zur Negativkontrolle sowie zur RT-Kontrolle, in der kein PCR-Produkt entstanden ist und folglich auch kein Aufschmelzen stattfinden konnte.

## Ergebnisse

Diese Unspezifität zeigte sich auch in den Schmelzkurven der Ergebnisse, wie in Abbildung 3.11 zu sehen ist. Alle Proben, also auch die wildtypische Probe, wiesen dasselbe Schmelzprodukt und damit PCR-Produkt auf. Dies sprach für eine ungenaue Primeranlagerung an die Test-cDNA. In Zusammenschau der Ergebnisse aus Abbildung 3.10 sowie 3.11 erwies sich Primerpaar ATXN3 A als ungeeignet, da nicht sicher zwischen humanem und murinem *Atxn3* unterschieden werden konnte. Vergleichbar sahen die Fluoreszenzsignale und Schmelzkurven für Primerpaar ATXN3 B aus (nicht gezeigt), weshalb Primerpaar ATXN3 B ebenfalls ausgeschlossen wurde.

Daraufhin wurde das Primerpaar ATXN3 C getestet. Es wurden eine Probe einer transgenen Maus und eine wildtypische Probe getestet, was in Abbildung 3.12 zu erkennen ist. Es zeigte sich sowohl für die Probe mit humanem *ATXN3* als auch für die mit murinem *Atxn3* ein Signal, grundsätzlich fand in beiden Proben eine Amplifikation statt.

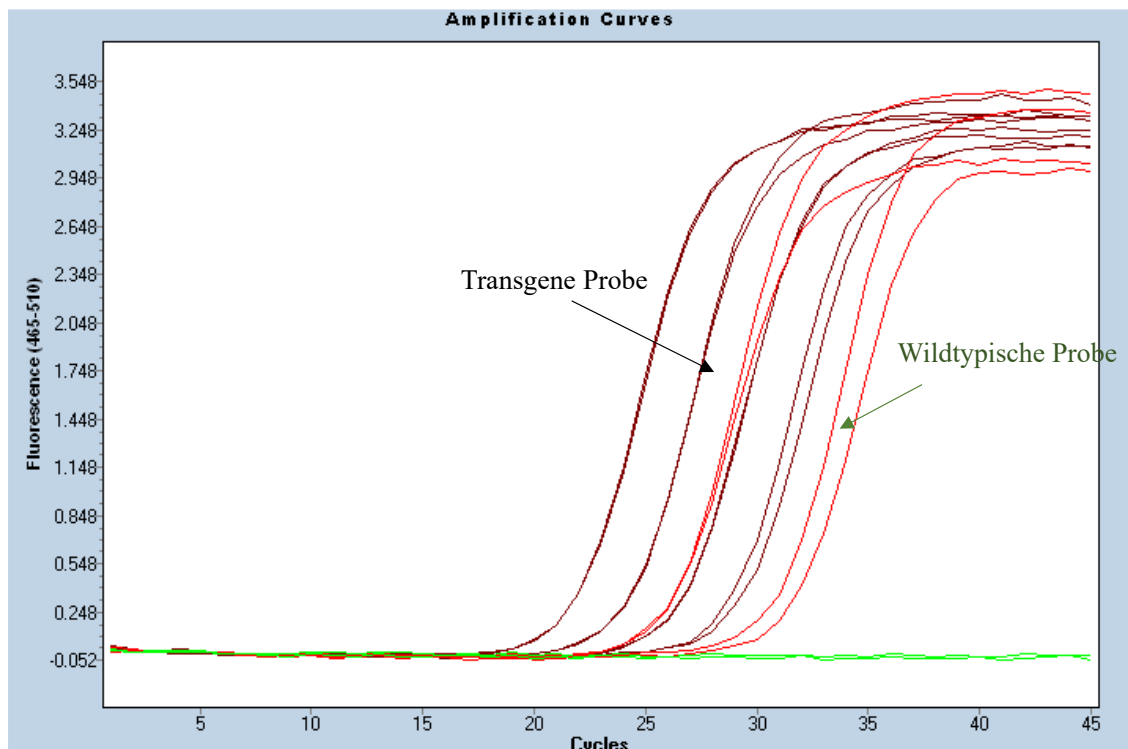


Abbildung 3.12 Ergebnisse für das Primerpaar ATXN3 C

Auf der x-Achse zeigen sich die PCR-Zyklen, auf der y-Achse das Fluoreszenzsignal. Die braunen Linien gehören zur Standardreihe, während die roten Linien den Signalen der Proben zuzuordnen sind. In Grün zeigten sich die Signale der Negativkontrollen. Die Probe mit niedrigerem Cp-Wert gehört zu einer transgenen YAC84Q/WT-Maus, während der höhere Cp-Wert einer Maus mit dem Genotyp WT/WT zuzuordnen war, diese exprimierte kein humanes *ATXN3*.

## Ergebnisse

Im anschließenden Schmelzprogramm konnten jedoch die Schmelzprodukte klar unterschieden werden (Abbildung 3.13). Daraus ließ sich schließen, dass zwar eine Amplifikation in der wildtypischen Probe stattgefunden hatte, diese aber unspezifisch war.

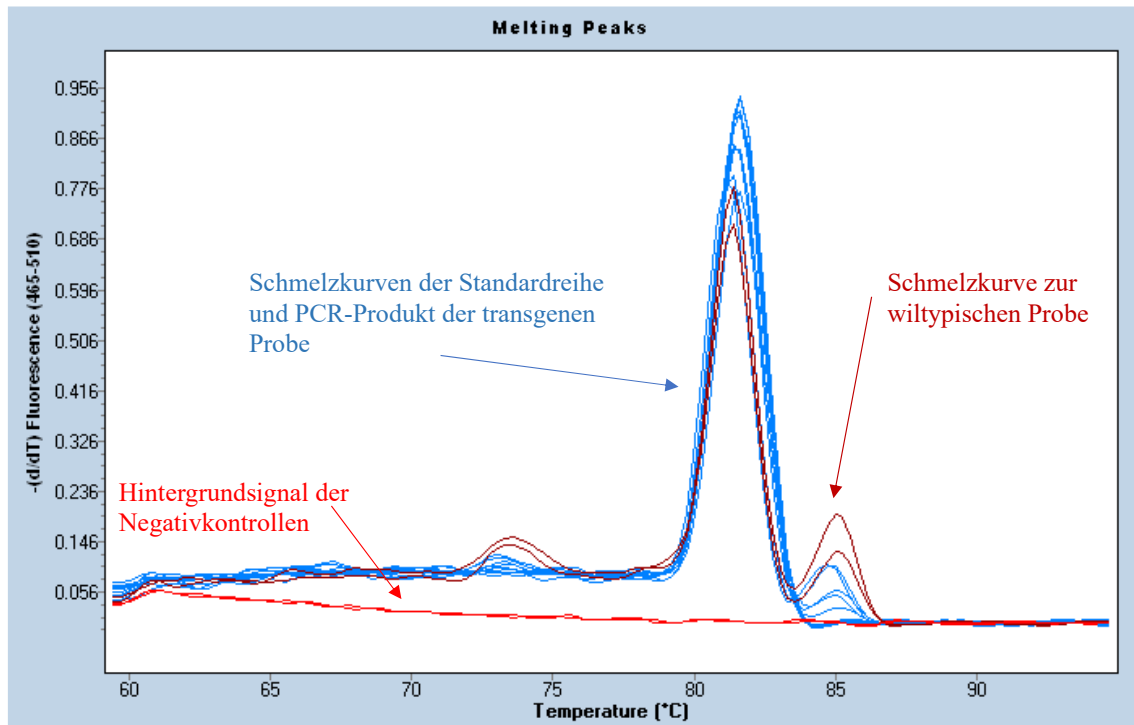


Abbildung 3.13 Schmelzpunkte zum Primerpaar ATXN3 C

Auf der x-Achse ist die Schmelztemperatur aufgetragen. Die y-Achse zeigt die Differenz des Fluoreszenzsignals über die Zeit. Die blauen Linien sind den Schmelzprodukten der Standardreihe sowie der Probe der transgenen YAC84Q/WT-Maus zuzuordnen. Des Weiteren zeigten sich zwei Schmelzkurven in Braun. Diese waren dem PCR-Produkt der wildtypischen Probe zuzuordnen. Es fand also eine unspezifische Amplifikation in dieser Probe statt, mit einem Schmelzprodukt, welches nicht dem eigentlichen Target zuzuordnen ist. In Rot zeigten sich die Negativkontrollen, in denen gar keine Amplifikation vorlag und somit kein Produkt aufgeschmolzen werden konnte.

### 3.2.3.2.4 Primerpaar für murines *Atxn3*

Abschließend wurde das Primerpaar *Atxn3* für murines *Atxn3* getestet. Dieses konnte zuverlässig alle murinen Proben detektieren und wies keine Detektion des humanen *ATXN3* auf, wie in Abbildung 3.14 zu erkennen ist.

## Ergebnisse

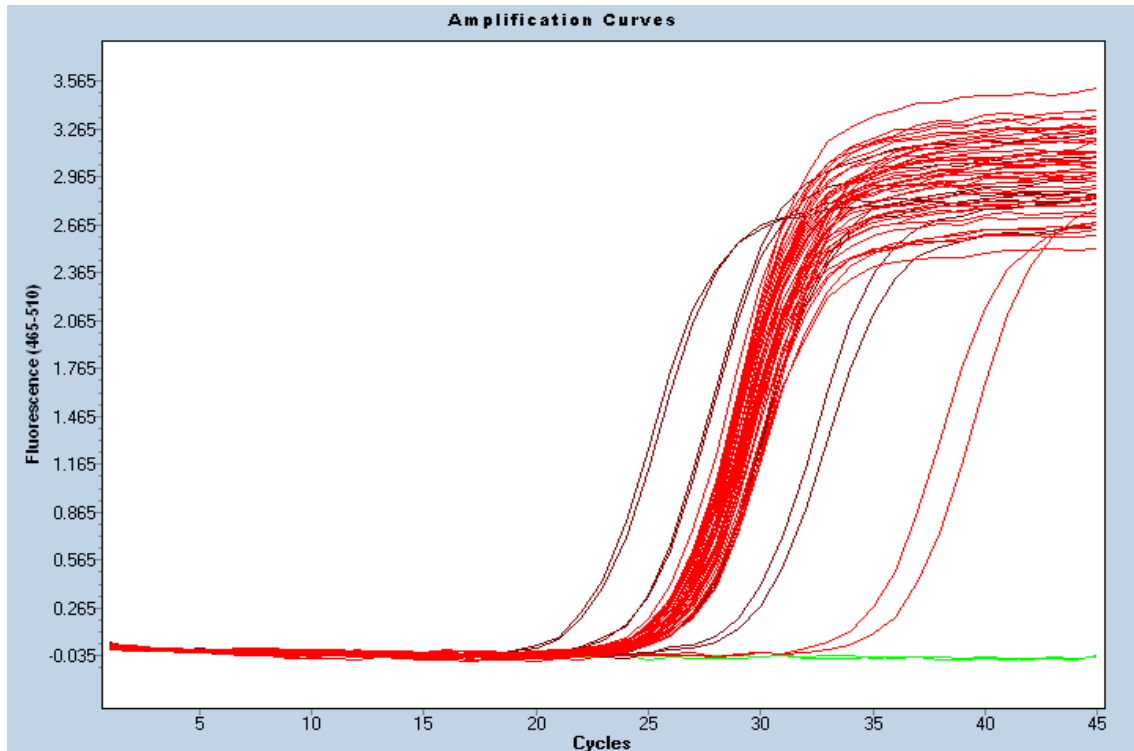


Abbildung 3.14 Ergebnisse für das Primerpaar *Atxn3*

Auf der x-Achse werden die PCR-Zyklen dargestellt, während die y-Achse das Fluoreszenzsignal veranschaulicht. Die braunen Linien gehören zur Standardreihe, während die roten Linien den Proben zuzuordnen sind. Die roten Linien mit höheren  $C_p$ -Werten gehören zur RT-Kontrolle. In Grün zeigen sich die Negativkontrollen mit Wasser.

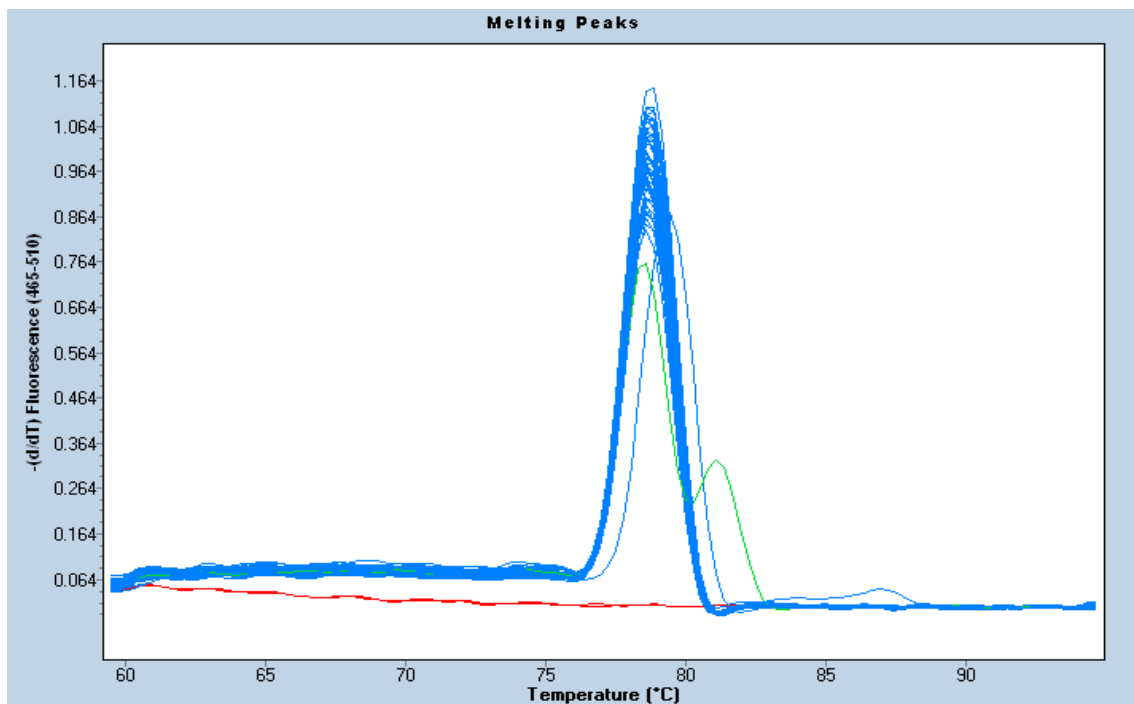


Abbildung 3.15 Schmelzpunkte zum Primerpaar *Atxn3*

## Ergebnisse

*Auf der x-Achse wird die Schmelztemperatur gezeigt, während die y-Achse die Änderung des Fluoreszenzsignals über die Zeit angibt. Die blauen Linien gehören zu den Proben, die roten Linien zur Negativkontrolle und zur RT-Kontrolle, in denen kaum bis wenig PCR-Produkt vorlag, welches auch nicht aufgeschmolzen werden konnte. Es zeigten sich einheitliche Schmelzprodukte bis auf für eine Probe, die die Schmelzkurve in Grün aufwies. In dieser Probe ist ein anderes PCR-Produkt entstanden, diese Probe musste aus diesem Grund von nachfolgenden statistischen Analysen ausgeschlossen werden. Es ist insgesamt von einer guten Präzision und Spezifität des Primerpaares auszugehen.*

Lediglich die Effizienz der PCR fiel über alle Versuche hinweg betrachtet im Vergleich zu den anderen ausgewählten Primerpaaren etwas niedriger aus. Da sie im festgelegten Rahmen von 1,7 bis 2,1 lag, wurde dies toleriert. Im gezeigten Beispiel konnte eine Effizienz von 1,925 erreicht werden. In der RT-Kontrolle zeigte sich eine unspezifische Amplifikation, welche beim Aufschmelzen ein anderes Schmelzverhalten im Vergleich zum Target-PCR-Produkt aufwies. Es konnte daher davon ausgegangen werden, dass eine leichte Verunreinigung mit genomischer DNA vorlag. Insgesamt konnten einheitliche Schmelzpunkte erreicht werden, die manchmal etwas unsauberer als bei den anderen Primerpaaren aussahen (Abbildung 3.15).

### 3.2.3.3 Zusammenfassung der Primeretablierung

*Tabelle 3.2 Ergebnisse der Primeretablierung*

| <b>Name</b>  | <b>Gebundenes Gen</b>               | <b>Ergebnis</b>  |
|--------------|-------------------------------------|------------------|
| ATXN3 A      | Humanes ATXN3                       | verworfen        |
| ATXN3 B      | Humanes ATXN3 Exon<br>2/4           | verworfen        |
| ATXN3 C      | <b>Humanes ATXN3 Exon<br/>10/11</b> | <b>etabliert</b> |
| <b>Atxn3</b> | <b>Murines Atxn3</b>                | <b>etabliert</b> |
| <b>Pdh</b>   | <b>Murine Pdh</b>                   | <b>etabliert</b> |
| <b>Sdha</b>  | <b>Murine Sdha</b>                  | <b>etabliert</b> |
| Tbp          | Murines Tbp                         | verworfen        |
| Actin        | Murines Actin                       | verworfen        |

In der obenstehenden Tabelle 3.2 ist eine Übersicht der Ergebnisse der Primeretablierung zu erkennen. Diese greift Tabelle 3.1 auf und gibt an, ob die getesteten Primerpaar etabliert wurden oder verworfen werden musste. Insgesamt wurden 2 Primerpaare für

Haushaltsgene, nämlich für murine *Pdh* und für murine *Sdha* ausgewählt. Außerdem wurde sich für das Primerpaar ATXN3 C für humanes *ATXN3* und für das Primerpaar *Atxn3* für murines *Atxn3* entschieden.

### 3.2.4 Etablierung der Teststrategie

Da für die folgenden Studien sehr viele Proben analysiert wurden, sollte außerdem getestet werden, ob eine *Two-Step* oder eine *One-Step* Teststrategie geeigneter war. Das *Two-Step* Verfahren beinhaltet eine vorausgehende Reverse Transkription mit anschließender PCR. Alternativ wurden 3 *One-Step* Kits getestet, in denen beide Schritte, also Reverse Transkription und PCR im selben Reaktionsgemisch direkt hintereinander abliefen. Die getesteten Kits waren das QuantiNova *SYBR Green* RT-PCR Kit von Qiagen, das Kit *LightCycler EvoScript RNA SYBR Green I* Master von Roche und das Luna Universal *One-Step RT-qPCR* Kit der New England Biolabs.

Die Vergleichspunkte zur Entscheidungsfindung waren die Präzision der Ergebnisse, die Anzahl und Übersichtlichkeit der Pipettierschritte sowie die Kosten pro Probe (siehe auch Flussdiagramm Abbildung 3.1).

#### 3.2.4.1 Ergebnisse im *Two-Step* Verfahren

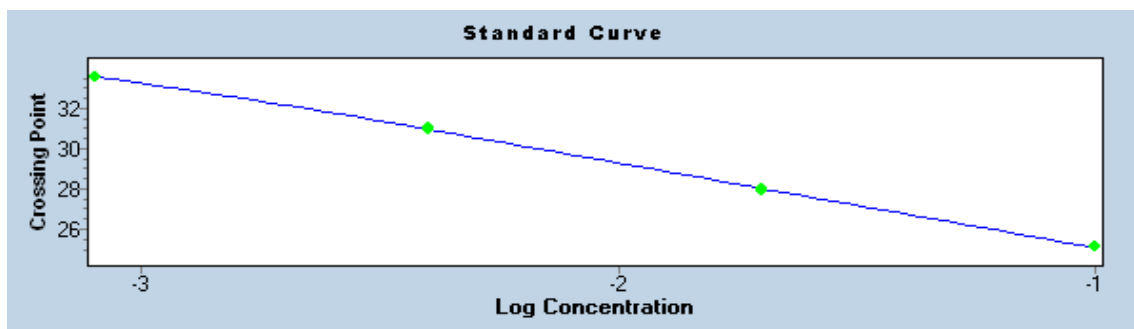


Abbildung 3.16 Standardkurve im *Two-Step*-Verfahren

Auf der x-Achse ist die Konzentration logarithmisch aufgetragen, während die y-Achse den Cp-Wert darstellt. Durch Eintragen der 4 Cp-Werte für die 4 Verdünnungen der Standardreihe, deren Konzentration bekannt war, konnte eine Gerade durch diese Punkte gelegt werden. Aus dieser Geraden ließ sich die PCR-Effizienz berechnen, die in diesem Fall 1,723 betrug.

In der Abteilung war das *Two-Step* Verfahren fest etabliert, weshalb es dafür ein optimiertes Protokoll gab. Mit diesem konnten zuverlässige Ergebnisse erreicht werden.

## Ergebnisse

Die Ziel-PCR-Effizienz zwischen 1,7 und 2,1 konnte eingehalten werden, was sich in einer gleichmäßigen Standardkurve darstellte. Eine Beispiel-Standardreihe ist in Abbildung 3.10 unter der Etablierung der Primer zu sehen. In obenstehender Abbildung 3.16 ist die zugehörige Standardkurve zu erkennen, die aus der Standardreihe berechnet werden konnte. Es wurde eine PCR-Effizienz von 1,723 erreicht.

### 3.2.4.2 Ergebnisse im Kit von Roche

Auch für die qRT-PCR Kit von Roche wurde die aus der Verdünnungsreihe pipettierte Standardreihe betrachtet (Abbildung 3.17). Es konnte eine saubere Standardreihe mit einer guten PCR-Effizienz von 1,89 erreicht werden. (Abbildung. 3.18).

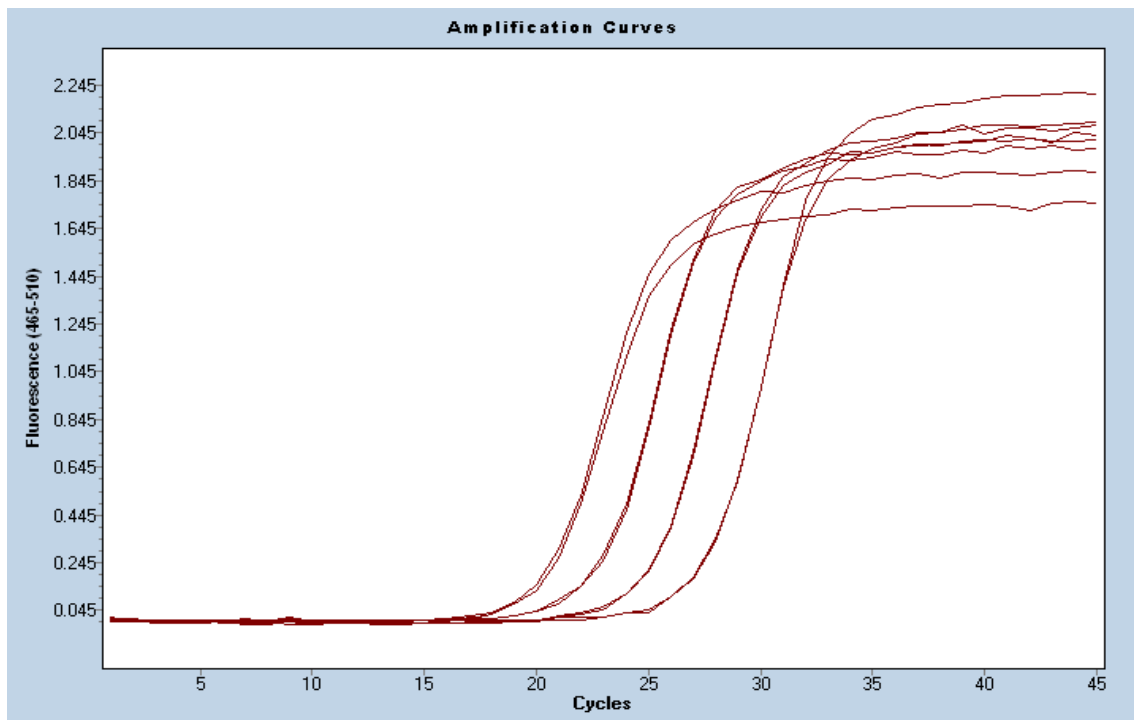


Abbildung 3.17 Standardreihe im Roche-Kit

Auf der x-Achse werden die PCR-Zyklen aufgetragen, die y-Achse zeigt das Fluoreszenzsignal. Man erkennt die braunen Linien, von denen jeweils 2 zeitgleich auftraten, diese also den Duplikaten der Standardreihe entsprachen. Der Abstand der  $C_p$ -Werte zwischen den Verdünnungen war konstant.

## Ergebnisse

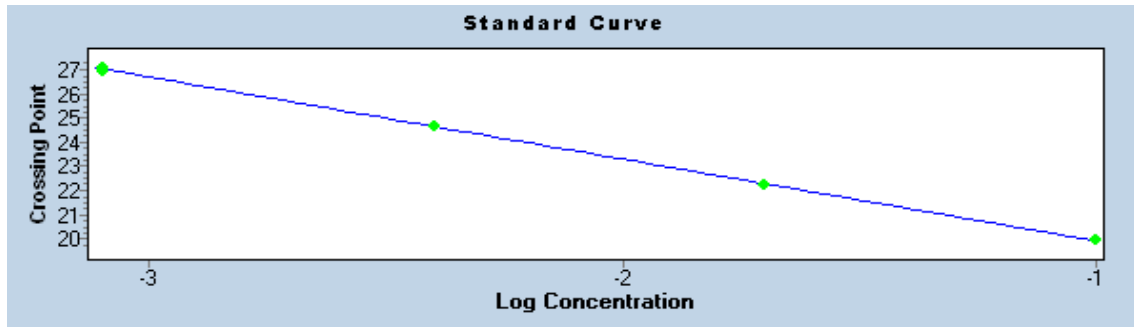


Abbildung 3.18 Standardkurve im Roche-Kit

Aus der in Abbildung 3.17 gezeigten Standardreihe konnte mithilfe der LightCycler 480 II Software die gezeigte Standardkurve berechnet werden. Auf der x-Achse ist die Konzentration der Standardverdünnungen logarithmisch aufgetragen. Die y-Achse zeigt den Cp-Wert. Durch Eintragen der Ergebnisse der Standardreihe konnte die Standardkurve gezeichnet werden. Die daraus errechnete Effizienz betrug 1,89, was einem sehr guten Wert entspricht.

### 3.2.4.3 Ergebnisse im Kit von Qiagen

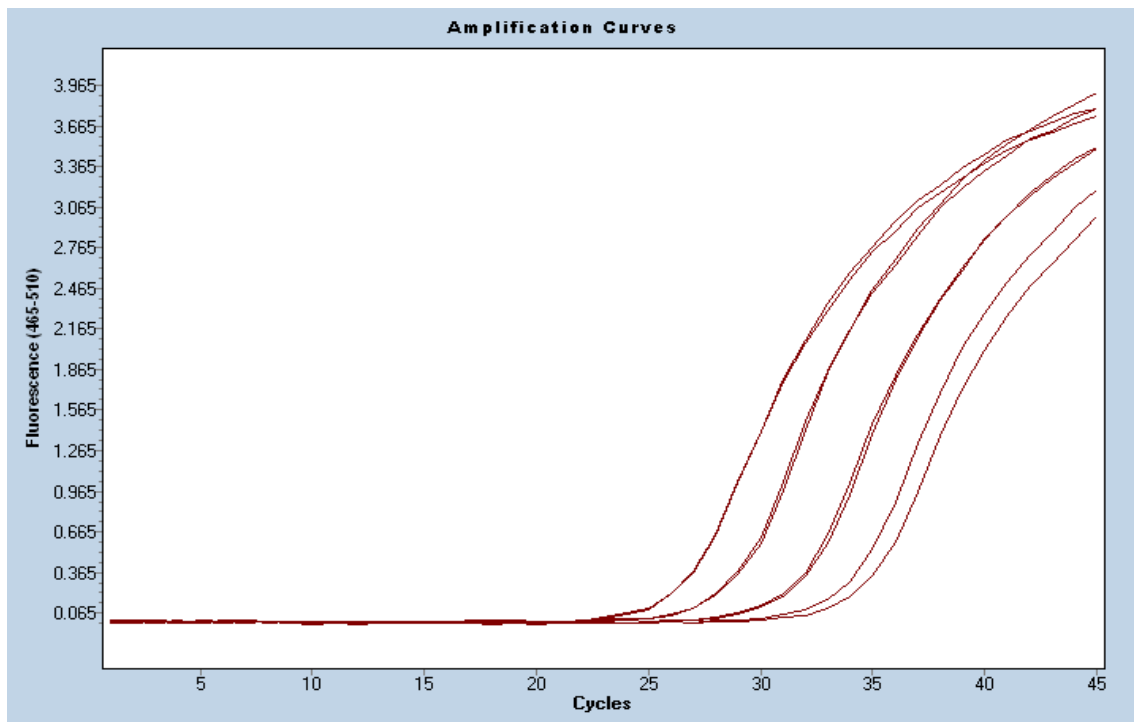


Abbildung 3.19 Standardreihe im Qiagen-Kit

Die x-Achse zeigt die PCR-Zyklen, die y-Achse das Fluoreszenzsignal. Die Standardreihe lag hier in deutlich stärkeren Verdünnungen vor, was zu den höheren Cp-Werten der Signale (in Braun) führte. Die Abstände zwischen den Verdünnungen sind nicht so präzise. Dies lag eher an Pipettierungenauigkeiten beim Verdünnen. Die Duplikate zeigten mit Ausnahme des 4. Standards sehr ähnliche Cp-Werte.

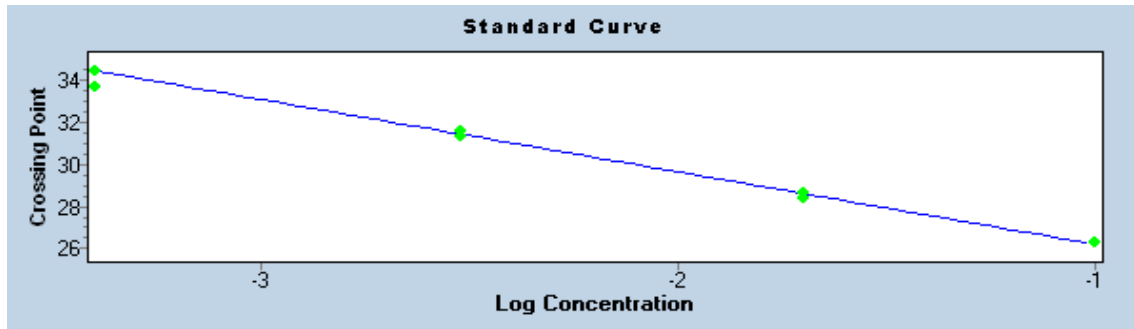


Abbildung 3.20 Standardkurve im Qiagen-Kit

Die x-Achse zeigt die Konzentration der Standardverdünnungen in logarithmischer Auftragung, während die y-Achse die Cp-Werte abbildet. Es ergab sich mithilfe der LightCycler 480 II Software auch für die Standardreihe (Abbildung 3.19) im Kit von Qiagen eine Standardkurve mit einer guten Effizienz von 1,79.

Dieselben Aspekte wurden auch beim Kit von Qiagen evaluiert (Abbildung 3.19). Es konnte eine vergleichbare Standardreihe erzielt werden, bei welcher aufgrund stärkerer Verdünnungen der Standards höhere Cp-Werte gesehen wurden als im Test von Roche. Generell wiesen die Duplikate identische Cp-Werte auf. Die Ungenauigkeit zwischen den Duplikaten des 4. Standards bzw. der Abstände der Cp-Werte der verschiedenen Verdünnungen deuteten eher auf Pipettierungenauigkeiten als auf Kit-bedingte Probleme hin. Auch die errechnete Standardkurve und PCR-Effizienz von 1,79 waren gute Ergebnisse (Abbildung 3.20).

#### 3.2.4.4 Ergebnisse im Kit von *Luna Universal*

Im Luna Kit konnten nach Optimierung der Zusammensetzung des Mastermix sehr präzise Ergebnisse erzielt werden. Die Kitanleitung setzte die doppelte Menge der eingesetzten Substanzen voraus, als bei dieser Arbeit tatsächlich verwendet wurden. Die genauen Mengenangaben sind in Tabelle 3.4 zu sehen. Beispielhafte Graphiken zu Standardreihe und Standardkurve sind in den Abbildungen 3.14 und 3.15 der Primeretablierung zu erkennen. Die erreichte PCR-Effizienz betrug 1,96, was ein sehr guter Wert war.

## 3.2.4.5 Ergebnisse der Etablierung der Teststrategie

Tabelle 3.3 Kriterien der Auswahl der Teststrategie bzw. des Kits

| Kriterien                                 | <i>Two-Step</i> -Verfahren | Qiagen:<br>QuantiNova<br><i>SYBR Green</i><br>RT-PCR Kit | <i>New-England Biolabs: Luna Universal One-Step RT-qPCR Kit</i> | Roche:<br><i>LightCycler EvoScript RNA SYBR Green I</i><br>Master |
|-------------------------------------------|----------------------------|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| Präzision                                 | Sehr gut                   | Gut                                                      | <b>Sehr gut</b>                                                 | Sehr gut                                                          |
| Farbkontrolle                             | -                          | -                                                        | <b>vorhanden</b>                                                | -                                                                 |
| Kosten je Probe zum Zeitpunkt der Studien | 1,416 \$                   | 1,264 \$                                                 | <b>0,392 €</b>                                                  | 1,628 \$                                                          |
| Verfügbarkeit zum Zeitpunkt der Studien   | Gut                        | Fraglich                                                 | <b>Sehr gut</b>                                                 | Fraglich                                                          |
| PCR-Dauer                                 | 101 Min                    | 22 Min                                                   | 64 Min                                                          | 55 Min                                                            |
| Handhabung/<br>Pipettierschritte          | Viele                      | 4                                                        | 4                                                               | 3                                                                 |

Was die Übersichtlichkeit anging, hatten die *One-Step* Kits den klaren Vorteil, deutlich weniger Pipettierschritte zu beinhalten, was Fehlern vorbeugen konnte. Dadurch sparten die *One-Step* Kits auch einiges an Zeit ein. Das Kit des Herstellers *New England Biolabs* hatte den Vorteil, dass dem Mastermix ein Farbstoff beigemischt war. So war gut zu erkennen, in welche *Wells* der Platte man diesen bereits pipettiert hatte. Die anderen Kits hatten einen farblosen Mastermix, was das Pipettieren deutlich unübersichtlicher gestaltete. Auch in der Kostenfrage lag das *Luna Universal One-Step RT-qPCR Kit* der *New England Biolabs* mit 0,392 € je Probe deutlich vorne, ebenso wie in der Verfügbarkeit, was unter Covid-19 bedingten Lieferengpässen während der Durchführung dieser Promotion ebenfalls eine wichtige Rolle spielte. Im Punkt Präzision erzielten alle 4 Kits vergleichbare Ergebnisse, was die Genauigkeit der Standardreihe und die Übereinstimmung der Cp-Werte zwischen den Duplikaten einer Probe anging. Abweichungen ließen sich eher durch Pipettierungenauigkeiten erklären, da sie zufällig vorkamen und nicht systematisch zugeordnet werden konnten.

## Ergebnisse

In Zusammenschau der verschiedenen Fakten wurde das Luna Universal *One-Step* RT-qPCR Kit ausgewählt. Die Faktoren, die zu dieser Entscheidung geführt haben, sind dick gedruckt. Diese Ergebnisse sind in Tabelle 3.3 zusammengefasst.

### 3.2.5 Finale Auswahl der Versuchsbedingungen

Als Standardreihe wurde final eine Verdünnungsreihe von 1:10, 1:50, 1:250 und 1:1250 mit einer Konzentration von 10 ng/  $\mu\text{L}$  in der ersten Verdünnung ausgewählt. Da das *One-Step* Kit ausgewählt wurde, konnte die RNA direkt in die Reaktionen eingesetzt werden. Dafür wurde eine Konzentration von 1 ng/  $\mu\text{L}$  je Probe gewählt. Die finale Zusammensetzung des Mastermix des Luna Kits ist in Tabelle 3.4 zu erkennen. Im PCR-Programm wurde die Anlagerungstemperatur im Laufe der Versuche von 59 auf 60 Grad verändert, wodurch die Ergebnisse präziser wurden (siehe Tabelle 3.5)

Tabelle 3.4 Finaler Mastermix zur Luna Universal RT-qPCR

| Reagenz                              | Volumen in $\mu\text{L}$ |
|--------------------------------------|--------------------------|
| Luna Universal One Step Reaction Mix | 5                        |
| Luna Warm Start Rt Enzyme Mix        | 0,5                      |
| Primer Mix (10 $\mu\text{M}$ )       | 0,8                      |
| RNAse freies Wasser                  | 3,2                      |
| RNA (1 ng/ $\mu\text{L}$ )           | 1                        |
| <b>Total</b>                         | 10                       |

Tabelle 3.5 Finales PCR-Programm zur Luna Universal RT-qPCR

| Schritt                                        | Temperatur in $^{\circ}\text{C}$ | Dauer in s | Zyklen |
|------------------------------------------------|----------------------------------|------------|--------|
| Reverse Transkription                          | 55                               | 600        |        |
| Initiale Denaturierung                         | 95                               | 60         |        |
| Denaturierung                                  | 95                               | 10         | 45     |
| Kombinierte Primeranlagerung und Amplifikation | 60                               | 60         | 45     |

## Ergebnisse

| Schritt   | Temperatur in °C  | Dauer in s | Ramp Rate in °C/ s |
|-----------|-------------------|------------|--------------------|
| Schmelzen | 95<br>60<br>60-90 | 10<br>15   | 0,04               |
| Abkühlen  | 40                | 10         |                    |

### 3.3 Teil B: Ergebnisse der durchgeführten ASO-Studien

Nachdem die Versuchsbedingungen der qRT-PCR festgelegt und optimiert waren, konnten die Studien mit den ASOs durchgeführt und ausgewertet werden. Das Vorgehen dabei ist im Flussdiagramm der Abbildung 3.21 dargestellt. Die beiden verschiedenen Studien sind zu unterscheiden.

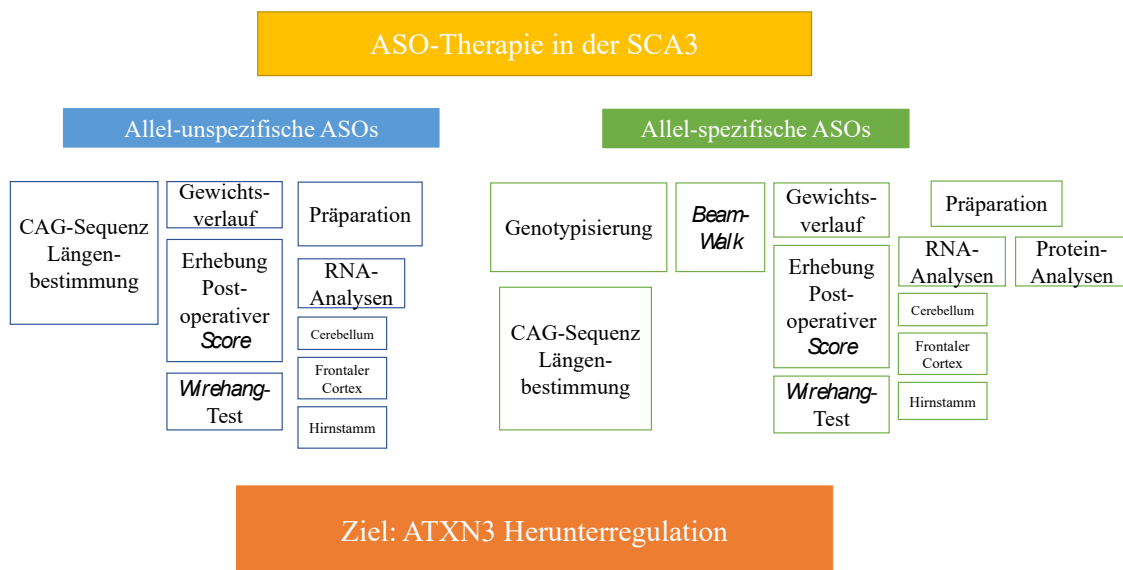


Abbildung 3.21 Aufbau der in dieser Promotion durchgeführten Studien

In der Abbildung sind die Abläufe der beiden ASO-Studien schematisch nebeneinander dargestellt. Für die allel-unspezifischen ASOs wurden zuerst die CAG-Wiederholungsanzahlen der Versuchstiere ermittelt sowie eine wöchentliche Gewichtserhebung durchgeführt. Nachdem die Injektionen stattgefunden hatten, wurden der postoperative Score sowie der Wirehang-Test erhoben. Abschließend wurden die Tiere präpariert und die RNA aus dem Gehirn isoliert. Diese wurde auf die Expression der RNA des humanen Ataxin-3 untersucht. In der Studie zu den allel-spezifischen ASOs wurde zusätzlich der Beam-Walk vor und nach den Injektionen aufgenommen, um Ganganalysen durchzuführen. Außerdem wurden Analysen des gewonnenen Proteins durchgeführt. Das Ziel war es, das humane ATXN3 sowie die zugehörige RNA herunterzuregulieren.

## Ergebnisse

Im ersten Teil wurden ASOs untersucht, die allel-unspezifisch das gesamte *ATXN3*-Protein herunterregulieren sollten.

Der zweite Teil behandelt zwei ASOs, die *ATXN3* allel-spezifisch regulieren sollten. Dafür wurde der Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) c.987G>C (rs12895357) im *ATXN3*-Gen genutzt, welcher mit dem mutanten *ATXN3* assoziiert ist. Mehr als 70% der PatientInnen und 100% der Tübinger Patientenkohorte tragen diesen Polymorphismus (Hauser et al., 2022). Für eine allel-spezifische Regulierung ist außerdem entscheidend, dass das wildtypische Allel und das mutante Allel verschiedene Nukleotide am SNP tragen. Dies ist in einem Großteil der Fälle möglich, da laut aktueller Literatur nur 2% der wildtypischen Allele den SNP G>C tragen, 98% also nicht reguliert werden sollten (Alves et al., 2010) (siehe auch Kapitel 1.1.4.1). Diese Tatsache wurde beim ASO-Design berücksichtigt, sodass eine ASO passend zum Polymorphismus des mutanten *ATXN3* (mutASO) und die andere passend zum wildtypischen Allel des *ATXN3* (wtASO) erstellt wurde (Hauser et al., 2022). Die einzelnen Versuchsschritte werden im Folgenden im Detail mit ihren Ergebnissen beschrieben.

### 3.3.1 Ergebnisse der Studie 1 zu den allel-unspezifischen ASOs

Zuerst sollen der Versuchsablauf sowie der Versuchsaufbau der Studie 1 gezeigt werden. Danach werden die Ergebnisse vor, während und kurz nach den Injektionen dargestellt. Daraufhin wird die Auswertung zur RNA-Expression des humanen *ATXN3*-Gens nach der Behandlung beschrieben.

#### 3.3.1.1 Ablauf der Studie 1

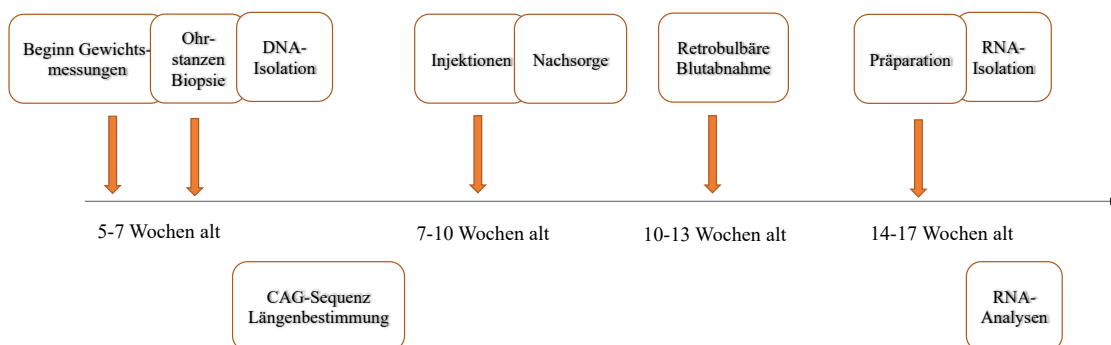


Abbildung 3.22 Zeitstrahl der in Studie 1 durchgeführten Versuche

## Ergebnisse

*Im Alter von 5-7 Wochen wurden die Tiere vom Jackson Laboratory nach Tübingen geliefert und in unsere Tierhaltung eingeschleust. Die Tiere erhielten eine Adaptationsphase an die neue Tierhaltung von zwei Wochen. Währenddessen wurde den Tieren eine Ohrstanze entnommen und daraus DNA isoliert. So konnten die Tiere genotypisiert und die Anzahl der CAG-Wiederholungen bestimmt werden. Im Alter von 7-10 Wochen erfolgten die Injektionen der verschiedenen ASOs mit der anschließenden Nachsorge. Im Alter von 10-13 Wochen wurde die retrobulbäre Blutentnahme durchgeführt, um nachträglich longitudinale Biomarker im Blut bestimmen zu können. Mit 14-17 Wochen wurden die Tiere schließlich präpariert und die Analysen der RNA-Expression zum humanen ATXN3 in verschiedenen Gehirnbereichen vorgenommen.*

Wie in Abbildung 3.22 zu erkennen ist, wurden die Versuchstiere im Alter von 5-7 Wochen von der Firma *Jackson Laboratory* geliefert. Direkt nach der Lieferung wurden die Mäuse zum ersten Mal gewogen und mit einer Ohrstanze versehen, um sie einerseits zu markieren und andererseits zu genotypisieren. Dafür wurde DNA aus der gewonnenen Stanze isoliert, die in eine Genotypisierungs-PCR und - bei positivem Befund - in die anschließende Fragmentlängenanalyse eingebracht wurde. Im Alter von 7-10 Wochen erfolgten dann die Injektionen der zu testenden ASOs mit anschließender Nachsorge. Drei Wochen später wurde den Tieren Blut aus dem retrobulbären Venenplexus abgenommen. Weitere drei Wochen später, also 6 Wochen nach den Injektionen, wurden die Tiere präpariert. Es wurden das Cerebellum, der Hirnstamm sowie der Frontale Cortex, das Rückenmark und der restliche Cortex gewonnen. Daraus wurde RNA isoliert, die in der qRT-PCR untersucht wurde. Die Kooperationsfirma hat aus den Gehirnregionen Protein isoliert und die Expression des ATXN3 bestimmt. Außerdem wurde das Herz, die Lunge, die Leber, die Niere, die Milz und ein Teil eines Skelettmuskels präpariert, welche die Firma auf Spuren der ASOs untersucht hat. Zusätzlich wurde CSF und peripheres Blut gewonnen, welches ebenfalls durch die Kooperationsfirma untersucht wurde.

### 3.3.1.2 Ergebnisse der Genotypisierung in Studie 1

Nachdem die Ohrstanzen gewonnen wurden, konnte daraus die DNA der Mäuse isoliert werden. Vom *Jackson Laboratory* war bereits der Genotyp aller Tiere als hemizygot für humanes *ATXN3* bzw. WT/YAC84Q bestimmt worden, dies sollte jedoch per PCR überprüft werden. Es stellte sich heraus, dass zwei der insgesamt 104 Versuchstiere nicht den angegebenen Genotyp aufwiesen, sondern reine Wildtyptiere waren. Diese sind in der Tabelle gelb hinterlegt. Alle anderen Tiere erwiesen sich als hemizygot YAC84Q-Mäuse und wurden anschließend mittels Fragmentlängenanalyse auf die Anzahl an CAG-

## Ergebnisse

Wiederholungen getestet. Daraus ergaben sich folgende CAG-Wiederholungslängen, die in Tabelle 3.6 angegeben sind.

MK stellt eine interne Bezeichnung dar, welche die Mäuse diesem Versuch zuordnet. Die Nummer dahinter bezeichnet die Zucht und danach die Nummer der Maus selbst. Maus MK 4.3 gehört beispielsweise zur Zucht 4 und ist die dritte Maus innerhalb dieser Gruppe. Die Mäuse wiesen nicht die zu erwartenden 84 Wiederholungen auf, sondern besaßen alle zwischen 71-79 Wiederholungen. Bei einigen wenigen wie beispielsweise der Maus mit der Nummer MK 13.1 lag die Anzahl auch unter 70, jedoch befanden sich bei allen Tieren über 60 Wiederholungen. Dies gilt laut aktueller Literatur als Grenzwert, ab welchem eine SCA3 im Laufe des Lebens ausgeprägt wird (Durr et al., 1996; Kawaguchi et al., 1994; Maciel et al., 1995)

*Tabelle 3.6 Längenbestimmung der CAG-Sequenz der Versuchstiere in Studie 1*

| Maus-Code | PolyQ-Länge | Maus-Code | PolyQ-Länge | Maus-Code | PolyQ-Länge | Maus-Code | PolyQ-Länge |
|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|
| MK 1.1    | 71-79       | MK 4.6    | 73-75       | MK 8.3    | 74-76       | MK 11.8   | 72-76       |
| MK 1.2    | WT-Tier     | MK 4.7    | 73-75       | MK 8.4    | 74-76       | MK 11.9   | 71-73       |
| MK 1.3    | 72-78       | MK 4.8    | 74-76       | MK 8.5    | 73-75       | MK 12.1   | 72+73       |
| MK 1.4    | 73-75       | MK 4.9    | 73-76       | MK 8.6    | 73-76       | MK 12.2   | 72-75       |
| MK 1.5    | 71-73       | MK 4.10   | 74-76       | MK 8.7    | 73-75       | MK 12.3   | 71-73       |
| MK 1.6    | 73-76       | MK 5.1    | 74-76       | MK 9.1    | 74-77       | MK 12.4   | 71-73       |
| MK 1.7    | 73-75       | MK 5.2    | 74+75       | MK 9.2    | 74-76       | MK 12.5   | 72+73       |
| MK 2.1    | 72-74       | MK 5.3    | 74+75       | MK 9.3    | 74-77       | MK 12.6   | 72-74       |
| MK 2.2    | 72-76       | MK 5.4    | 74-76       | MK 9.4    | 73-75       | MK 12.7   | 73-75       |
| MK 2.3    | 73-75       | MK 5.5    | 74-76       | MK 9.5    | 74-76       | MK 13.1   | 68+69       |
| MK 2.4    | 74-76       | MK 5.6    | 74-76       | MK 10.1   | WT-Tier     | MK 13.2   | 74+75       |
| MK 2.5    | 73-75       | MK 5.7    | 73-75       | MK 10.2   | 73-75       | MK 13.3   | 72-75       |
| MK 2.6    | 71-75       | MK 5.8    | 73-77       | MK 10.3   | 73-75       | MK 13.4   | 71-73       |
| MK 2.7    | 74-76       | MK 5.9    | 74-77       | MK 10.4   | 70-72       | MK 13.5   | 73-75       |
| MK 2.8    | 73+74       | MK 5.10   | 74+75       | MK 10.5   | 73+74       | MK 13.6   | 71-75       |
| MK 3.1    | 73-75       | MK 7.1    | 74-76       | MK 10.6   | 73-76       | MK 13.7   | 72-75       |
| MK 3.2    | 73-75       | MK 7.2    | 73-75       | MK 10.7   | 72-75       | MK 14.1   | 72-75       |
| MK 3.3    | 73-75       | MK 7.3    | 74-76       | MK 10.8   | 73+74       | MK 14.2   | 71+72       |
| MK 3.4    | 73+74       | MK 7.4    | 74+75       | MK 10.9   | 72-75       | MK 14.3   | 72-75       |
| MK 3.5    | 73-75       | MK 7.5    | 74-76       | MK 11.1   | 73-75       | MK 14.4   | 72-75       |
| MK 3.6    | 73-75       | MK 7.6    | 75-77       | MK 11.2   | 73-75       | MK 14.5   | 73-75       |
| MK 4.1    | 74+75       | MK 7.7    | 75-77       | MK 11.3   | 72-75       | MK 14.6   | 73-75       |
| MK 4.2    | 74-76       | MK 7.8    | 74-76       | MK 11.4   | 73-75       | MK 14.7   | 72-75       |
| MK 4.3    | 75+76       | MK 7.9    | 74-77       | MK 11.5   | 72-75       | MK 14.8   | 73-75       |
| MK 4.4    | 74-76       | MK 8.1    | 74-76       | MK 11.6   | 71-73       | MK 14.9   | 73-75       |
| MK 4.5    | 74-76       | MK 8.2    | 73-75       | MK 11.7   | 73-79       | MK 14.10  | 73-76       |

### 3.3.1.3 Aufbau der Studie 1

Tabelle 3.7 Übersicht der optimalen Aufteilung der Versuchstiere in Studie 1

| ASO            | Genotyp   | Konzentration<br>in µg | Anzahl<br>Tiere | ♂ | ♀ | Alter in<br>Wochen |
|----------------|-----------|------------------------|-----------------|---|---|--------------------|
| Saline         | WT/YAC84Q |                        | 6               | 3 | 3 | 7-8                |
| 1              | WT/YAC84Q | 10                     | 6               | 3 | 3 | 7-8                |
|                | WT/YAC84Q | 30                     | 6               | 3 | 3 | 7-8                |
|                | WT/YAC84Q | 100                    | 6               | 3 | 3 | 7-8                |
| 2              | WT/YAC84Q | 10                     | 6               | 3 | 3 | 7-8                |
|                | WT/YAC84Q | 30                     | 6               | 3 | 3 | 7-8                |
|                | WT/YAC84Q | 100                    | 6               | 3 | 3 | 7-8                |
| 3              | WT/YAC84Q | 10                     | 6               | 3 | 3 | 7-8                |
|                | WT/YAC84Q | 30                     | 6               | 3 | 3 | 7-8                |
|                | WT/YAC84Q | 100                    | 6               | 3 | 3 | 7-8                |
| 4              | WT/YAC84Q | 10                     | 6               | 3 | 3 | 7-8                |
|                | WT/YAC84Q | 30                     | 6               | 3 | 3 | 7-8                |
|                | WT/YAC84Q | 100                    | 6               | 3 | 3 | 7-8                |
| Roche          | WT/YAC84Q | 10                     | 6               | 3 | 3 | 7-8                |
|                | WT/YAC84Q | 30                     | 6               | 3 | 3 | 7-8                |
|                | WT/YAC84Q | 100                    | 6               | 3 | 3 | 7-8                |
| Random-<br>ASO | WT/YAC84Q | 100                    | 6               | 3 | 3 | 7-8                |
| Gesamt         |           |                        | 102             |   |   |                    |

Es wurden 4 verschiedene ASOs getestet, die alle das gesamte humane *ATXN3* regulieren sollten und nicht allel-spezifisch waren. Die Sequenz der ASOs sowie die Information, wo genau diese ASOs im *ATXN3* binden sollten, wurde uns von der beauftragenden Firma nicht zur Verfügung gestellt. Zur Überprüfung wurde eine Kontrollgruppe mit der Trägersubstanz, der Saline (NaCl), behandelt, welche später als Negativkontrolle (Erwartung: unveränderte Level der humanen Ataxin-3 RNA) verwendet wurde. Zudem wurde eine bekannterweise Ataxin-3 regulierende ASO von der Firma Roche (ASO ID A51\_1122\_67, geschützt durch Patent WO 2020/245233) als Positivkontrolle verwendet. Deren Sequenz ist bekannt und ebenfalls allel-unspezifisch. Außerdem wurde eine *Random*-ASO verwendet, die von der Kooperationsfirma zur Verfügung gestellt wurde und als Negativkontrolle eingesetzt wurde. Die Sequenz der ASO wurde uns nicht mitgeteilt, so dass wir keine endgültige Aussage zu potenziellen Targets oder sonstigen Eigenschaften einer typischen *Random*-ASO treffen können, sondern der Firma vertrauen müssen, dass die ASO die Kriterien einer *Random*-ASO erfüllt.

Tabelle 3.8 Übersicht der verwendeten Tiere in Studie 1

| ASO        | Genotyp   | Konzentration in µg | Anzahl Tiere | ♂ | ♀ | Alter in Wochen | Vorzeitig verstorbene Tiere |
|------------|-----------|---------------------|--------------|---|---|-----------------|-----------------------------|
| Saline     | WT/YAC84Q |                     | 6            | 4 | 2 | 9               | -                           |
| 1          | WT/YAC84Q | 10                  | 6            | 4 | 2 | 10              | -                           |
|            | WT/YAC84Q | 30                  | 6            | 4 | 2 | 8,5             | -                           |
|            | WT/YAC84Q | 100                 | 6            | 4 | 2 | 8               | -                           |
| 2          | WT/YAC84Q | 10                  | 6            | 5 | 1 | 9,5             | -                           |
|            | WT/YAC84Q | 30                  | 6            | 4 | 2 | 8,5             | -                           |
|            | WT/YAC84Q | 100                 | 6            | 5 | 1 | 7,5             | -                           |
| 3          | WT/YAC84Q | 10                  | 6            | 4 | 2 | 7               | -                           |
|            | WT/YAC84Q | 30                  | 6            | 4 | 2 | 9               | -                           |
|            | WT/YAC84Q | 100                 | 6            | 5 | 1 | 9               | -                           |
| 4          | WT/YAC84Q | 10                  | 6            | 4 | 2 | 7,5             | -                           |
|            | WT/YAC84Q | 30                  | 6            | 4 | 2 | 8               | 1                           |
|            | WT/YAC84Q | 100                 | 6            | 5 | 1 | 9               | 1                           |
| Roche      | WT/YAC84Q | 10                  | 6            | 4 | 2 | 8               | -                           |
|            | WT/YAC84Q | 30                  | 6            | 3 | 3 | 8,5             | -                           |
|            | WT/YAC84Q | 100                 | 7            | 5 | 2 | 9,5             | 1 nicht aus Narkose erwacht |
| Random ASO | WT/YAC84Q | 100                 | 6            | 2 | 4 | 8,5             | 1                           |
| Gesamt     |           |                     | 103          |   |   |                 |                             |

Vom *Jackson Laboratory* wurden jedoch 70 männliche und nur 34 weibliche Tiere zur Verfügung gestellt, daher wurden die Tiere wie in Tabelle 3.8 dargestellt aufgeteilt. Die Anzahl von 6 hemizygoten Tiere pro Gruppe konnte eingehalten werden, jedoch variierte die Verteilung zwischen den Geschlechtern. Auch beim Alter zum Zeitpunkt der Injektionen sind Unterschiede entstanden. Dies war dadurch bedingt, dass nicht alle Tiere am selben Tag geboren wurden sowie durch die Tatsache, dass nicht alle 102 Tiere an einem Tag operiert werden konnten, sondern die Injektionen über einen Zeitraum von zwei Wochen verteilt stattfanden. Für die Auswertung ergaben sich auch in der Anzahl kleine Unterschiede, da in manchen Gruppen ein Tier vorzeitig verstorben war (siehe Tabelle 3.9) und somit nicht präpariert und nicht auf eine Regulation des ATXN3 hin untersucht werden konnte.

## 3.3.1.4 Durchschnittlicher Gewichtsverlauf nach Geschlecht in Studie 1

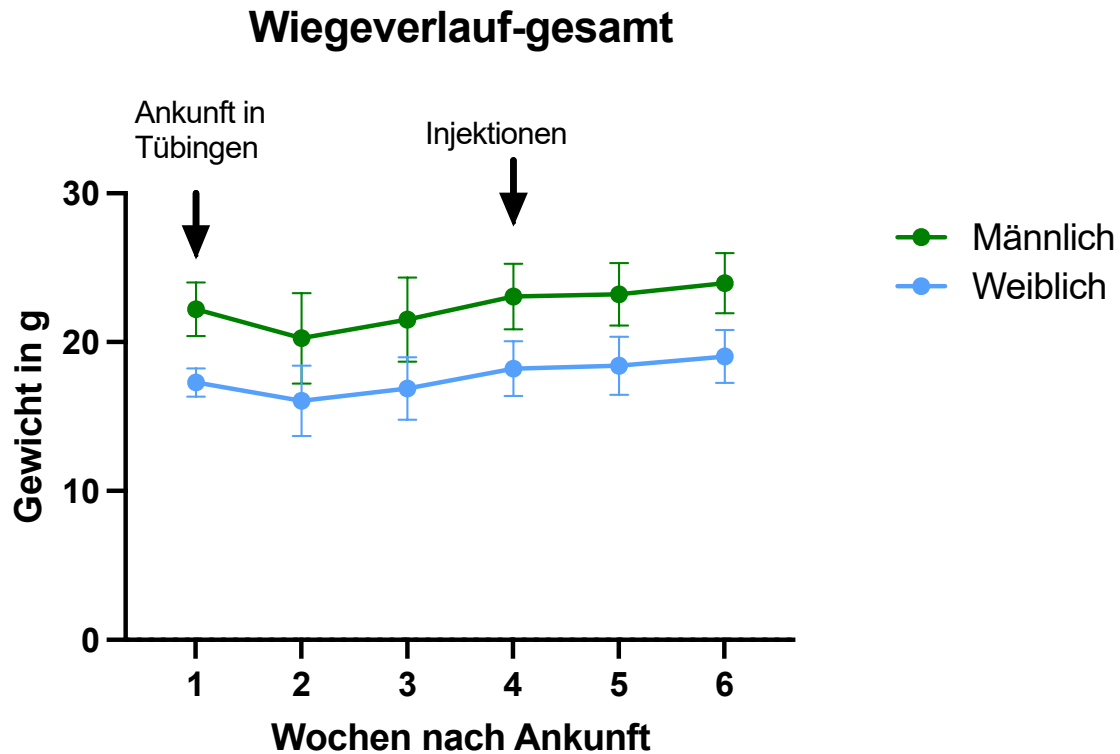


Abbildung 3.23 Gewichtsverlauf der YAC84Q-Mäuse in Studie 1

Auf der x-Achse sind die Wochen nach der Ankunft, auf der y-Achse das Gewicht in g aufgetragen. Die Daten wurden nach dem Geschlecht aufgeteilt. Es wurden 70 männliche sowie 34 weibliche Tiere einmal wöchentlich gewogen. Es zeigte sich, dass die Zeit einen hochsignifikanten Einfluss auf das Gewicht hatte ( $p < 0,0001^{****}$ ). Ebenso zeigte das Geschlecht einen hochsignifikanten Einfluss ( $p < 0,0001^{****}$ ) auf das Gewicht.

Da aus verschiedenen Studien bekannt ist, dass sowohl PatientInnen als auch Versuchstiere (Diallo et al., 2017; Saute et al., 2012) mit einer SCA3 einen Gewichtsverlust über die Zeit aufweisen, sollten die Mäuse jede Woche gewogen werden. Außerdem befanden sich die Tiere im Alter von 7-14 Wochen noch im Wachstum, was andererseits eine Gewichtszunahme erwarten ließ. Das Gewicht liefert Informationen über das Fressverhalten der Mäuse, welches im Zusammenhang mit dem Wohlbefinden der Tiere steht. Daher sollten über die regelmäßige Gewichtserhebung potenzielle Stressreaktionen erfasst werden, die beispielsweise durch den Transport oder die Injektionen bedingt sein konnten.

Insgesamt wurden 70 Männchen und 34 Weibchen gewogen, wovon jedoch 4 Männchen während des Versuches starben, also unvollständige Gewichtsverläufe besaßen. Die Daten wurden daher mittels *Mixed-Effects* Analyse statistisch berechnet, da eine Normalverteilung der Werte angenommen werden konnte. Die Zeit zeigte einen statistisch hochsignifikanten Einfluss auf das Gewicht ( $p < 0,0001^{****}$ ), was aufgrund des Alters der Tiere, die sich noch im Wachstum befanden, erwartet werden konnte. Auch das Geschlecht machte einen hochsignifikanten Unterschied aus ( $p < 0,0001^{****}$ ). Wie in Abbildung 3.23 zu sehen ist, zeigten die Tiere nach einem anfänglichen Gewichtsverlust in der ersten Woche in Tübingen eine stetige Gewichtszunahme. Zum Zeitpunkt der Injektionen ist in dieser Darstellung kein Gewichtsrückgang zu sehen. Dies könnte jedoch darauf zurückzuführen sein, dass die Gewichtsdaten nur wöchentlich erhoben wurden. Außerdem wurde je Zeitpunkt die gesamte Kohorte erfasst, wobei nur ein Teil dieser Tiere zum jeweiligen Zeitpunkt frisch operiert war. Daher wurden die Gewichtsdaten nach den Injektionen täglich erhoben und werden in den folgenden Kapiteln näher beleuchtet.

### 3.3.1.5 Postoperative Beobachtungen in Studie 1

#### 3.3.1.5.1 Postoperatives Überleben in Studie 1

Ein Anzeichen für eine starke Unverträglichkeit der injizierten Substanz, der Operationstechnik oder beidem zusammen, stellte das Versterben der behandelten Versuchstiere nach der Applikation dar. Ebenso konnten auch andere physische Veränderungen wie ein Gewichtsverlust, eine mangelnde oder übersteigerte Fellpflege oder apathisches Sozialverhalten Hinweise auf eine Unverträglichkeit sein. Natürlich konnten auch andere Ursachen dafür vorliegen, doch besonders bei einer Häufung innerhalb einer Versuchsgruppe sollte der Verdacht auf eine akute Toxizität entstehen. In Tabelle 3.9 findet sich eine Übersicht der Tiere, die während des Versuchs bzw. in den darauffolgenden Tagen verstorben sind oder unter Einbeziehung des *Score Sheets* (siehe Anhang Tabelle A) und dem Erreichen der im Tierversuchsantrag definierten Abbruchkriterien aus dem Versuch erlöst wurden.

Tabelle 3.9 Tierverluste in Studie 1

| ASO        | Toxizität                                  |
|------------|--------------------------------------------|
| Saline     | Kein Tier gestorben                        |
| 1          | Kein Tier gestorben                        |
| 2          | Kein Tier gestorben                        |
| 3          | Kein Tier gestorben                        |
| 4          | 2 Tiere am 2. Tag postoperativ gestorben   |
| Roche      | 1 Tier am 3. Tag postoperativ gestorben    |
| Random ASO | 1 Tier während Narkose/Operation gestorben |

Insgesamt war der Tierverlust erfreulicherweise sehr gering. Von den Versuchstieren, die mit der Kontrollsubstanz Saline bzw. mit den *ATXN3*-spezifischen ASOs 1, 2 und 3 behandelt wurden, überlebten alle die Injektionen und die darauffolgenden Tage. Aus der Versuchsgruppe, die ASO 4 erhielt, waren zwei Tiere in den Tagen nach der Injektion verstorben. Es handelte sich dabei um ein Tier aus der 30 µg Gruppe und ein Tier, welches 100 µg der ASO 4 erhalten hatte. Beide Tiere waren bereits am Tag vor dem Versterben apathisch und verhaltensauffällig im Gegensatz zu den anderen frisch operierten Tieren. Es wurde sich jeweils dafür entschieden, sie unter Schmerzmittelgabe weiter zu beobachten, leider erholten sie sich nicht aus dieser akuten Phase. In der 100 µg Gruppe der Positivkontroll-ASO von Roche gab es drei auffällige Tiere, von denen sich zwei jedoch gut erholten, während eine Maus im Verlauf sehr apathisch blieb und einen starken Tremor im gesamten Körper aufwies. Daher wurde sie am zweiten postoperativen Tag euthanasiert. In der Gruppe mit der *Random*-ASO, also der Negativkontroll-ASO, ist ein Tier bereits unter der Narkose bzw. Operation verstorben. Dies könnte eher mit den OP-Komplikationen begründet werden, als auf eine akute Toxizität hinzudeuten.

### 3.3.1.5.2 Postoperativer Gewichtsverlauf in Studie 1

In den drei Tagen nach den ASO-Injektionen wurde das Gewicht der Versuchstiere erfasst, um zu überprüfen, wie gut sie die Operation und die Narkose überstanden hatten. Es war auch interessant, ob sich Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen zeigten.

## Ergebnisse

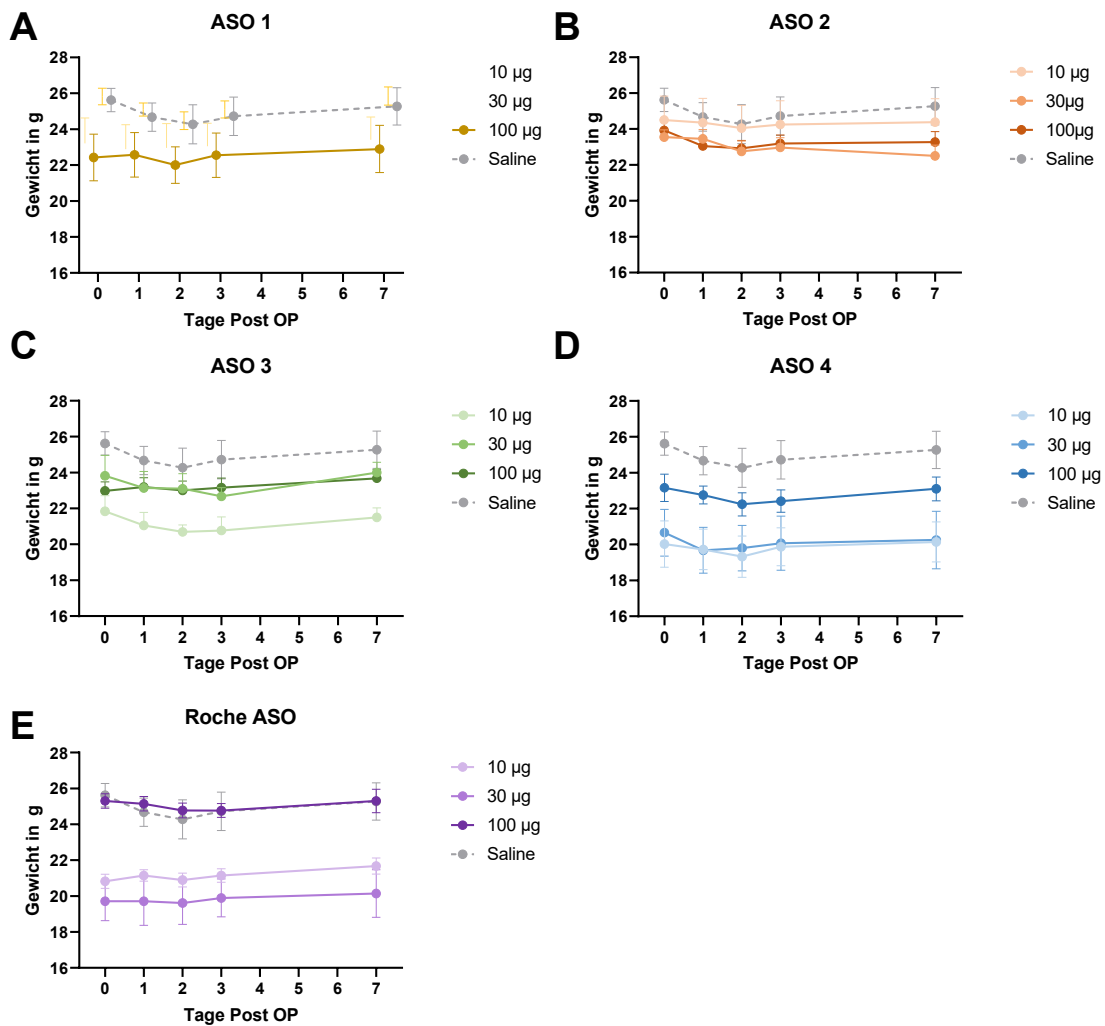


Abbildung 3.24 Postoperative Gewichtsverläufe in Studie 1

Auf der x-Achse befinden sich die postoperativen Tage. Auf der y-Achse wird das durchschnittliche Gewicht in g für die verschiedenen Versuchsgruppen angegeben. Die Tiere wurden am Operationstag sowie dem 1., 2., 3. und 7. Tag postoperativ gewogen. (A) Für ASO 1 zeigte sich ein hochsignifikanter Einfluss der Zeit auf das Gewicht ( $p < 0,0001^{****}$ ). Die Konzentration dagegen hatte keinen signifikanten Einfluss. (B) Für ASO 2 fand sich ebenfalls ein signifikanter Einfluss der Zeit auf das Gewicht ( $p = 0,0002^{**}$ ), während die Konzentration keinen signifikanten Einfluss hatte. (C) Ebenso verhielt es sich bei ASO 3. Die Zeit zeigte einen hochsignifikanten Einfluss auf das Gewicht ( $p < 0,0001^{****}$ ), während die Konzentration keinen signifikanten Einfluss hatte. (D) Für ASO 4 fiel der signifikante Einfluss der Zeit etwas geringer aus ( $p = 0,0043^{**}$ ), die Konzentration der ASO zeigte dafür einen leicht signifikanten Einfluss ( $p = 0,0434^{*}$ ). (E) Für die Positivkontroll-ASO von Roche zeigte sich ein signifikanter Einfluss der Zeit ( $p = 0,0008^{***}$ ).

Die Mäuse nahmen bei jeder ASO am ersten Tag postoperativ ab, erholten sich aber nach zwei bis drei Tagen und erreichten eine Woche nach der OP im Durchschnitt wieder ihr Ausgangsgewicht, wie in Abbildung 3.24 zu sehen ist. Die Werte wurden in allen

Gruppen als normalverteilt angenommen. Die statistische Analyse wurde für ASO 1 und ASO 2 mittels *TwoWay* ANOVA durchgeführt, da es dort keine fehlenden Werte gab. Für ASO 3, ASO 4 und die Roche-ASO wurden die Werte aufgrund einzelner verstorbener Tiere mittels *Mixed-Effects* Analyse untersucht.

Es zeigte sich, dass die Gewichtsveränderung bei jeder ASO signifikant von der Zeit abhing (ASO 1:  $p < 0,0001^{****}$ ; ASO 2:  $p = 0,0002^{**}$ ; ASO 3:  $p < 0,0001^{****}$ ; ASO 4:  $p = 0,0043^{**}$ ; Roche-ASO:  $p = 0,0008^{***}$ ), also den Tagen, die nach den Injektionen vergingen. Die unterschiedlichen ASO-Konzentrationen (10 µg, 30 µg und 100 µg) zeigten nur bei ASO 4 einen signifikanten Einfluss auf das Gewicht ( $p = 0,0434^{*}$ ), wobei das Signifikanzniveau deutlich unter dem für die Zeit lag. Dieser große Einfluss der Zeit passte zu einer akuten Belastung der Mäuse durch die Operationen. Von dieser erholten sie sich jedoch sehr gut und schnell. Dass die Konzentration und die jeweilige ASO selbst fast keinen Einfluss zu haben schien, war ein sehr erfreuliches Ergebnis.

### 3.3.1.5.3 Prozentuale Gewichtsänderungen in Studie 1

Während in Abbildung 3.24 nur die absolute Gewichtsveränderung dargestellt wurde, sollte auch die relative Änderung betrachtet werden. Diese wurde prozentual in Bezug auf ihr Ausgangsgewicht am Operationstag berechnet. Die relative Gewichtsveränderung war aussagekräftiger und vergleichbarer, da die Männchen und Weibchen signifikant unterschiedliche Ausgangsgewichte aufwiesen (siehe Kapitel 3.3.1.4) und eine ungleiche Verteilung der Geschlechter auf die Versuchsgruppen vorlag (siehe Tabelle 3.8). Die Ergebnisse der prozentualen Gewichtsänderungen sind in Abbildung 3.25 dargestellt. Statistisch wurde von einer Normalverteilung ausgegangen, die Werte von ASO 1 und ASO 2 wurden mittels *TwoWay* ANOVA berechnet, die Werte für ASO 3, ASO 4 und die Roche-ASO mittels *Mixed-Effects* Analyse. Insgesamt lässt sich auch für die relative Gewichtsänderung feststellen, dass vor allem die Zeit den entscheidenden Einfluss auf die Gewichtsveränderung zeigte (ASO 1:  $p < 0,0001^{****}$ , ASO 2:  $p = 0,0386^{*}$ , ASO 3:  $p < 0,0001^{****}$ , ASO 4:  $p < 0,0001^{****}$ , Roche-ASO:  $p = 0,0003^{***}$ ). Die Konzentration spielte bei der relativen Gewichtsveränderung nur bei der Kontroll-ASO von Roche eine Rolle ( $p = 0,0016^{**}$ ). Dies bestätigte insgesamt die Ergebnisse der absoluten Gewichtsveränderung, bei welcher auch die Zeit der Haupteinflussfaktor war.

## Ergebnisse

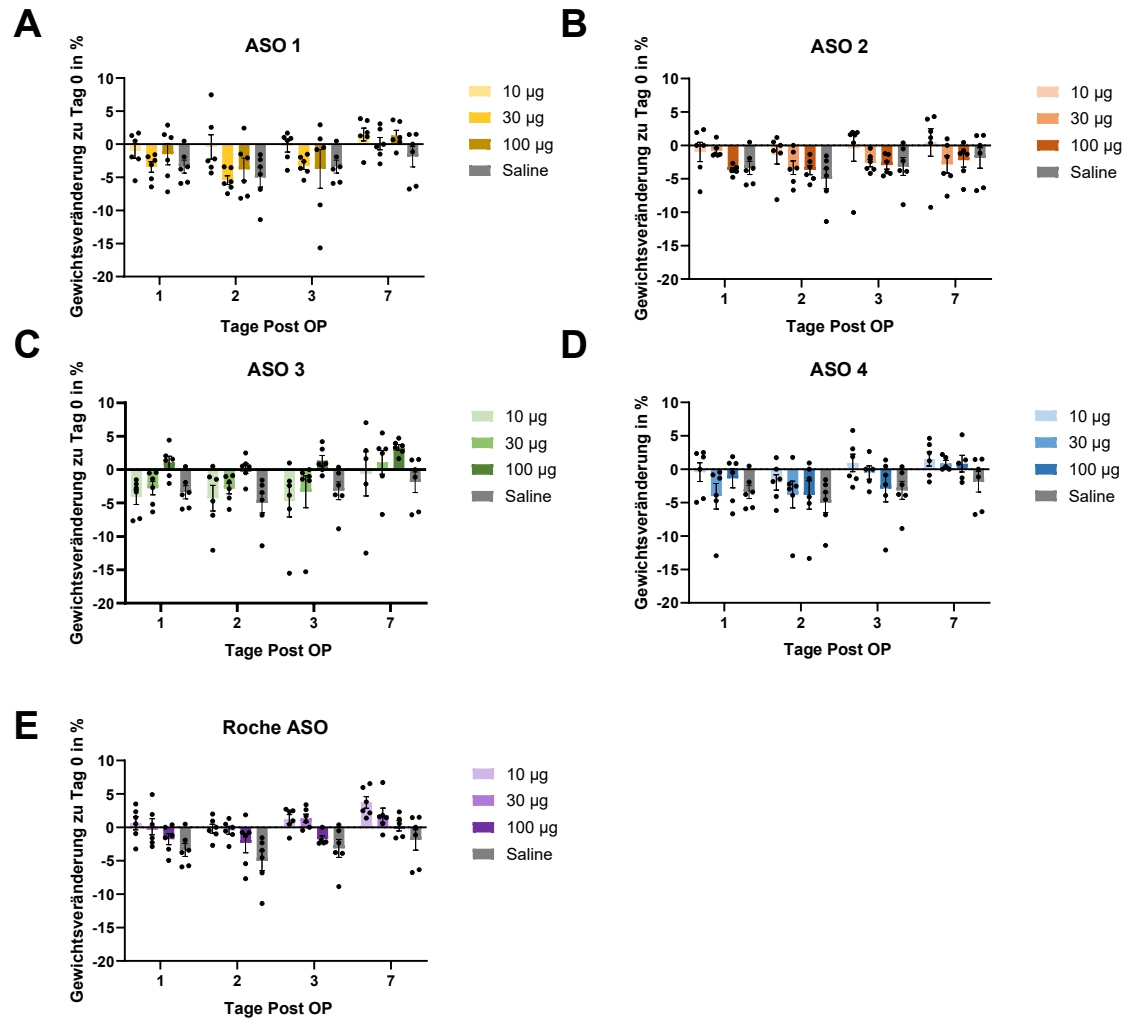


Abbildung 3.25 Prozentuale Gewichtsveränderungen in Studie 1

Auf der x-Achse befinden sich die postoperativen Tage. Auf der y-Achse wird die durchschnittliche Gewichtsänderung in % in Bezug auf das Ausgangsgewicht für die verschiedenen Versuchsgruppen angegeben. Die Tiere wurden am 1., 2., 3. und 7. postoperativen Tag gewogen. (A) Für ASO 1 zeigte sich ein hochsignifikanter Einfluss der Zeit auf das Gewicht ( $p < 0,0001$  \*\*\*\*). Die Konzentration hatte keinen signifikanten Einfluss. (B) Bei ASO 2 fand sich ein leicht signifikanter Einfluss der Zeit auf das Gewicht ( $p = 0,0386^*$ ), während die Konzentration keinen signifikanten Einfluss zeigte. (C) Ebenso verhielt es sich bei ASO 3. Die Zeit hatte einen signifikanten Einfluss auf das Gewicht ( $p < 0,0001$  \*\*\*\*), während die Konzentration keinen Einfluss zeigte. (D) Für ASO 4 fiel der signifikante Einfluss der Zeit ebenso hoch aus ( $p < 0,0001$  \*\*\*\*), die Konzentration der ASO zeigte entgegen der absoluten Gewichtsveränderung keinen signifikanten Einfluss. (E) Für die Positivkontroll-ASO von Roche zeigte sich sowohl ein signifikanter Einfluss der Zeit ( $p = 0,0003$  \*\*\*) als auch ein signifikanter Einfluss der Konzentration ( $p = 0,0016$  \*\*).

### 3.3.1.5.4 Punktzahl in der postoperativen Nachsorge in Studie 2

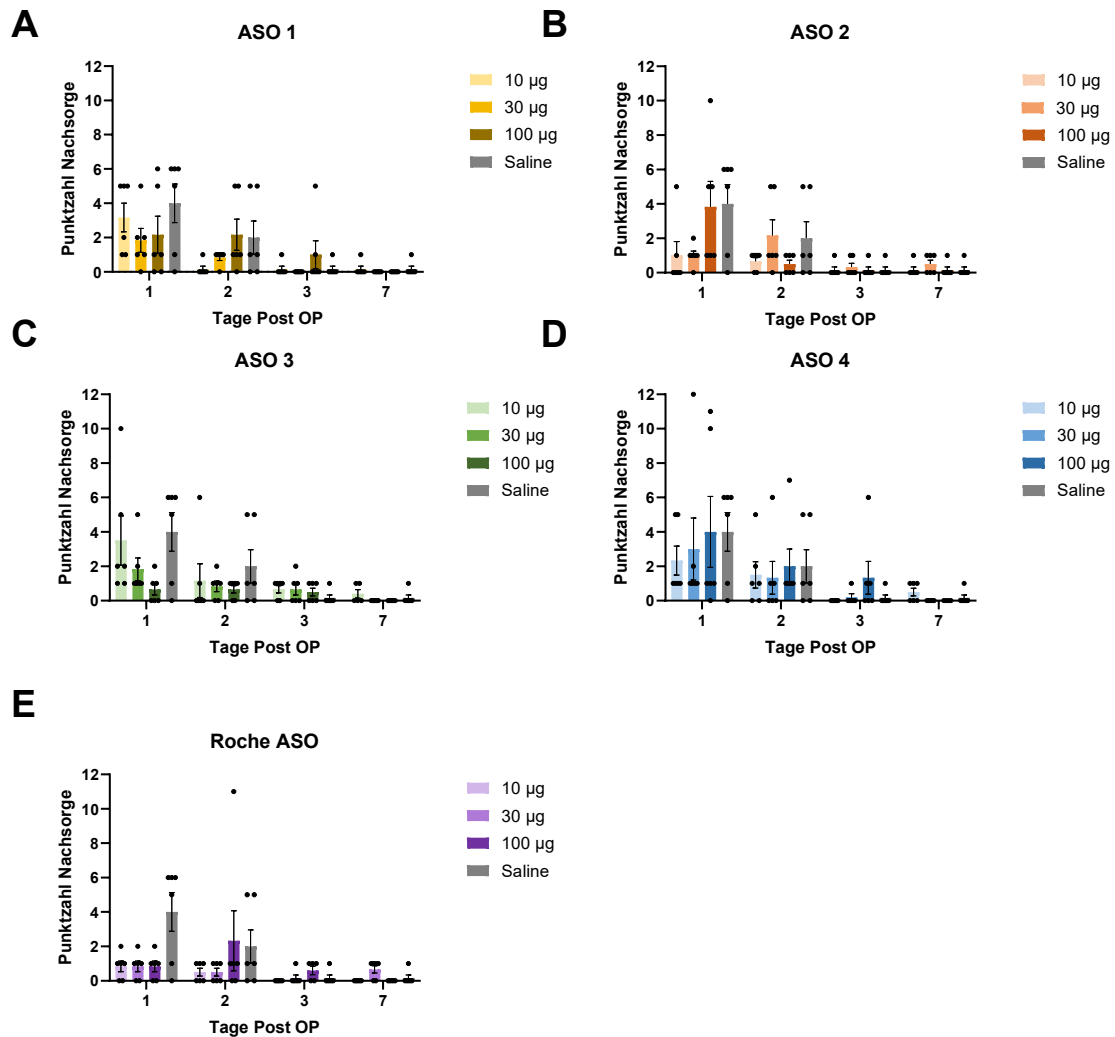


Abbildung 3.26 Ergebnisse des postoperativen Scores in Studie 1

Auf der x-Achse befinden sich die postoperativen Tage. Auf der y-Achse wird die erreichte Punktzahl für die verschiedenen Versuchsgruppen angegeben. **(A)** Für ASO 1 zeigte sich ein hochsignifikanter Einfluss der Zeit auf die erreichte Punktzahl ( $p < 0,0001^{****}$ ). Die Konzentration dagegen hat keinen signifikanten Einfluss. **(B)** Bei ASO 2 fand sich ebenfalls ein signifikanter Einfluss der Zeit auf die erhobene Punktzahl ( $p = 0,0007^{***}$ ), während die Konzentration keinen signifikanten Einfluss zeigte. **(C)** Bei ASO 3 hatte die Zeit einen signifikanten Einfluss auf die postoperative Punktzahl ( $p = 0,0002^{***}$ ) sowie die Konzentration einen leicht signifikanten Einfluss ( $p = 0,046^*$ ). **(D)** Für ASO 4 fällt der signifikante Einfluss der Zeit hoch aus ( $p = 0,0002^{***}$ ), die Konzentration der ASO zeigte keinen signifikanten Einfluss. **(E)** Für die Positivkontroll-ASO von Roche zeigte sich sowohl ein leicht signifikanter Einfluss der Zeit ( $p = 0,0152^*$ ), während auch die Konzentration einen signifikanten Einfluss zeigte ( $p = 0,026^*$ ).

In den postoperativen Tagen wurde nicht nur das Gewicht erhoben, sondern es wurde auch die Körperpflege, das Sozialverhalten sowie die Wunde beobachtet und beurteilt.

Daraus ergab sich ein *Score* (siehe Anhang Tabelle A), welcher zuvor im Tierversuchsantrag festgelegt wurde. Auch der *Score* sollte anzeigen, wie gut die Tiere die Injektionen vertragen hatten. Minimal waren 0 Punkte zu erreichen, was dem optimalen Ergebnis entsprach. Maximal hätten 40 Punkte erreicht werden können. Jedoch wurden zusätzlich die Abbruchkriterien und der humane Endpunkt bei 20 Punkten definiert, da bei einer solchen Punktzahl davon ausgegangen wurde, dass das verursachte Leid nicht mehr tolerierbar war. In Abbildung 3.26 sind die durchschnittlichen Punktzahlen nach ASOs und Konzentrationen aufgetragen. Die Daten konnten als normalverteilt angenommen werden. Sie wurden für ASO 1, ASO 2 und ASO 3 mittels *TwoWay* ANOVA, für ASO 4 und die Roche-ASO mittels *Mixed-Effects* Analyse ausgewertet. Auch für die postoperativ erhobene Punktzahl zeigte die Zeit den Haupteinfluss in allen Behandlungsgruppen (ASO 1:  $p < 0,0001^{****}$ , ASO 2:  $p = 0,0007^{***}$ , ASO 3:  $p = 0,046^*$ ,

ASO 4:  $p = 0,0002^{***}$ , Roche-ASO:  $p = 0,026^*$ ). Die ASO-Applikation wirkte sich also nicht nur auf das Gewicht, sondern auch auf das Sozialverhalten, die Körperpflege und das Abheilen der Wunde aus. Erfreulicherweise spielte die Konzentration der verabreichten ASO eine untergeordnete Rolle, da sie nur im Falle der ASO 3 und der Kontroll-ASO von Roche einen leicht signifikanten Einfluss aufwies ( $p = 0,046^*$  und  $p = 0,026^*$ ).

### 3.3.1.5.5 Wirehang-Test nach ASO-Applikation in Studie 1

Der *Wirehang*-Test stellte eine ergänzende Untersuchung dar, die die Kletter- bzw. Haltefähigkeit der Mäuse über Kopf am Gitter für maximal 5 Minuten überprüfen sollte. Es sollten durch die Operation entstandene neurologische Defizite ausgeschlossen werden. Allerdings war festzustellen, dass die Ergebnisse stark von einigen weiteren Faktoren wie beispielsweise der individuellen Motivation der Versuchstiere abhingen. Auch die Durchführung des Tests variierte stark zwischen den Tieren. Manche Mäuse suchten sich anfangs einen Platz, an welchem sie die 5 Minuten verharrten, während andere die gesamte Zeit kletterten und hangelten, wobei sie viel schneller abrutschen konnten. Dies lag eher nicht an einem neurologischen Defizit als vielmehr an der Risikobereitschaft oder Neugier der Maus. Manche Tiere ließen sich auch bewusst vom Gitter fallen, anstatt sich dort festzuhalten, da sie kein Interesse an der Aufgabe hatten. Auch dies war von

## Ergebnisse

einer neurologischen Schädigung zu differenzieren. In Abbildung 3.27 sind die durchschnittlichen Zeiten im *Wirehang*-Test, aufgeschlüsselt nach ASO und Konzentration, zu sehen.

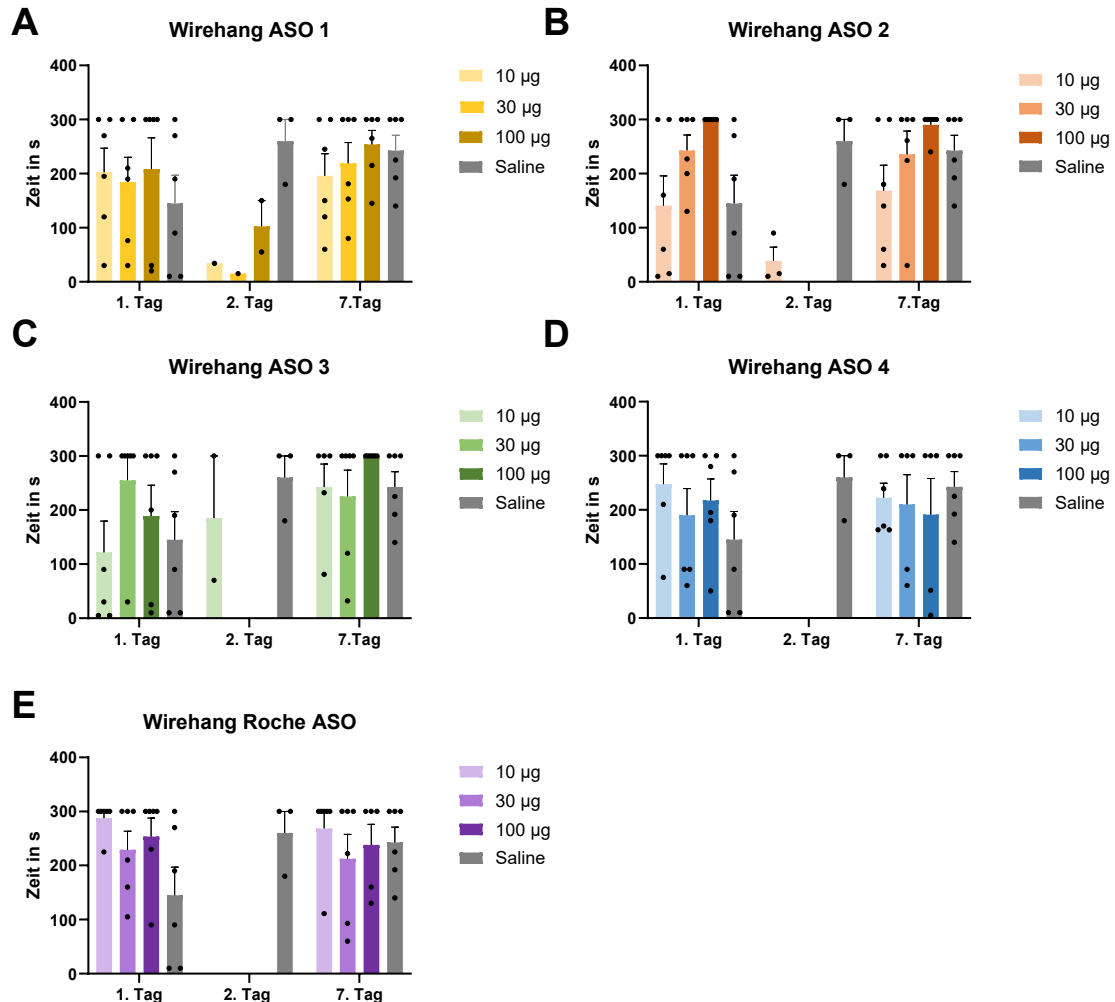


Abbildung 3.27 Ergebnisse des Wirehang-Tests in Studie I

Auf der x-Achse sind die postoperativen Tage aufgetragen. Alle Mäuse absolvierten den Test am 1. und 7. postoperativen Tag. Am 2. Tag wurde der Wirehang-Test für diejenigen Tiere wiederholt, die am ersten Tag nicht die volle Dauer schafften. Die maximale Dauer lag bei 5 min, also 300 s. (A) Für ASO 1 ergab sich weder für die Zeit noch für die Konzentration ein signifikanter Einfluss auf die Dauer des Wirehang. (B) Für ASO 2 konnte ebenfalls kein signifikanter Einfluss der Zeit auf die Dauer festgestellt werden. Es lag ein signifikanter Einfluss der Konzentration auf die Dauer ( $p=0,0066^{**}$ ) vor. (C) Für ASO 3 zeigte sich ein signifikanter Einfluss der Zeit auf die Dauer des Tests ( $p=0,0196^{*}$ ), während die Konzentration keinen signifikanten Einfluss hatte. (D) Für ASO 4 lag weder ein signifikanter Einfluss der Zeit noch der Konzentration auf die Dauer des Wirehang-Tests vor. (E) Ebenso war es bei der Kontroll-ASO von Roche.

## Ergebnisse

Die Daten konnten als normalverteilt angenommen werden und wurden für ASO 1 und ASO 2 mittels *TwoWay* ANOVA untersucht. Für ASO 3, ASO 4 und die Roche-ASO wurden die Werte mittels *Mixed-Effects* Analyse statistisch ausgewertet. Im Vergleich zwischen den ASOs zeigte sich, dass kaum signifikante Einflüsse auf die Dauer des *Wirehang*-Tests zu beobachten waren. Lediglich für ASO 2 hatte die Konzentration einen signifikanten Einfluss ( $p=0,0066^{**}$ ), während nur bei ASO 3 die seit der OP vergangene Zeit einen leicht signifikanten Einfluss zeigten ( $p=0,0196^{*}$ ).

Es stellte sich außerdem die Frage, wie aussagekräftig die Ergebnisse für diesen Test aufgrund der zuvor beschriebenen Einschränkungen sind. Generell ist festzuhalten, dass alle Versuchstiere, die den Test absolvierten, kein grobes neurologisches Defizit zu haben schienen. Die ASO-Applikation schien keine koordinatorischen Schäden ausgelöst zu haben.

### 3.3.1.6 Ergebnisse der Präparation in Studie 1

7 Wochen nach den Injektionen wurden alle Tiere präpariert. Dabei erfolgte parallel die Überprüfung auf potenzielle Gewebeauffälligkeiten, welche ebenfalls auf eine Unverträglichkeit der ASOs hinweisen konnten oder ein Übertreten in den Körperkreislauf anzeigten. Bei der Präparation konnten außer bei einer Maus keine Auffälligkeiten am Gehirn oder den peripheren Organen gefunden werden. Alle waren in Form, Größe und Farbe normal konfiguriert. Eine weibliche Maus aus der Behandlungsgruppe mit 30 µg der ASO 1 besaß eine Lunge, die deutliche rote Flecken aufwies, was beispielsweise zu einer Einblutung passen könnte. In den vorherigen postoperativen Beobachtungen und im Verlauf war diese Maus jedoch nie auffällig. Somit konnte eine Gewebetoxizität der applizierten ASOs nahezu ausgeschlossen werden. In Rücksprache mit der Kooperationsfirma ergab sich, dass die ASOs nicht in den peripheren Organen nachgewiesen wurden und das ZNS dementsprechend wahrscheinlich nicht verlassen hatten.

### 3.3.1.7 Ergebnisse der qRT-PCR in Studie 1

In der quantitativen *Real-Time* PCR wurden alle Proben auf eine Herunterregulation der RNA des *ATXN3*-Gens untersucht. Zur Quantifizierung wurden für jede Probe die beiden

Haushaltsgene Pdh und Sdha untersucht. Ferner wurde überprüft, ob das murine *Atxn3* auch durch die verwendeten ASOs reguliert wurde (Daten nicht gezeigt). Dabei wurden die Proben getrennt nach Hirnregion analysiert.

### 3.3.1.7.1 Ergebnisse der Proben aus dem Cerebellum

Da das Cerebellum als einer der Hauptpathogenese-Orte gilt, war hier am meisten Regulation des humanen *ATXN3* durch die ASOs zu erwarten und zu erhoffen. Die ASOs sollten das Cerebellum mithilfe der Liquorzirkulation erreichen.

In Abbildung 3.28 sind die Expressionslevel der Behandlungsgruppen in Relation zur Kontrollgruppe, die mit Saline behandelt wurde, dargestellt. Das Expressionslevel der Ataxin-3 RNA der Kontrollgruppe wurde als 1 und damit 100% definiert. Die Expressionslevel der Versuchsgruppen wurden auf den Wert der Saline-Gruppe normalisiert. Im Test auf Ausreißer fielen ein Wert in der Saline Gruppe und in der 30 µg Gruppe der ASO 4 auf, welche daher ausgeschlossen wurden. Die Ergebnisse mit Ausreißerwerten sind im Anhang (Abbildung A) zu finden. Da eine Normalverteilung der Daten angenommen werden konnte, wurden die Werte für ASO 1 und ASO 2 statistisch mittels *TwoWay* ANOVA, für ASO 3, ASO 4 und die Roche-ASO mittels *Mixed-Effects* Analyse untersucht. Es konnte für keine der ASOs eine signifikante Herunterregulation festgestellt werden. Auch optisch zeigte sich keine solche. Die Kontrollgruppe schien graphisch eine niedrigere Expression der RNA des Ataxin-3 aufzuweisen als die Behandlungsgruppen. Auch die Streuung der Einzelwerte innerhalb der Behandlungsgruppen fiel im Cerebellum größer aus als in den anderen Hirnbereichen (Abbildung 3.29 und 3.30). Da die Proben aus dem Cerebellum zuerst untersucht wurden, könnte dies mit anfänglichen Ungenauigkeiten der Methode zusammenhängen. Daher wurden die Folgeanalysen unverändert ausgeführt und zeigten gleichmäßigere Ergebnisse.

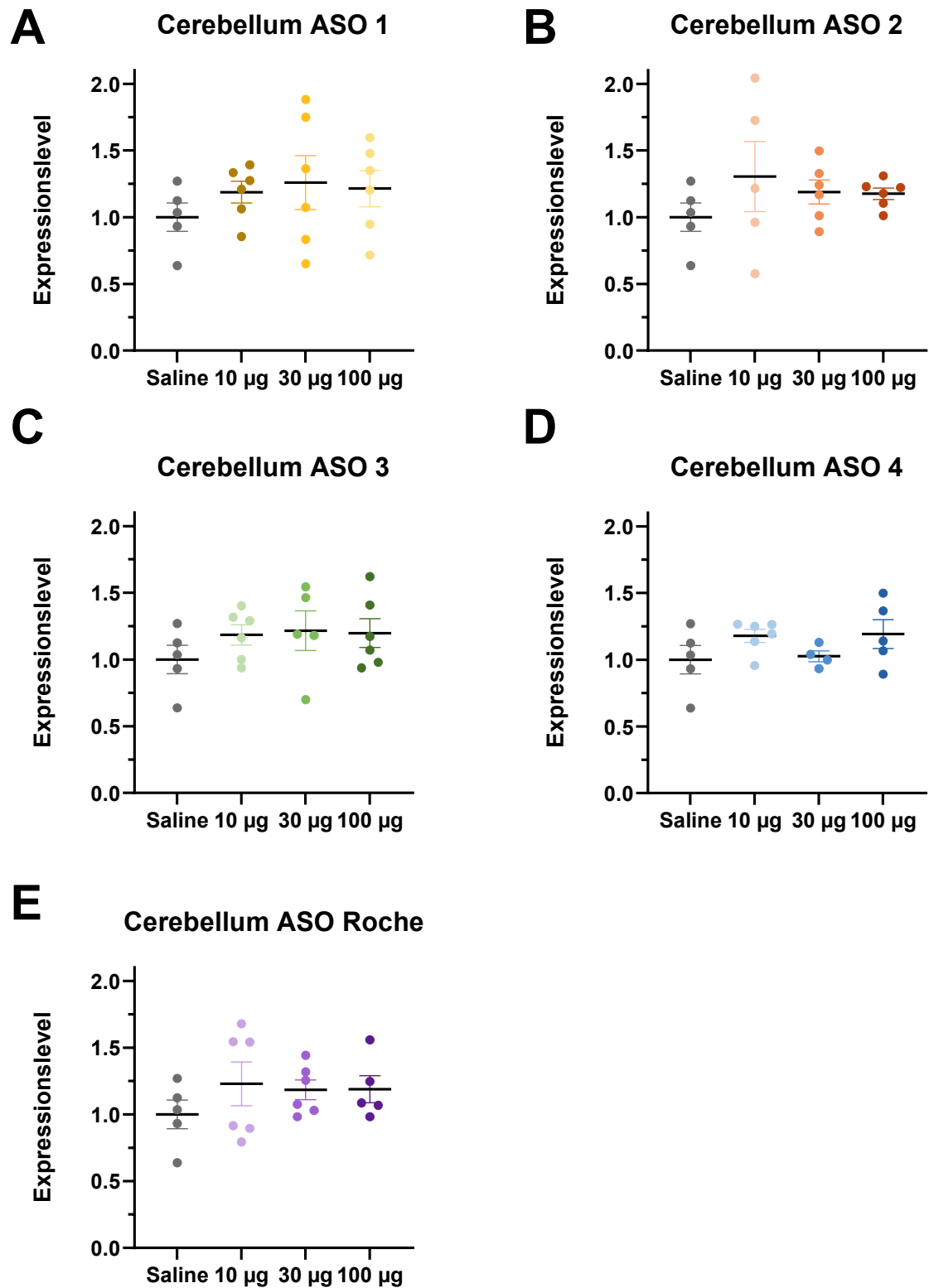


Abbildung 3.28 RNA-Expressionslevel des humAtaxin-3 im Cerebellum

Auf der x-Achse sind die drei Behandlungsgruppen mit den drei verschiedenen Konzentrationen sowie die Kontrollgruppe, die mit Saline behandelt wurde, aufgetragen. Auf der y-Achse wurde das Expressionslevel der Ataxin-3 RNA in Bezug auf die Kontrollgruppe ausgewertet. Der Wert

## Ergebnisse

*der Saline-Gruppe wurde als 1 definiert. Es werden der Mittelwert sowie die einzelnen Messwerte pro Gruppe dargestellt. Auch der Standardfehler ist eingezeichnet.*

*(A) Für ASO 1 zeigte sich weder ein signifikanter Einfluss der Behandlung noch der ASO-Konzentration auf das Expressionslevel der RNA für humanes ATXN3. (B) Ebenso sieht es bei ASO 2 aus. (C) Auch bei ASO 3 konnte weder die Behandlung noch die Konzentration der applizierten ASO eine signifikante Auswirkung erreichen. (D) Bei ASO 4 liegt dasselbe Ergebnis vor. (E) Für die Kontroll-ASO von Roche zeigte sich ebenfalls weder für die Behandlung noch für die Konzentration ein signifikanter Einfluss auf das Expressionslevel.*

### 3.3.1.7.2 Ergebnisse der Proben aus dem Hirnstamm

Anschließend wurden die RNA-Proben aus dem Hirnstamm quantifiziert. Auch den Hirnstamm sollten die ASOs mithilfe der Liquorzirkulation erreichen, um dort ihre Wirkung zu entfalten. Die Ergebnisse der Quantifizierung sind in Abbildung 3.29 zu finden. Da von einer Normalverteilung der Daten ausgegangen werden konnte, wurden die Daten für ASO 1 und ASO 2 mittels *TwoWay* ANOVA, für ASO 3, ASO 4 und die Roche-ASO aufgrund fehlender Werte mittels *Mixed-Effects* Analyse ausgewertet. Auch im Hirnstamm zeigten sich durch die Behandlung keine signifikanten Veränderungen der Expression der RNA des humanen *ATXN3-Gens*. Auch aus den Expressionszahlen ließ sich kein Trend ableiten, der eine Herunterregulation andeuten könnte. Die Streuung der einzelnen Werte fiel hier geringfügiger innerhalb der Gruppen aus, ebenso wurden keine Ausreißerwerte festgestellt.

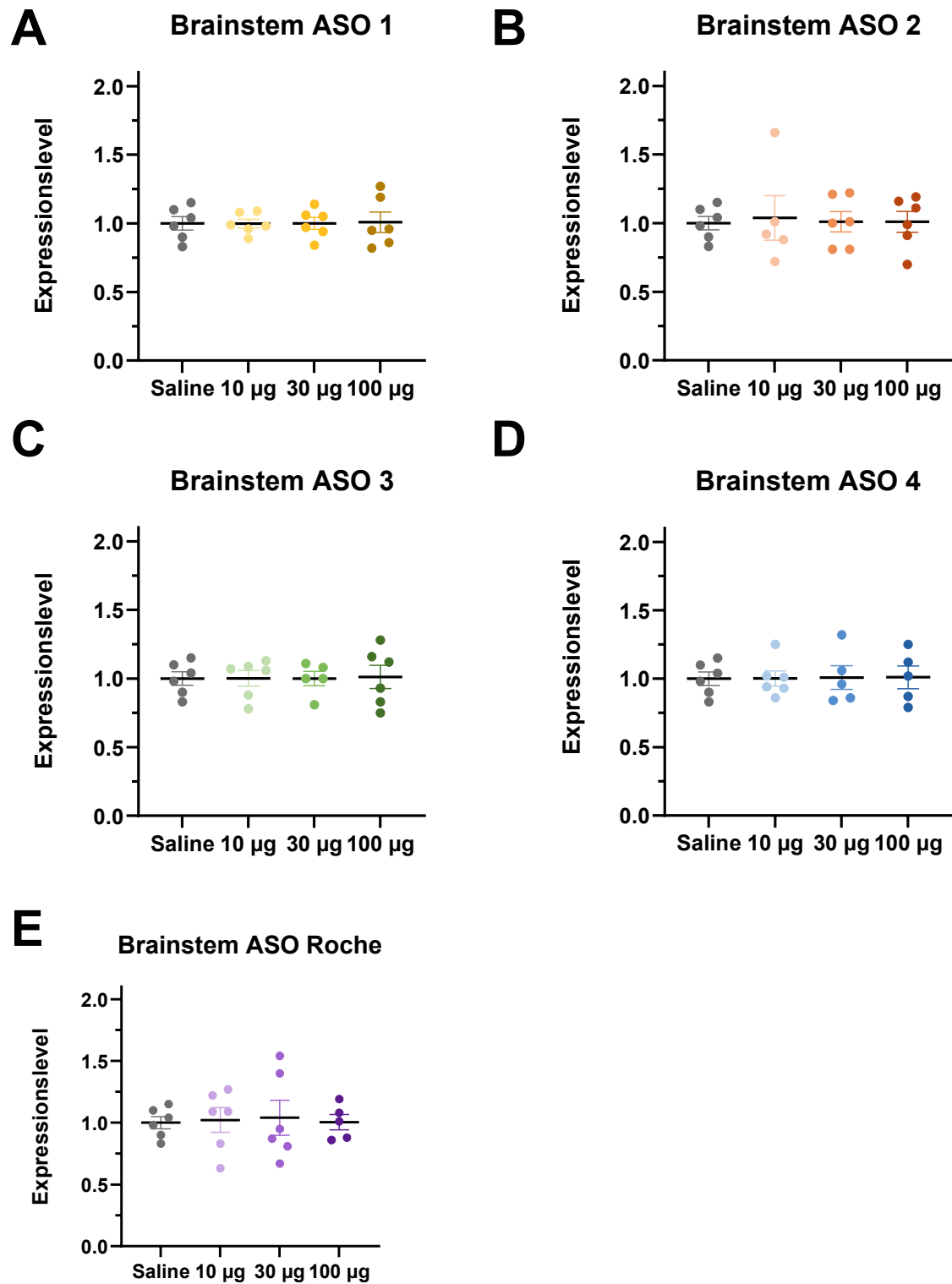


Abbildung 3.29 RNA-Expressionslevel des humAtaxin-3 im Hirnstamm

Auf der x-Achse sind die drei Behandlungsgruppen mit den drei Konzentrationen sowie die Kontrollgruppe, die mit Saline behandelt wurde, aufgetragen. Auf der y-Achse wird das Expressionslevel der RNA des ATXN3 in Bezug auf die Kontrollgruppe angegeben. Der Wert der

## Ergebnisse

*Saline-Gruppe wurde als 1 definiert. Es werden der Mittelwert sowie die einzelnen Messwerte pro Gruppe dargestellt. Auch der Standardfehler ist eingezeichnet.*

*(A) Für ASO 1 zeigte sich weder ein signifikanter Einfluss der Behandlung noch der ASO-Konzentration auf das Expressionslevel der RNA für humanes ATXN3. (B) Ebenso sah es bei ASO 2 aus. (C) Auch bei ASO 3 konnte weder die Behandlung noch die Konzentration der applizierten ASO eine signifikante Auswirkung erreichen. (D) Bei ASO 4 lag dasselbe Ergebnis vor. (E) Für die Kontroll-ASO von Roche zeigte sich ebenso weder für die Behandlung noch für die Konzentration ein signifikanter Einfluss auf das Expressionslevel.*

### 3.3.1.7.3 Ergebnisse der Proben aus dem Frontalen Cortex

Zuletzt wurden die Proben aus dem Frontalen Cortex untersucht. Hier finden sich die prämotorischen und motorischen Zentren, die für zielgerichtete Bewegungen sowie ein flüssiges Gangbild entscheidend sind. Die ASOs sollten durch die Liquorzirkulation in den Frontalen Cortex transportiert werden. In Abbildung 3.30 werden die Expressionslevel der untersuchten RNA-Proben dargestellt. Im statistischen Test auf Ausreißer fielen ein Wert in der 10 µg Gruppe der ASO 1 und ein Wert in der 30 µg Gruppe der ASO 3 auf, die daher ausgeschlossen wurden. Die Ergebnisse mit Ausreißerwerten sind im Anhang (Abbildung B) zu finden. Insgesamt fiel die Streuung der Einzelwerte im Frontalen Cortex gering aus. Es konnte die Normalverteilung der Daten angenommen werden, daher wurden die Werte für ASO 1 und ASO 2 mittels *TwoWay* ANOVA, die Werte für ASO 3, ASO 4 und die Roche-ASO wurden aufgrund fehlender Daten mittels *Mixed-Effects* Analyse untersucht. In der 10 µg Gruppe der ASO 1 zeigte sich eine prozentuale Reduktion der Expression um 16%, die keine statistische Signifikanz erreichen konnte. Für die anderen Konzentrationen entsprach das Expressionslevel der RNA des Ataxin-3 dem der Kontrollgruppe. Ebenso konnte für ASO 2, ASO 4 und die Roche-ASO keine statistisch signifikante Regulation der RNA des Ataxin-3 festgestellt werden. Wie graphisch zu erkennen ist, entspricht das Expressionslevel dem der Kontrollgruppe mit Saline. Für die ASO 3 konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Expressionslevel in der 30 µg Gruppe sowohl zur Kontrollgruppe ( $p=0,0411^*$ ) als auch zu den anderen beiden Behandlungsgruppen mit 10 µg ( $p=0,0479^*$ ) und 100 µg ( $p=0,0352^*$ ) festgestellt werden. Die Reduktion der RNA des ATXN3 erreichte 26% im Vergleich zur Kontrollgruppe.

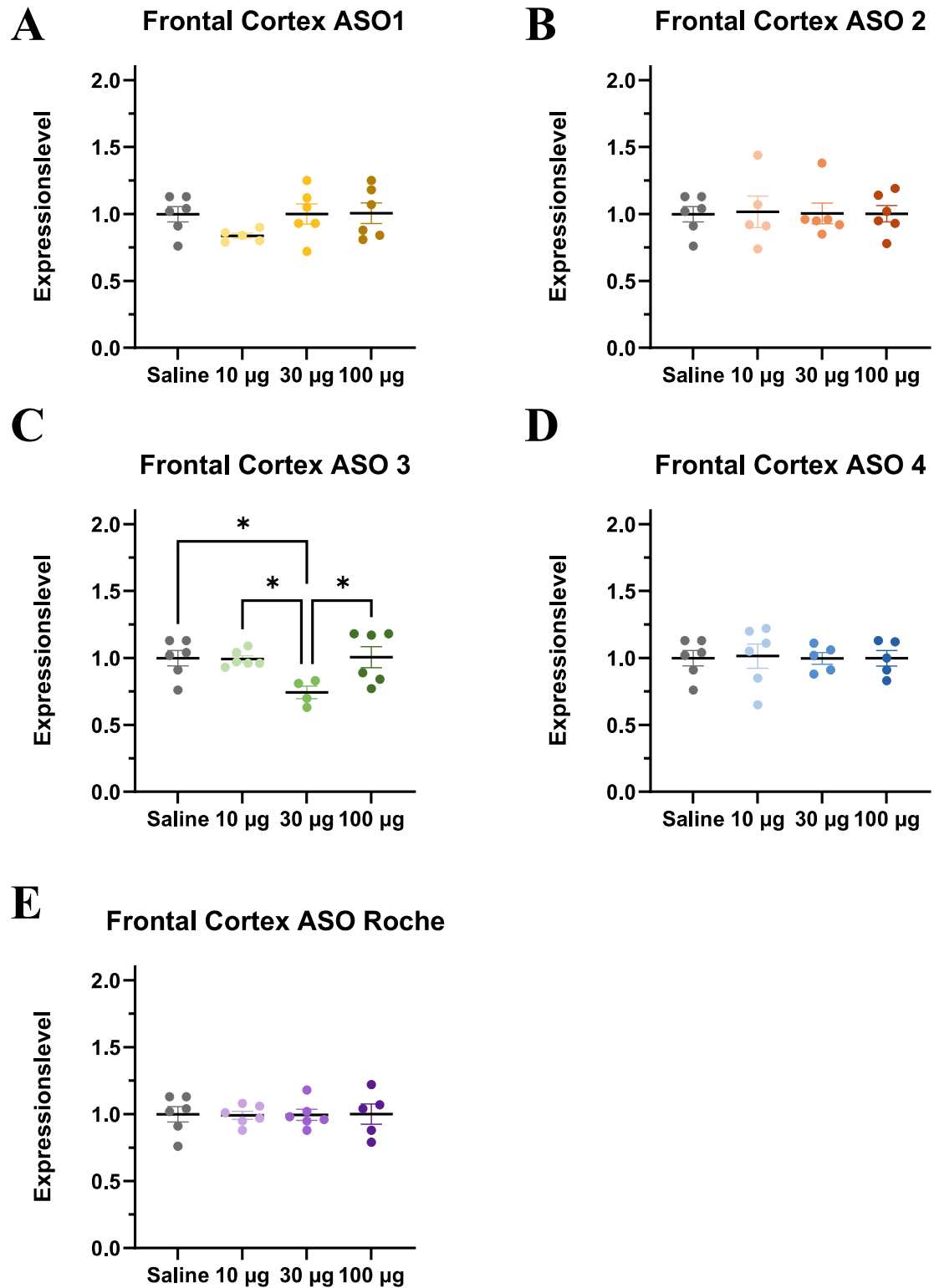


Abbildung 3.30 RNA-Expressionslevel des humAtaxin-3 im Frontalen Cortex

Auf der x-Achse sind die drei Behandlungsgruppen der drei Konzentrationen sowie die Kontrollgruppe, die mit Saline behandelt wurde, aufgetragen. Auf der y-Achse wird das Expressionslevel in Bezug auf die Kontrollgruppe angegeben. Der Wert der Saline-Gruppe wurde als 1 definiert. Es werden der Mittelwert sowie die einzelnen Messwerte pro Gruppe dargestellt.

*Auch der Standardfehler ist eingezeichnet. (A) In der 10 µg Gruppe der ASO 1 zeigt sich eine leichte Reduktion des Expressionslevels, diese erreicht keine statistische Signifikanz. Für die anderen beiden Konzentrationen zeigt sich kein Einfluss der Behandlung auf das Expressionslevel der RNA für humanes ATXN3. (B) Für ASO 2 zeigt sich weder ein Einfluss der Behandlung noch ein Unterschied zwischen den Konzentrationen bezüglich des Expressionslevels. (C) Bei ASO 3 ist eine Reduktion der Expression in der 30 µg Behandlungsgruppe zu erkennen. Diese erreichte statistische Signifikanz im Vergleich zum Expressionslevel der Kontrollgruppe ( $p=0,0411^*$ ) als auch zu den anderen beiden Behandlungsgruppen mit 10 µg ( $p=0,0479^*$ ) und 100 µg ( $p=0,0352^*$ ). Diese beiden Behandlungsgruppen zeigten keine veränderte Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe. (D) Bei ASO 4 lag keine Reduktion in den Behandlungsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe vor. (E) Für die Kontroll-ASO von Roche zeigte sich auch weder für die Behandlung noch für die Konzentration ein signifikanter Einfluss auf das Expressionslevel.*

### 3.3.1.8 Zusammenfassung Studie 1

In Tabelle 3.11 sind die Einflüsse je ASO auf das Gewicht, den Phänotyp der Maus nach der OP, die Überlebensraten sowie die potenzielle Herunterregulation der RNA des *Ataxin-3* zusammengefasst. Auffällige Ergebnisse sind in dicker Schrift markiert, um diese hervorzuheben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die ASOs gut vertragen wurden. Die meisten beobachteten Auffälligkeiten zum Gewicht sowie dem Phänotyp konnten ebenso in der Kontrollgruppe festgestellt werden, schienen also im Zusammenhang mit dem OP-Verfahren zu stehen. Lediglich für ASO 3 schien eine leicht signifikante konzentrationsabhängige Unverträglichkeit vorzuliegen, die sich im *Score* sowie in einer relativen Gewichtsabnahme zeigte. Was die Mortalität angeht, so sind in der Behandlungsgruppe mit ASO 4 insgesamt zwei von 18 Tieren sowie eins der 6 Tiere, die mit der Roche-ASO behandelt wurden, verstorben. Wie gewünscht regulierte keine der ASOs die RNA des murinen *Atnx3* (Daten nicht gezeigt). Die RNA des humanen ATXN3 wurde im Cerebellum und im Hirnstamm durch keine der ASOs reguliert. Im Frontalen Cortex zeigte sich in der 10 µg Gruppe der ASO 1 eine Reduktion um 16%, die jedoch keine statistische Signifikanz erreichte. ASO 3 zeigte im Frontalen Cortex eine statistisch signifikante Regulation der RNA des humanen ATXN3 um 26% in der 30 µg Gruppe. Die anderen ASOs erreichten auch im Frontalen Cortex keine Regulation der Expression der RNA des humanen ATXN3.

## Ergebnisse

*Tabelle 3.10 Übersicht der Ergebnisse der Studie 1.*

| ASO                            | Gewicht                                                                                         | Phänotyp                                                                                | Toxizität                             | Regulation der <i>Ataxin-3</i> RNA                                               |
|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| Saline<br>(Kontrollgruppe)     | <b>Einfluss durch OP-Verfahren</b>                                                              | <b>Einfluss durch OP-Verfahren</b>                                                      | Kein Tier gestorben                   | Keine                                                                            |
| 1                              | Kein erhöhter Einfluss im Vergleich zur Kontrollgruppe                                          | Kein erhöhter Einfluss im Vergleich zur Kontrollgruppe                                  | Kein Tier gestorben                   | Reduktion im Frontalen Cortex in der 10 µg Gruppe ohne Erreichen von Signifikanz |
| 2                              | Kein erhöhter Einfluss im Vergleich zur Kontrollgruppe                                          | Kein erhöhter Einfluss im Vergleich zur Kontrollgruppe                                  | Kein Tier gestorben                   | Keine                                                                            |
| 3                              | Kein erhöhter Einfluss im Vergleich zur Kontrollgruppe                                          | <b>Leicht signifikanter Einfluss der ASO-Konzentration auf den postoperativen Score</b> | Kein Tier gestorben                   | <b>Signifikante Reduktion im Frontalen Cortex in der 30 µg Gruppe</b>            |
| 4                              | Kein erhöhter Einfluss im Vergleich zur Kontrollgruppe                                          | Kein erhöhter Einfluss im Vergleich zur Kontrollgruppe                                  | <b>2 Tiere nach 2 Tagen gestorben</b> | Keine                                                                            |
| Roche                          | <b>Leicht signifikanter Einfluss der ASO-Konzentration auf die relative Gewichtsveränderung</b> | Kein erhöhter Einfluss im Vergleich zur Kontrollgruppe                                  | <b>1 Tier nach 3 Tagen verstorben</b> | Keine                                                                            |
| Random ASO<br>(Kontrollgruppe) | Kein erhöhter Einfluss im Vergleich zur Kontrollgruppe                                          | Kein erhöhter Einfluss im Vergleich zur Kontrollgruppe                                  | 1 Tier während Narkose verstorben     | Keine                                                                            |

### 3.3.2 Ergebnisse der Studie 2 zu den allel-spezifischen ASOs

In der Studie zu den allel-spezifischen ASOs wurden zwei ASOs untersucht, die über einen Polymorphismus jeweils nur ein Allel (mutant oder wildtypisch) des humanen *ATXN3* regulieren sollten. Zuerst wird der Studienablauf sowie Studienaufbau gezeigt, um dann auf den Mechanismus der Allel-Spezifität einzugehen. Anschließend werden die Ergebnisse der verschiedenen Teilversuche dargestellt.

#### 3.3.2.1 Ablauf der Studie 2

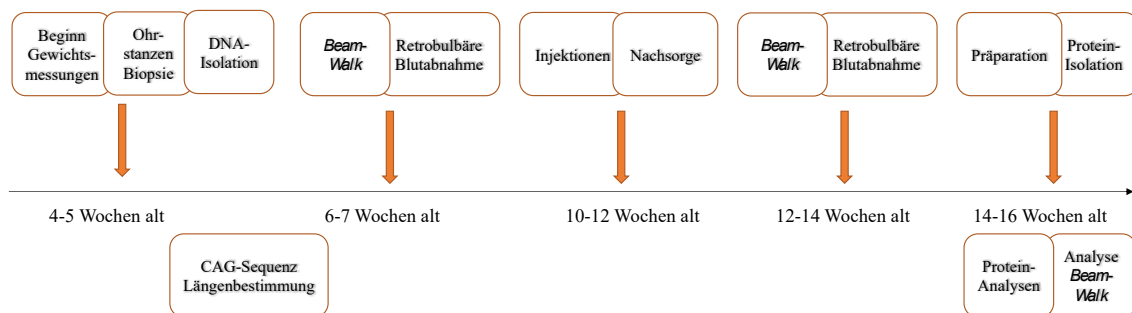


Abbildung 3.31 Zeitstrahl der in Studie 2 durchgeführten Versuche

Im Alter von 4-5 Wochen wurden den Tieren die Ohrstanzen entnommen und daraus DNA isoliert. So konnten die Tiere genotypisiert und gegebenenfalls die Anzahl der CAG-Wiederholungen analysiert werden. Im Alter von 6-7 Wochen fand die erste Blutentnahme sowie die erste Aufzeichnung des Beam-Walks statt. Mit 10-12 Wochen erfolgten dann die Injektionen mit Nachsorge, sodass im Alter von 12-14 Wochen die zweite Blutentnahme und zweite Aufzeichnung des Beam-Walks stattfinden konnte. Nach weiteren 2 Wochen erfolgte die Präparation des Gehirns und der Organe sowie die Analyse der Expressionslevel des *ATXN3*-Proteins im Cerebellum.

Der chronologische Ablauf der Studie 2 zu den allel-spezifischen ASOs ist in Abbildung 3.31 zu sehen. Die hemizygoten YAC84Q-Mäuse wurden für den Versuch selbst in der Tierhaltung Tübingen aus wildtypischen Muttertieren und hemizygoten transgenen Vatertieren gezüchtet. Im Alter von 4-5 Wochen wurden Ohrstanzen der Jungen gewonnen, um daraus DNA zu isolieren und die Tiere zu genotypisieren, da die Jungtiere die beiden möglichen Genotypen WT/WT bzw. WT/YAC84Q haben konnten. So wurden die Tiere den verschiedenen Kontroll- bzw. Behandlungsgruppen zugeordnet. Bei den Proben, die das humane *ATXN3* trugen, wurde die CAG-Wiederholungsanzahl mittels Fragmentlängenanalyse bestimmt. Im Alter von 6-7 Wochen wurden die transgenen Versuchstiere sowie wildtypischen Kontrollen im *Beam-Walk* auf ihr Gangbild hin

analysiert sowie aus dem retrobulbären Venenplexus Blut abgenommen. Aufgrund von Verzögerungen fanden die Injektionen mit anschließender Nachsorge erst im Alter von 10-12 Wochen statt. Nach weiteren zwei Wochen wurden der *Beam-Walk* sowie die retrobulbäre Blutentnahme wiederholt, um die Werte *prä-* und *post-injectionem* vergleichen zu können. Die Präparation des Gehirns, aufgeteilt in Cerebellum, Hirnstamm und Frontaler Cortex sowie den Haupt-Stoffwechselorganen Leber und Niere erfolgte 4 Wochen nach den Injektionen im Alter von 14-16 Wochen.

### 3.3.2.2 Wirkprinzip der allel-spezifischen ASOs in Studie 2

In der zweiten Studie wurden allel-spezifische ASOs verwendet. Die ASO, die den SNP c.987C>G bindet, der mit dem wildtypischen Allel vergesellschaftet ist, wird im Verlauf als wtASO bezeichnet. Die ASO, die den Polymorphismus c.987G>C (rs12895357) bindet, welcher mit dem mutanten *ATXN3* vergesellschaftet ist, wird als mutASO abgekürzt. Ein Überblick über die Funktionsweise der allel-spezifischen ASOs findet sich in Abbildung 3.32.

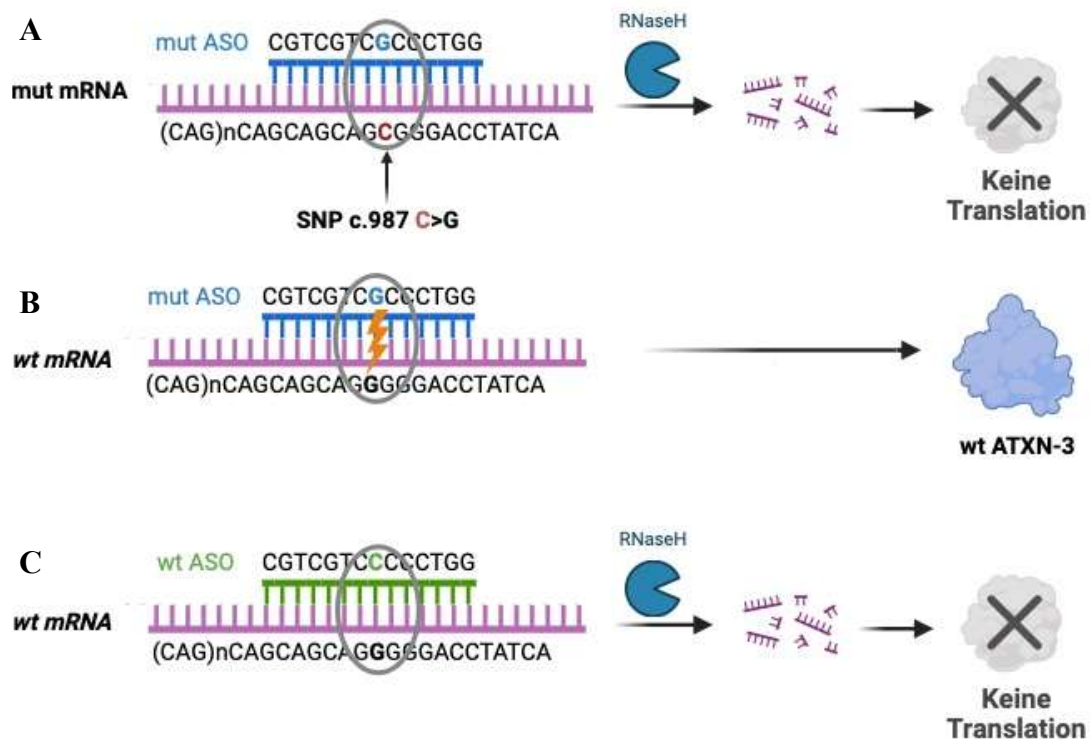


Abbildung 3.32 Funktionsweise der allel-spezifischen ASOs

*In der Abbildung erkennt man vereinfacht dargestellt die Funktionsweise der allel-spezifischen ASOs. Diese nutzen den bekannten SNP (c.987 G>C), welcher mit dem mutanten ATXN3 vergesellschaftet ist. Die ASO-Sequenz soll genau im Bereich binden, in welchem auch der SNP liegt. (A) So entsteht im Falle der mutASO eine passende Bindung mit der mutanten Ataxin-3 mRNA, sodass diese durch die RNase abgebaut werden kann. (B) Im Falle der wildtypischen RNA dagegen findet sich ein Mismatch mit der mutASO. Dieses Allel wird nicht reguliert und das wildtypische ATXN3 wird weiterhin exprimiert. (C) Zur Kontrolle wurde eine ASO designt, wtASO genannt, die das wildtypische Allel binden soll. Diese bindet den SNP, der mit dem wildtypischen ATXN3 vergesellschaftet (c.987 C>G) ist und reguliert so die Expression des wildtypischen ATXN3, jedoch nicht das mutante ATXN3. Die Abbildung wurde mithilfe von Biorender.com erstellt.*

### 3.3.2.3 Toxizitätsstudie

Da die allel-spezifischen ASOs der Studie 2 bisher nur *in vitro* untersucht worden waren (Hauser et al., 2022), sollten sie in wildtypischen Tieren auf ihre Toxizität *in vivo* getestet werden, bevor die tatsächlichen Versuchstiere damit behandelt wurden. Als Konzentration wurde die ursprünglich höchste zu untersuchende Konzentration von 150 µg gewählt. Es wurden zwei wildtypische Weibchen im Alter von 8,5 Wochen mit 150 µg der mutASO behandelt. Einem Wildtypweibchen im selben Alter wurden 150 µg der wtASO injiziert. Der Ablauf war analog zu den Injektionen der Studie 1, jedoch wurden andere Koordinaten verwendet, um spezifischer den Liquor-gefüllten Ventrikel zu erreichen (siehe Kapitel 2.2.1.5). Die Mäuse wurden zuerst narkotisiert, daraufhin erfolgte das Aufsuchen der Koordinaten, an welchen ein kleines Loch in den Schädel gebohrt wurde, um dadurch mit der Hamilton Spritze die ASO in gewünschter Konzentration zu injizieren. Es wurde bilateral injiziert. Nach Erfolgen der Injektionen, wurde die Haut über den Einstichstellen genäht und das Narkoseantidot verabreicht. Die Maus wurde unter Rotlicht gelegt, um einem Wärmeverlust vorzubeugen. Das Aufwachen wurde genau beobachtet und dokumentiert.

Im direkten Anschluss an die Operationen zeigten sich Koordinationsschwierigkeiten bei beiden Mäusen, die die mutASO erhalten hatten. Sie fielen vermehrt auf die Seite und waren sehr apathisch. Eine der beiden Mäuse wachte nicht richtig aus der Narkose aus, auch nicht, nachdem sie zusätzliches Antidot erhalten hatte. Daher musste sie ca. 1,5 Stunden nach der Injektion eingeschläfert werden. Die anderen beiden Mäuse (einmal wtASO und einmal mutASO) wurden am folgenden Tag anhand des *Scoresheets* (siehe Anhang Tabelle B) eingeschätzt. Die Maus, die die mutASO erhalten hatte, erzielte eine Punktzahl von 20, da sie sich isoliert hatte und vollkommen lethargisch war. Außerdem hatte sie sich nicht geputzt. Die Wunde sah gut aus und sie hatte kein Gewicht verloren.

Aufgrund des dennoch sehr schlechten Zustandes wurde auch diese Maus eingeschläfert. Die Maus mit der wtASO dagegen hatte sich bereits gut erholt. Sie zeigte ein normales Sozialverhalten und hatte sich geputzt, sodass nur noch wenige Reste der Augensalbe im Fell zu sehen waren. Sie hatte etwas an Gewicht verloren, weshalb sie weiter mit Nassfutter versorgt wurde. Außerdem erhielt sie 25 µL Metacam oral zur Analgesie. Im *Wirehang*-Test erreichte sie 5 Minuten. An den beiden folgenden Tagen hatte sie einen *Score* von 0 und blieb beim *Wirehang*-Test weiter bei 5 Minuten, sodass sie die wtASO scheinbar gut vertragen hatte. Eine Woche nach der Injektion erfolgte die Präparation der Maus für potenzielle Untersuchungen bzw. als Vergleichswert zu den Tieren, die später mit den Injektionen behandelt werden sollten.

Folglich war davon auszugehen, dass die wtASO ähnlich verträglich war wie die in Studie 1 getesteten ASOs. Wichtig zu erwähnen ist, dass die wtASO für das humane wildtypische *ATXN3* entwickelt ist, sodass in einer wildtypischen Maus, welche nur ihr endogenes wildtypisches *Atxn3* besitzt, keine Bindung zu erwarten ist.

Die mutASO in der Konzentration von 150 µg dagegen schien akut toxisch zu sein, wobei die Ursache diskutiert werden muss, da der einzige Unterschied zwischen den beiden ASOs in einer Base Guanin in der mut ASO im Vergleich zur Base Cytosin in der wtASO liegt (Hauser et al., 2022).

### 3.3.2.4 Genotypisierung der Jungtiere in Studie 2

Da die Versuchstiere der 2. Studie selbst gezüchtet wurden, mussten die Jungtiere, die von wildtypischen Muttertieren und hemizygoten YAC84Q-Vatertieren abstammten, genotypisiert werden. Dafür wurden ihnen Ohrstanzen entnommen, aus welchen DNA isoliert wurde. Diese wurde daraufhin mit der Genotypisierungs-PCR untersucht. Die Proben, die Amplifikationsprodukte zeigten, wurden anschließend in der Fragmentlängenanalyse auf ihre CAG-Wiederholungsanzahl analysiert. Die Kohorte bestand aus 39 Jungtieren, deren Genotypen wie in Tabelle 3.12 zu erkennen verteilt lagen. Ebenfalls ist dort für die bestätigten hemizygoten YAC84Q-Mäuse die Anzahl der mutanten CAG-Wiederholungen abzulesen. Anstatt der ursprünglich anzunehmenden 84 CAG-Wiederholungen wiesen alle Tiere zwischen 72-75 Wiederholungen auf. Bei zwei Jungmäusen wurde die Fragmentlängenanalyse nicht mehr durchgeführt, da sie (wahrscheinlich aufgrund eines Ileus oder einer Darmischämie) bereits vor dem

## Ergebnisse

eigentlichen Versuch, während die Genotypisierung durchgeführt wurden, verstorben waren.

*Tabelle 3.11 Ergebnisse der Genotypisierung in Studie 2*

| Maus Nummer | Genotyp   | CAG-Wdh.-anzahl | Maus Nummer | Genotyp   | CAG-Wdh.-anzahl |
|-------------|-----------|-----------------|-------------|-----------|-----------------|
| 1           | WT/YAC84Q | 73+74           | 21          | WT/YAC84Q | 73+74           |
| 2           | WT/WT     |                 | 22          | WT/WT     |                 |
| 3           | WT/WT     |                 | 23          | WT/WT     |                 |
| 4           | WT/YAC84Q | 73+74           | 24          | WT/WT     |                 |
| 5           | WT/YAC84Q | 73-75           | 25          | WT/YAC84Q | -               |
| 6           | WT/YAC84Q | 73+74           | 26          | WT/WT     |                 |
| 7           | WT/WT     |                 | 27          | WT/WT     |                 |
| 8           | WT/WT     |                 | 28          | WT/YAC84Q | 73+74           |
| 9           | WT/YAC84Q | 73-75           | 29          | WT/WT     |                 |
| 10          | WT/YAC84Q | -               | 30          | WT/WT     |                 |
| 11          | WT/WT     |                 | 31          | WT/WT     |                 |
| 12          | WT/YAC84Q | 72-74           | 32          | WT/YAC84Q | 73-75           |
| 13          | WT/WT     |                 | 33          | WT/WT     |                 |
| 14          | WT/WT     |                 | 34          | WT/YAC84Q | 73+74           |
| 15          | WT/YAC84Q | 72-75           | 35          | WT/YAC84Q | 71-74           |
| 16          | WT/WT     |                 | 36          | WT/WT     |                 |
| 17          | WT/WT     |                 | 37          | WT/YAC84Q | 73+74           |
| 18          | WT/YAC84Q | 73+74           | 38          | WT/YAC84Q | 73+74           |
| 19          | WT/YAC84Q | 73+74           | 39          | WT/WT     |                 |
| 20          | WT/YAC84Q | 72-74           |             |           |                 |

### 3.3.2.5 Aufbau der Studie 2

Bei der Planung des Versuches wurde eine optimale Verteilung der Versuchstiere auf die unterschiedlichen Versuchsgruppen festgelegt, welche in Tabelle 3.13 zu erkennen ist. Dabei sollten je ASO und Konzentration 6 Jungtiere vom hemizygoten Genotyp verwendet werden. Als Konzentrationen wurden 30 µg und 60 µg gewählt. Die Verteilung auf die Geschlechter sollte jeweils drei zu drei betragen, um geschlechtsabhängige Unterschiede auszugleichen. Die höchste Konzentration jeder ASO sollte zusätzlich den rein wildtypischen Tieren verabreicht werden. Außerdem sollten als Kontrollgruppe 6 heterozygote und 6 wildtypische Tiere unbehandelt beobachtet und den postoperativen Analysen unterzogen werden. In der Realität sind leider Probleme bei der Zucht entstanden, sodass eine große Anzahl der Jungtiere entweder schon vor Versuchseintritt oder unter der Narkose verstorben sind. Insgesamt

## Ergebnisse

wurden dadurch deutlich weniger Tiere behandelt als geplant, vor allem das Geschlechterverhältnis war ungleich, da insgesamt 10 Weibchen und nur 5 Männchen zur Verfügung standen. Es wurden größtenteils YAC84Q/WT Mäuse behandelt und jeweils nur eine wildtypische Maus mit der höchsten Konzentration je ASO. Da die Verluste so hoch, die Kohorte jedoch so klein war, blieb am Ende nur ein YAC84Q-Tier als unbehandelte Kontrolle übrig. Als eine explorative Zwischenanalyse des Effektes der mutASO auf die Proteinexpression keinen Einfluss zu haben schien, wurde die Studie vorzeitig beendet. Letztlich ergab sich die in Tabelle 3.14 gezeigte Verteilung der Tiere für Studie 2.

Tabelle 3.12 Übersicht der optimalen Aufteilung der Versuchstiere in Studie 2

| ASO                | Genotyp   | Konzentration<br>in µg | N Tiere | ♂  | ♀  | Alter in<br>Wochen |
|--------------------|-----------|------------------------|---------|----|----|--------------------|
| <b>WT-ASO</b>      | YAC84Q/WT | 30                     | 6       | 3  | 3  | 8                  |
|                    | YAC84Q/WT | 60                     | 6       | 3  | 3  | 8                  |
|                    | WT        | 60                     | 6       | 3  | 3  | 8                  |
| <b>Mut-ASO</b>     | YAC84Q/WT | 30                     | 6       | 3  | 3  | 8                  |
|                    | YAC84Q/WT | 60                     | 6       | 3  | 3  | 8                  |
|                    | WT        | 60                     | 6       | 3  | 3  | 8                  |
| <b>Unbehandelt</b> | YAC84Q/WT |                        | 6       | 3  | 3  |                    |
|                    | WT        |                        | 6       | 3  | 3  |                    |
| <b>Gesamt</b>      |           |                        | 48      | 24 | 24 |                    |

Tabelle 3.13 Übersicht der verwendeten Tiere in Studie 2

| ASO                | Genotyp   | Konz.<br>in µg | N<br>Tiere | ♂ | ♀  | Alter in<br>Wochen | Vorzeitig<br>verstorbene<br>Tiere |
|--------------------|-----------|----------------|------------|---|----|--------------------|-----------------------------------|
| <b>WT-ASO</b>      | YAC84Q/WT | 30             | 3          | 1 | 2  | 10-11              | -                                 |
|                    | YAC84Q/WT | 60             | 3          | 1 | 2  | 10-11              | 2                                 |
|                    | WT        | 60             | 1          |   | 1  | 10-11              | 1                                 |
| <b>Mut-ASO</b>     | YAC84Q/WT | 30             | 3          |   | 3  | 10-11              | 1                                 |
|                    | YAC84Q/WT | 60             | 3          | 1 | 2  | 10-11              | 3                                 |
|                    | WT        | 60             | 1          | 1 |    | 10-11              | 0                                 |
| <b>Unbehandelt</b> | YAC84Q/WT |                | 1          | 1 |    |                    |                                   |
| <b>Gesamt</b>      |           |                | 15         | 5 | 10 |                    | 7                                 |

Im Folgenden sollen die verschiedenen Aspekte und Beobachtungen der Studie dargelegt werden.

### 3.3.2.6 Durchschnittlicher Gewichtsverlauf nach Geschlecht in Studie 2

Wie auch in Studie 1 wurde das Gewicht der Tiere über den Verlauf des Versuches wöchentlich erhoben, da das Gewicht ein Indikator des Fressverhaltens und damit des Wohlbefindens und Allgemeinzustandes der Mäuse war. Die Tiere befanden sich noch im Wachstum. Daher nahm auch ihr Gewicht kontinuierlich zu. Die Gewichtsentwicklung der verschiedenen Gruppen aufgeschlüsselt nach Genotyp und Geschlecht ist in Abbildung 3.33 zu erkennen.

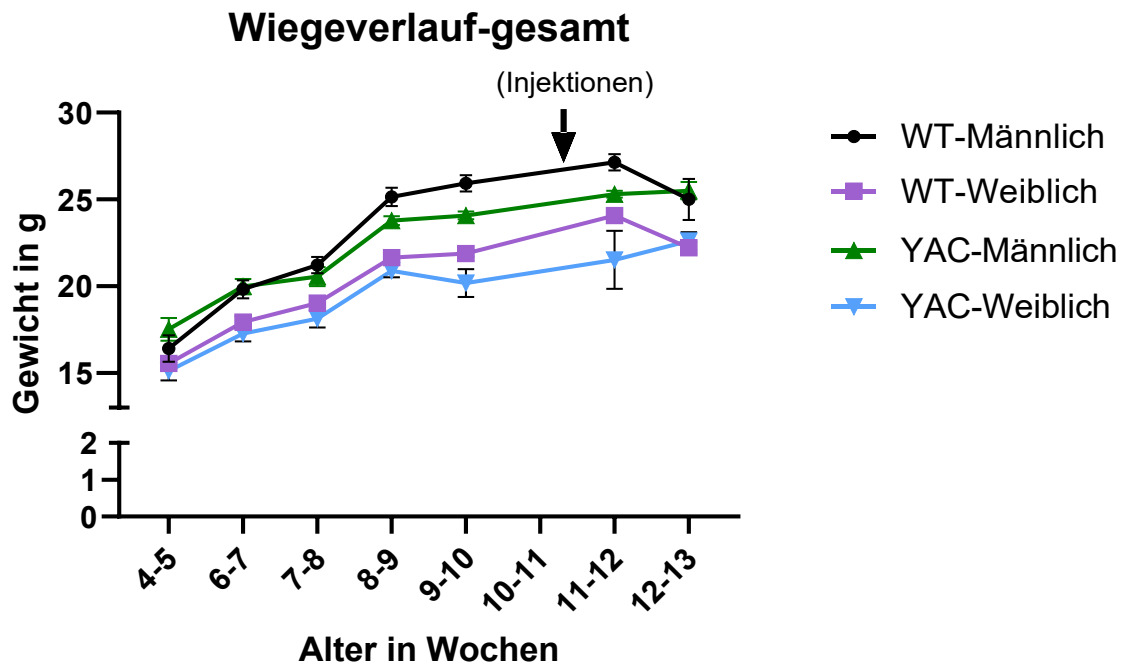


Abbildung 3.33 Gewichtsverlauf der Versuchstiere in Studie 2

Auf der x-Achse ist das Alter in Wochen angegeben. Die y-Achse bildet das Gewicht in g ab. Es wurde nach Geschlecht und Genotyp unterschieden, jedoch nicht nach der Behandlungsgruppe. Die Zeit hatte einen hochsignifikanten Effekt auf das Gewicht in allen vier Gruppen ( $p < 0,0001$ \*\*\*\*). Zwischen der Gewichtsentwicklung der wildtypischen Männchen ( $n=8$ ) und der YAC84Q-Männchen ( $n=6$ ) bestand kein signifikanter Unterschied. Zwischen den beiden weiblichen Gruppen (YAC84Q  $n=9$  und WT  $n=10$ ) ergab sich eine leichte Signifikanz von  $p=0,0482$ \*. Zwischen den wildtypischen Männchen und Weibchen zeigte das Geschlecht einen hochsignifikanten Einfluss ( $p < 0,0001$ \*\*\*\*), wie auch zwischen den YAC84Q-Männchen und Weibchen ( $p=0,0005$ \*\*\*).

In dieser Gewichtsbeobachtung wurde noch nicht nach der Behandlungsgruppe unterschieden, da es um die longitudinale Entwicklung des Gewichts vor allem in der Zeit vor den Injektionen ging. Ein Einfluss der Behandlungen auf das Gewicht wurde in Folgeanalysen untersucht. Für die statistische Analyse wurde eine *Mixed-Effects* Analyse gerechnet, da einige der Versuchstiere vor Versuchsende verstarben und daher einige Werte fehlten. Es konnte von einer Normalverteilung der Daten ausgegangen werden. Der Einfluss der Zeit auf das Gewicht war in allen vier Gruppen hochsignifikant ( $p < 0,0001^{****}$ ). Zwischen den männlichen WT/YAC84Q-Mäusen ( $n=6$ ) und den männlichen wildtypischen Tieren ( $n=8$ ) gab es keinen Unterschied in der Gewichtsentwicklung. Zwischen den beiden weiblichen Gruppen (9 YAC84Q-Tiere bzw. 10 WT-Tiere) war der Unterschied dagegen leichtsignifikant ( $p=0,0482^*$ ), wobei das Gewicht der WT/YAC84Q-Weibchen geringer ausfiel. Im Vergleich des Gewichts der wildtypischen Männchen und Weibchen fiel ein signifikanter Unterschied auf ( $p < 0,0001^{****}$ ), ebenso zwischen den weiblichen und männlichen YAC84Q-Mäusen ( $p=0,0005^{***}$ ).

### 3.3.2.7 Postoperative Beobachtungen

Nach Durchführung der Injektionen wurden die Mäuse engmaschig beobachtet. Dabei wurde der Gewichtsverlauf in den ersten drei Tagen sowie dem 7. postoperativen Tag erhoben und ihre Körperpflege und Sozialverhalten festgehalten. Ebenso wurde die Wundheilung erfasst. Dabei wurde nach dem *Scoresheet* im Anhang in Tabelle B vorgegangen. Die verschiedenen Aspekte der Nachbeobachtung sollen im Folgenden näher dargelegt werden.

#### 3.3.2.7.1 Toxizität und Überleben in Studie 2

In Studie 2 ergaben sich einige Komplikationen hinsichtlich der Verträglichkeit der ASO-Behandlungen. Bereits während der Narkose gab es einige Probleme, da 4 der Tiere (ein WT-Tier und drei WT/YAC84Q-Tiere) diese schlecht vertrugen sowie drei Tiere (ein WT-Tier und zwei WT/YAC84Q-Tiere) darunter verstarben. Diese Beobachtung kam für alle Genotypen und in den verschiedenen Behandlungsgruppen vor, schien also unabhängig von der ASO bzw. Konzentration zu sein. Problematisch war zur Zeit des Versuches, dass sich das europäische Tierschutzgesetz geändert hatte und die

Tierhaltung begann immer voller zu werden, da keine Tiere mehr abgetötet werden durften. Aus diesem Grund wurden Tiere zwischen den Räumen getauscht, sodass viel mehr Tiere pro Raum vorhanden waren als vor dieser Änderung. Dadurch konnten vermehrt Infektionen und das Versterben sonst gesunder Jungtiere beobachtet werden. Dies hatte einen entscheidenden Einfluss auf die Studie. Die genauen Ursachen der erhöhten Mortalität lassen sich nicht eindeutig voneinander trennen. Bei einer tierärztlichen Untersuchung ergab sich, dass einige der Tiere an einem Ileus verstorben waren, was sich auch bei unseren Präparationen der Versuchstiere, die unter Narkose oder im Verlauf verstorben waren, gezeigt hatte.

Weiterhin ergaben sich Auffälligkeiten im Phänotyp, die auch im *Score* (siehe 3.3.2.7.4) erfasst wurden. Da entsprechend der vorab durchgeführten Toxizitätsstudie eine erhöhte Toxizität der mutASO zu erwarten war, sollte vor allem auf den Zustand derjenigen Tiere geachtet werden, die die mutASO verabreicht bekamen. Die Erwartung bestätigte sich auch hier. So traten unmittelbar nach den Injektionen eine verlängerte Aufwachzeit sowie Koordinationsschwierigkeiten auf. In den ersten Tagen nach den Injektionen zeigten sich Auffälligkeiten im Hinblick auf die Körperhaltung und das Sozialverhalten. Diese aggravierten jedoch besonders am 7. postoperativen Tag, wodurch sie in einigen Fällen zur Euthanasie der Tiere führten, damit diese nicht länger leiden mussten. Diese Auffälligkeiten bestanden konkret in einer veränderten, gekrümmten Haltung, Ängstlichkeit und Unruhe, vermehrtem Springen oder einem Tremor. Es handelte sich also um neurologische Auffälligkeiten. Die Operationswunden verheilten in allen Gruppen ohne größere Besonderheiten.

Ein weiterer Toxizitätsindikator war das postoperative Überleben. Die Mortalität war besonders hoch in den Gruppen der mutASO (eins von zwei Tieren der Gruppe mit 30 µg und drei der drei Tiere in der Gruppe mit 60 µg). Das wildtypische Tier, welches 60 µg der mutASO erhalten hatte, schien diese zu vertragen und wurde zum ursprünglich vorgesehenen Zeitpunkt 4 Wochen nach der Injektion euthanasiert und präpariert. In der 30 µg Gruppe der wtASO gab es keine verstorbenen Tiere bei insgesamt drei behandelten Tieren. Dies deutete auf eine gute Verträglichkeit hin. In der 60 µg Gruppe der wtASO starb zwar eines der beiden operierten transgenen Tiere, nach Präparation dessen zeigte sich allerdings auch ein schwarzer Darm, was auf eine intestinale Ischämie hindeutete, eine Erkrankung, die letal verlaufen kann. Ein ähnlicher Befund zeigte sich leider auch

## Ergebnisse

bei einigen der Tiere aus den mutASO Behandlungsgruppen. Daher ist unklar, ob die Todesursache in einer Toxizität der ASO begründet liegt oder ob es eventuell andere z.B. intestinale Ursachen gab. Eine Übersicht dieser Ergebnisse ist in Tabelle 3.15 zu finden.

Tabelle 3.14 Toxizitätsaspekte der ASOs in Studie 2

| ASO            | Konzentration | N Tiere | Auffälligkeiten                                            |                                                          |                        | Mortalität     |      |
|----------------|---------------|---------|------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|------------------------|----------------|------|
|                |               |         | Narkose                                                    | Phänotyp                                                 |                        | Im Verlauf     | Ges. |
|                |               |         |                                                            | Tag 1-3                                                  | Tag 7                  |                |      |
| <b>WT ASO</b>  | <b>30 µg</b>  | 3       | 1x leichte Schnappatmung                                   |                                                          |                        | 0              | 0    |
|                | <b>60 µg</b>  | 3       | 1x nicht aus Narkose erwacht                               | 1x bucklige Haltung und koordinatorische Auffälligkeiten |                        | 1              | 2    |
|                | <b>WT</b>     | 1       | Nicht aus Narkose erwacht                                  |                                                          |                        | 0              | 1    |
| <b>Mut ASO</b> | <b>30 µg</b>  | 3       | 1x nur unilat. Injektion möglich                           |                                                          | 1x neurolog. auffällig | 1 (Euthanasie) | 1    |
|                | <b>60 µg</b>  | 4       | 1x Narkose schlecht vertragen, 1x unter Narkose verstorben | 1x mehr Springen                                         | 3x neurolog. auffällig | 3 (Euthanasie) | 4    |
|                | <b>WT</b>     | 1       | Narkose schlecht vertragen                                 |                                                          |                        |                | 0    |

### 3.3.2.7.2 Postoperativer Gewichtsverlauf in Studie 2

Bei Betrachtung des postoperativen Gewichtsverlaufes der WT/YAC84Q-Mäuse, aufgeschlüsselt nach den vier verschiedenen Behandlungsgruppen, ließ sich in den 3 Tagen nach der Operation bereits im Mittel ein eindeutiger Gewichtsverlust erkennen. Auch bis 7 Tage postoperativ konnte das Ausgangsgewicht nicht erreicht werden. Im Verlauf bis eine Woche postoperativ waren die Gruppen der wtASO (drei Tiere mit 30 µg und zwei Tiere mit 60 µg) konstant im Gewicht, nahmen allerdings nicht wieder zu, wie zu erwarten gewesen wäre. Die Gruppen mit Injektion der mutASO (drei Tiere mit 30 µg und 6 Tiere mit 60 µg) nahmen sogar weiter an Gewicht ab. Die jeweiligen

Gewichtsverläufe sind in Abbildung 3.34 zu erkennen. Statistisch wurden die Daten mittels *Mixed-Effects* Analyse untersucht. In der statistischen Untersuchung auf Normalverteilung war diese nicht sicher festzustellen, sie konnte jedoch graphisch angenommen werden. Die Zeit zeigte einen leichtsignifikanten Einfluss auf das Gewicht ( $p=0,0368^*$ ). Außerdem konnte ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den Versuchstieren im Gewichtsverlauf ( $p<0,0001^{****}$ ) festgestellt werden. Der Effekt schien unabhängig von der Behandlungsgruppe zu sein, welche keinen statistisch signifikanten Einfluss zeigte. Es ist jedoch auch zu beachten, dass die Streuung der Werte innerhalb der Versuchsgruppen sehr stark war, wie am Standardfehler zu erkennen ist. So gab es Mäuse, die ihr Gewicht stabil bis Tag 7 halten konnten, während andere sehr massiv an Gewicht verloren hatten. Die Daten sind also nur schwer zu verallgemeinern und vorsichtig zu interpretieren. Insgesamt deutet die Gewichtsentwicklung vor allem in der mutASO Gruppe auf eine schlechte Verträglichkeit hin und bestätigt damit die weiteren Erkenntnisse zur Toxizität dieser ASO.

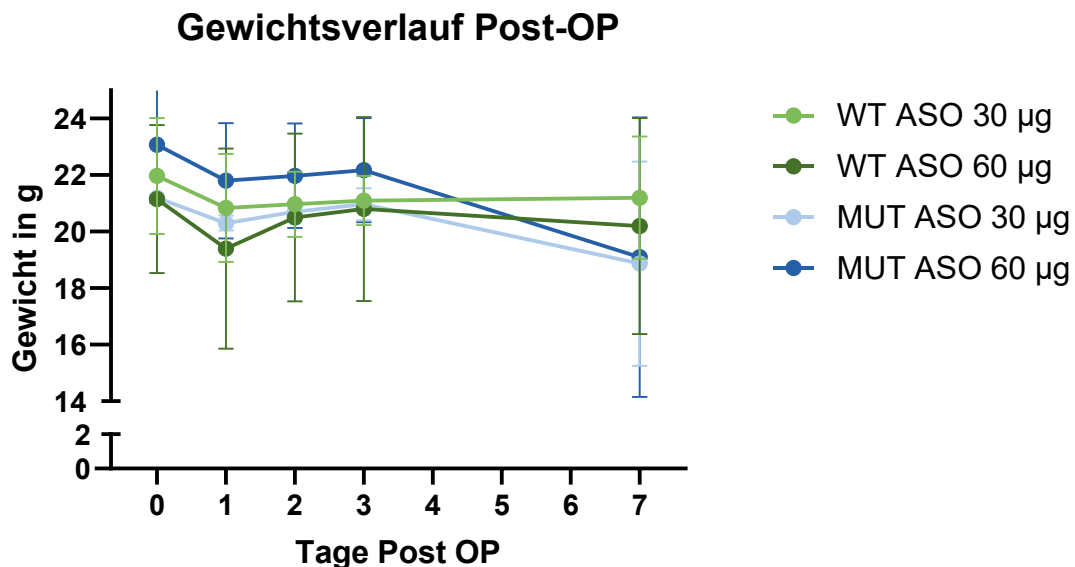


Abbildung 3.34 Postoperative Gewichtsverläufe in Studie 2

Die x-Achse zeigt die Tage nach den Injektionen, die y-Achse spiegelt das Durchschnittsgewicht je Gruppe in g dar. Am Tag nach der OP lässt sich ein Gewichtsverlust in allen Gruppen erkennen, welcher sich bis Tag 3 wieder etwas stabilisierte, jedoch in keiner Gruppe den Ausgangswert erreichen konnte. Im Verlauf bis Tag 7 blieb das Gewicht in den beiden Gruppen, die die wtASO (30 µg  $n=3$  und 60 µg  $n=2$ ) bekommen haben, konstant. In der mutASO Gruppe (30 µg  $n=3$  und 60 µg  $n=3$ ) fiel das Gewicht sogar weiter. Dabei hatte die Zeit einen statistisch signifikanten Effekt ( $p=0,0368^*$ ). Außerdem stellte sich bei der ein hochsignifikanter Unterschied des Gewichtsverlaufes zwischen den Tieren heraus ( $p<0,0001^{****}$ ).

### 3.3.2.7.3 Prozentuale Gewichtsänderungen in Studie 2

Um die interindividuellen Unterschiede im absoluten Gewicht (beispielsweise dadurch bedingt, dass Männchen grundsätzlich schwerer sind als Weibchen) auszugleichen, wurden die relativen Gewichtsveränderungen betrachtet. Dafür wurde die Gewichtsänderung in prozentuale Relation zum Ausgangsgewicht am OP-Tag gesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.35 zu erkennen.

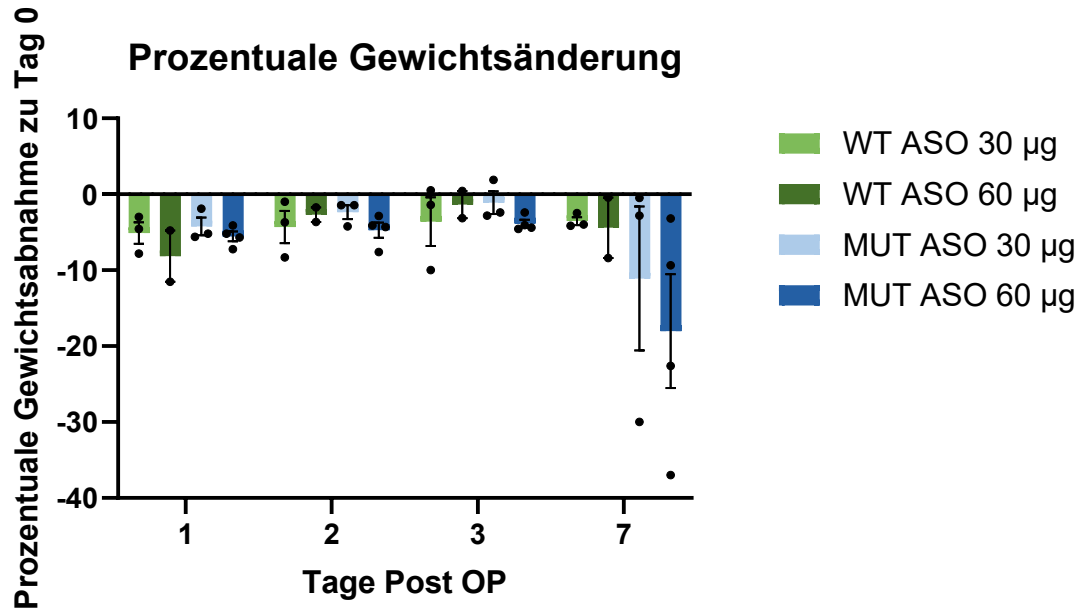


Abbildung 3.35 Prozentuale Gewichtsveränderungen in Studie 2

Auf der x-Achse sind die postoperativen Tage aufgetragen, an denen das Gewicht erhoben wurde. Die y-Achse zeigt die prozentuale Gewichtsveränderung in Bezug auf das Gewicht vor der Injektion, also zu Tag 0 in Prozent an. Es wurde nach ASOs und Konzentrationen unterschieden. Auch hier zeigte sich die anfängliche Gewichtsabnahme um ca. 5-8 Prozent je nach Gruppe, die sich am 2. und 3. postoperativen Tag langsam zurückbildete. An Tag 7 jedoch hatten alle Gruppen bis auf die Gruppe der wtASO (30 µg n=3 und 60 µg n=2) mit 30 µg prozentual gesehen wieder abgenommen. Vor allem die beiden Gruppen in Behandlung mit der mutASO (30 µg n=3, 60 µg n=3) haben prozentual gesehen massiv an Gewicht (im Schnitt bis zu 12 bzw. 24%) verloren.

Auch hier zeigte sich eine anfängliche Gewichtsreduktion in allen vier Gruppen am Tag nach der Operation. Diese bildete sich langsam zurück, das Gewicht erreichte aber auch an Tag 3 in keiner der Gruppen seinen Ausgangswert. In der Gruppe mit 30 µg der wtASO blieb das Gewicht prozentual gesehen stabil bis zum 7. Tag, in den anderen drei Gruppen nahm es sogar wieder ab. Besonders massiv fiel diese Abnahme in den Gruppen aus, die mit der mutASO behandelt wurden. In der 60 µg Gruppe erreichte die prozentuale Gewichtsabnahme im Mittel sogar fast 25%. Jedoch ist auch bei dieser Betrachtung die

große Streuung der Werte vor allem am 7. postoperativen Tag zu beachten. Bei der statistischen Betrachtung mittels *Mixed-Effects* Analyse zeigte sich kein signifikanter Einfluss einer der Variablen. Die Normalverteilung der Daten konnte nach graphischer Betrachtung angenommen werden. Insgesamt bestätigt die prozentuale Gewichtsveränderung die Beobachtung der absoluten Gewichtsentwicklung, dass vor allem die mutASO eine höhere Toxizität zu besitzen scheint.

### 3.3.2.7.4 Punktzahl in der postoperativen Nachsorge in Studie 2

Zusätzlich zum Gewicht wurden auch die anderen Aspekte des *Scoresheets* erhoben, um den postoperativen *Score* zu bilden (siehe Anhang Tabelle B). Je niedriger der *Score* ausfiel, desto besser war der beobachtete Zustand des Tieres. Die zugehörigen Ergebnisse sind in Abbildung 3.36 zu erkennen.

Insgesamt ließ sich eine rückläufige Entwicklung des *Scores* am 2. und 3. Tag im Vergleich zum 1. postoperativen Tag erkennen. Der *Score* fiel von anfänglich höheren Werten wieder auf einen niedrigeren Wert und entsprach der Erholung der Tiere von den Behandlungen. Diese Erholung fiel in der 60 µg Gruppe der mutASO im Vergleich zu den anderen Gruppen auffällig gering aus. Am 7. Tag stieg die Punktzahl des *Scores* in allen Versuchsgruppen wieder an. Massiv fiel diese Zunahme vor allem in den mutASO Gruppen aus, was für einen schlechteren Zustand der Mäuse sprach. Da auch das Gewicht ein Kriterium des *Scores* war, passen die Ergebnisse zu denen der postoperativen Gewichtsentwicklung der Kapitel 3.3.2.7.2 und 3.3.2.7.3. Außerdem bedeutete ein *Score* von >10 den humanen Endpunkt, sodass das Tier von seinem Leiden erlöst wurde. Insofern spiegeln vor allem die hohen *Score*-Werte in der 60 µg Gruppe der mutASO die hohe Mortalitätsrate in dieser Gruppe wider. Statistisch wurden die *Score*-Werte mittels *Mixed-Effects* Analyse untersucht, da nach der graphischen Betrachtung eine Normalverteilung der Werte angenommen werden konnte. Es ergab sich ein leicht signifikanter Einfluss der Zeit auf den Wert des *Scores* ( $p=0,0352^*$ ). Die Behandlungsgruppe schien keinen statistisch signifikanten Unterschied auszumachen. Es bestand lediglich eine signifikante Abhängigkeit der Werte vom jeweiligen Versuchstier ( $p=0,0046^{**}$ ).

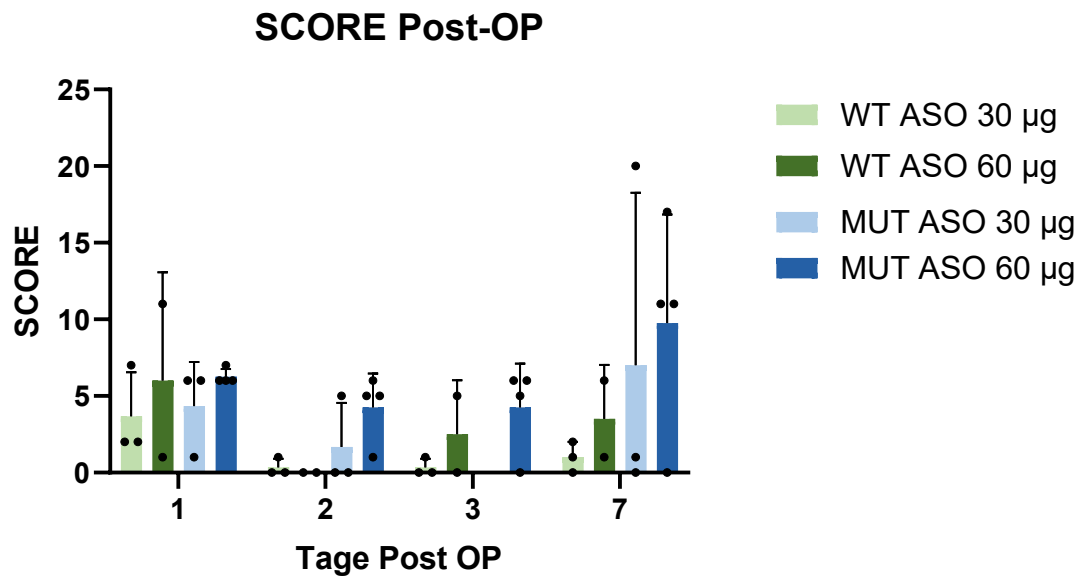


Abbildung 3.36 Ergebnisse des postoperativen Scores in Studie 2

Auf der x-Achse sind die Tage nach den Injektionen aufgetragen. Die y-Achse zeigt den durchschnittlichen Score je Gruppe je Tag. Es wurde nach ASOs und Konzentrationen unterschieden. Der Score setzt sich wie im Anhang in Tabelle B beschrieben zusammen. Insgesamt ließ sich eine Reduktion des Scores an Tag 2 und 3 erkennen, nachdem er an Tag 1 in allen Gruppen um die 5 lag (Für die wt ASO 30 µg  $n=2$  und 60 µg  $n=3$  und für die mutASO 30 µg  $n=3$  und 60 µg  $n=6$ ). In der 60 µg Gruppe der mutASO blieb er jedoch insgesamt höher als in den anderen Gruppen. An Tag 7 stieg der Score wieder in allen Versuchsgruppen. Besonders massiv war dieser Anstieg in den beiden Gruppen, die die mutASO erhalten hatten. Es zeigte sich ein signifikanter Einfluss der Zeit auf die Ergebnisse ( $p=0,0352^*$ ) sowie ein statistisch signifikanter Einfluss des Versuchstieres auf die Ergebnisse ( $p=0,0046^{**}$ ).

### 3.3.2.7.5 Wirehang-Test in Studie 2

Der Wirehang-Test wurde am 1. bzw. 7. postoperativen Tag durchgeführt, um die Mäuse auf potenzielle neurologische Defizite zu untersuchen. Wurde der Test am 1. Tag postoperativ vorzeitig abgebrochen (300 Sekunden nicht erreicht), wurde er am 2. Tag wiederholt. Die dort erreichte Zeit wurde dann für den ersten Tag eingetragen, falls die Maus am ersten Tag offensichtlich aus mangelnder Motivation und nicht aus koordinatorischen Schwierigkeiten den Test vorzeitig beendet hatte, da die Werte nur so statistisch sinnvoll ausgewertet werden konnten. Graphisch konnte eine Normalverteilung der Werte angenommen werden, daher wurden die Daten mittels *TwoWay ANOVA* untersucht.

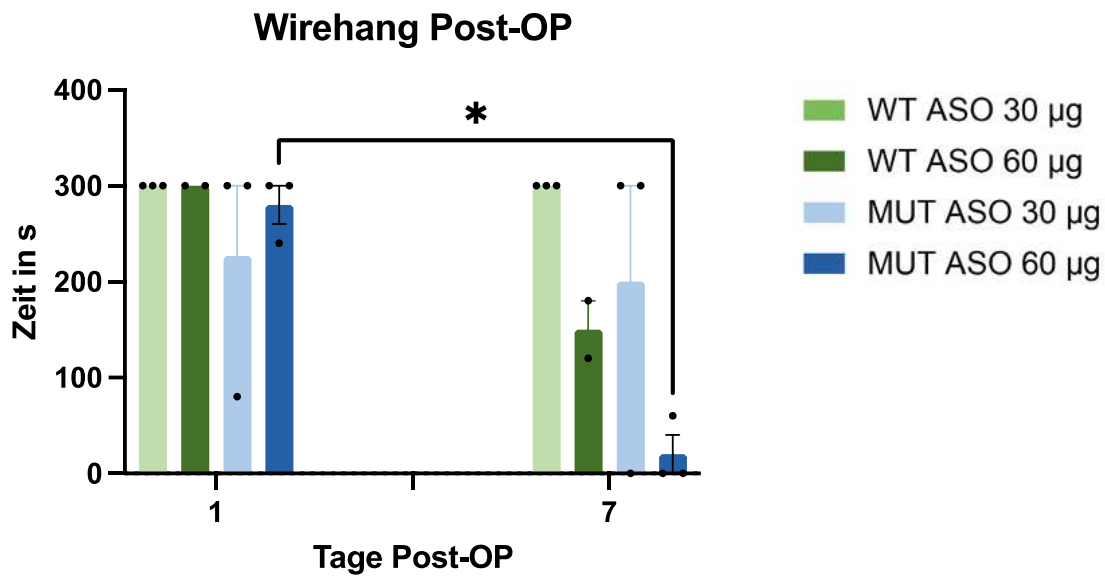


Abbildung 3.37 Ergebnisse des Wirehang-Tests in Studie 2

In der Abbildung erkennt man die Ergebnisse des Wirehang-Tests aufgeschlüsselt nach Behandlungsgruppen, die in der Legende zu erkennen sind. Auf der y-Achse ist die Zeit in Sekunden aufgetragen, die die Tiere durchgängig hangelten. Die maximal erreichbare Zeit betrug 300 s. Auf der x-Achse sind die beiden Zeitpunkte des Tests, 1 bzw. 7 Tage nach den Injektionen aufgetragen. Es wurde nach ASOs und Konzentrationen unterschieden. Am ersten Zeitpunkt erreichten beinahe alle Gruppen die Maximalzeit oder eine Zeit nahe dieser. Am zweiten Zeitpunkt dagegen konnte nur die 30 µg Gruppe der wtASO (n=3) die volle Zeit erreichen. Die Hangeldauer der 30 µg Gruppe der mut ASO (n=3) nahm leicht ab. Die Zeiten der 60 µg wtASO Gruppe (n=2) fielen am 7. Tag. Besonders auffallend ist der Wert der mutASO 60 µg Gruppe (n=3), in der zwei Tiere gar nicht hangeln konnten. Der statistische Vergleich der beiden Zeitpunkte ergibt für die 60 µg Gruppe der mutASO einen p-Wert von 0,0155\*.

Die Zeiten, die die Mäuse jeweils durchgängig durchgehalten haben, sind in Abbildung 3.37 nach Behandlungsgruppen sortiert zu erkennen. Dabei fällt auf, dass am ersten postoperativen Tag alle Gruppen durchschnittlich sehr gute Werte erzielen konnten. Lediglich eine Maus der 30 µg Gruppe der wtASO (n=3) ließ sich direkt fallen, erreichte also nur ein paar Sekunden. Jedoch konnte sie am 2. Tag die maximal mögliche Zeit von 300 s erreichen. Es lag also wohl kein neurologisches Defizit vor, sondern nur mangelnde Motivation, weshalb der Wert für den ersten Tag eingetragen und ausgewertet wurde. Am 7. Tag dagegen fiel das Ergebnis in den beiden 60 µg Gruppen sowohl im Vergleich zu den Ergebnissen des Tests am ersten postoperativen Tag als auch im Vergleich zu den jeweiligen 30 µg Gruppen deutlich schlechter aus. In der 30 µg Gruppe der mut ASO (n=3) erreichten zwei Mäuse die volle Punktzahl, jedoch konnte eine der Mäuse den Test

koordinatorisch gar nicht absolvieren. Der Unterschied der Hangeldauer zwischen den beiden Zeitpunkten für die mutASO 60 µg (n=3) erreichte eine statistische Signifikanz von  $p=0,0155^*$ . Am 7. Tag zeigte sich ein graphischer Unterschied zwischen den Hangeldauern der 30 µg und der 60 µg Gruppe für beide ASOs. Dieser erreichte jedoch weder für die mutASO noch für die wtASO statistische Signifikanz. Ferner bestand der Unterschied zwischen den Konzentrationen am ersten Tag nach den Injektionen noch nicht. Die Leistung in der Gruppe der mutASO dauerte am 7. Tag im Durchschnitt nicht einmal eine Minute. Bei Beobachtung der Tiere im Test fiel auch auf, dass sie sich diesmal nicht absichtlich fallen ließen, sondern entweder koordinatorisch oder durch mangelnde Kraft nicht in der Lage waren, zu hangeln. Dies wies auf ein akut motorisch-koordinatorisches Defizit hin.

### 3.3.2.7.6 Ergebnisse des *Beam-Walks*

Beim *Beam-Walk* wurden die Mäuse von einer Kamera gefilmt, während sie einen Holzstab überquerten. Anschließend konnten die Pfoten sowie der Schwanz mittels eines Künstliche Intelligenz (KI) gestützten Ansatzes aufgezeichnet und verfolgt werden. Dies ermöglichte eine objektivierte Analyse des Gangbildes, basierend auf der Rhythmik des Bewegungsablaufes. Diese wird im Versuch als *Rhythmicity of Gait (ROG)* bezeichnet und wurde durch die KI als Zahlenwert ausgedrückt. Je höher dieser Zahlenwert ausfiel, desto flüssiger und gleichmäßiger war das Gangbild. Umgekehrt sprach ein niedrigerer ROG für ein ataktischeres Gangbild mit Abrutschen der Pfoten (Lang et al., 2020). Leider gab es innerhalb des Instituts, welches die Methode entwickelt hatte, einige personelle Änderungen, sodass nur ein Teil der Daten ausgewertet werden konnte. Diese werden hier exemplarisch dargestellt.

Einerseits wurde das Gangbild im Alter von 6-7 Wochen zwischen 7 WT/YAC84Q und 2 WT-Tieren verglichen, Weibchen und Männchen wurden gemeinsam analysiert. Dabei zeigte sich eine bessere Rhythmik des Gangbildes für die wildtypischen Tiere, was in Abbildung 3.38 zu erkennen ist. Die ausgewertete Stichprobe war jedoch sehr gering, so konnte der Unterschied keine statistische Signifikanz in der Untersuchung mittels ungepaarten T-Tests erreichen.

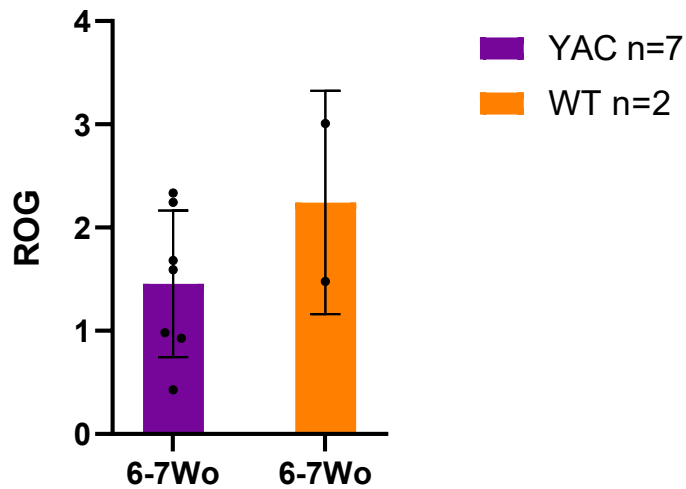
**Beam-Walk nach Genotyp**

Abbildung 3.38 Exemplarische Ergebnisse des Beam-Walks

Die Abbildung stellt die Ergebnisse der ROG (Rhythmicity of Gait) dar. Diese wurde mittels KI aus den Videoaufnahmen der Gangsequenzen berechnet. Die ROG wird als Zahlenwert ausgedrückt und ist auf der y-Achse aufgetragen. Die x-Achse bildet das Alter der Tiere in Wochen ab. Es wurden YAC84Q und WT-Tiere verglichen. Der erkennbare Unterschied konnte keine statistische Signifikanz erreichen.

Eine weitere Übersicht in Abbildung 3.39 zeigt die erhobenen Daten im Alter von 6-7 bzw. 12-14 Wochen aufgeschlüsselt nach Behandlungsgruppe und Genotyp. In den Behandlungsgruppen hatte die Injektion im Alter von 10-12 Wochen stattgefunden, also genau zwischen den beiden *Beam-Walk*-Analysen. Auch hier fiel die Stichprobengröße leider sehr gering aus. Es deuteten sich nur Unterschiede an. Die behandelten WT/YAC84Q-Mäuse verbesserten in allen drei Behandlungsgruppen ihr Gangbild. Allerdings fand diese Verbesserung sowohl in der Behandlungsgruppe der mutASO als auch der wtASO statt. Dies könnte auch für einen Lerneffekt durch die Wiederholung des Tests sprechen. Die unbehandelte WT/YAC84Q-Maus dagegen verschlechterte ihr Gangbild innerhalb der 4 Wochen. Ebenso wurden die Werte der mit der mutASO behandelten und der unbehandelten WT-Maus schlechter. Es fällt auf, dass die absoluten ROG-Werte der wildtypischen Tiere höher und damit besser als die der WT/YAC84Q-Mäuse ausfallen. Aufgrund der niedrigen Stichprobenzahl ist es jedoch schwierig, allgemeine Schlüsse aus den gezeigten Daten zu ziehen.

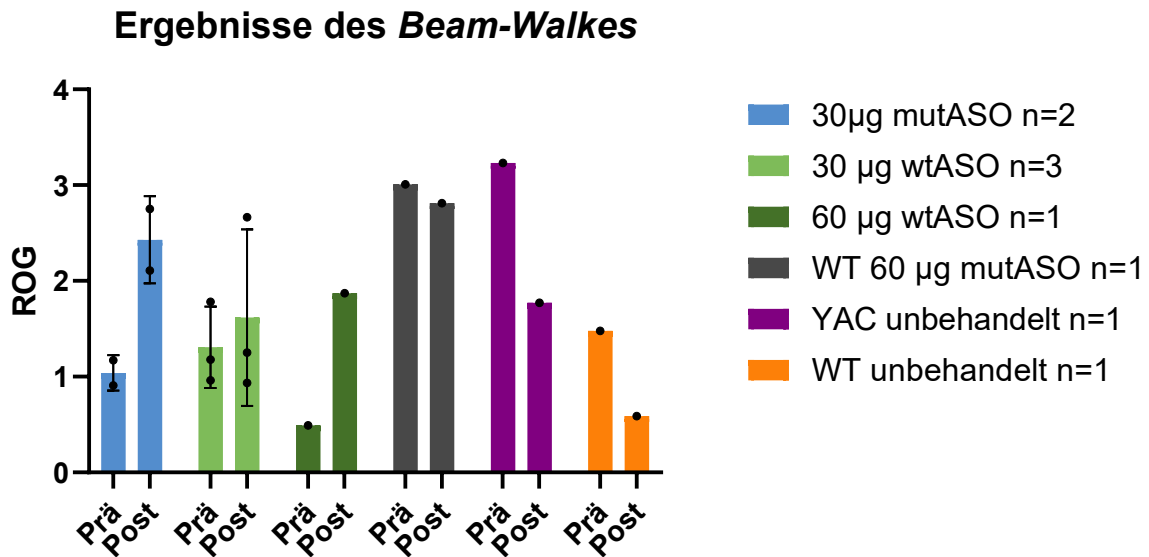


Abbildung 3.39 Ergebnisse des *Beam-Walkes* vor und nach Behandlung

Die ROG ist auf der y-Achse aufgetragen, der Zeitpunkt in Bezug auf die Behandlungen ist auf der x-Achse abgebildet. Es wurden die verschiedenen Behandlungsgruppen der Mäuse sowie eine unbehandelte YAC84Q- und eine unbehandelte WT-Maus verglichen. Alle behandelten YAC-Mäuse konnten ihre ROG-Werte in der zweiten Messung verbessern. Die behandelte und die unbehandelte wildtypische Maus verschlechterten sich zum zweiten Zeitpunkt. Ebenso die unbehandelte YAC84Q-Maus. Auffällig ist, dass die absoluten Werte der WT-Tiere insgesamt höher ausfallen als diejenigen der YAC-84Q-Mäuse.

### 3.3.2.8 Ergebnisse der Präparation in Studie 2

Im Alter von 14-16 Wochen, 4 Wochen nach den Injektionen wurden das Gehirn sowie Leber und Niere als zentrale Stoffwechselorgane der Versuchstiere präpariert. Außerdem wurde Blut und CSF abgenommen. Ebenso wurden alle Tiere präpariert, die vorzeitig unter der Narkose verstarben oder aufgrund ihres schlechten Zustandes euthanasiert wurden (siehe *Scoresheet* Anhang Tabelle B), um eventuelle Ursachen dafür festzustellen. Bei einem Großteil der vorzeitig verstorbenen Tiere fiel eine starke Schwarzfärbung des Darmes auf, was mit einer Darmischämie vereinbar wäre. Ebenso häufig waren dilatierte Darmschlingen vor einem stenotischen Abschnitt zu finden, was dem Bild eines Ileus entsprach. Beide Krankheitsbilder - Ileus und Darmischämie - können auch miteinander in Zusammenhang stehen und letal verlaufen. Diese Krankheitsbilder sind daher in Bezug auf die Todesursache schwer von einer letal verlaufenden Neurotoxizität der ASOs zu trennen. Die Gehirne der Mäuse sahen bei allen Tieren unauffällig aus, ebenso wie Leber und Niere. Auch an den weiteren Organen wie

## Ergebnisse

Herz und Lunge konnten keine Auffälligkeiten festgestellt werden. Die Beobachtungen während der Präparationen sortiert nach Behandlungsgruppen sind in Tabelle 3.17 zusammengefasst.

Tabelle 3.15 Beobachtungen der Präparationen in Studie 2

| ASO                | Genotyp   | Konz. in µg | n Tiere | Alter in Wo | Präp. 4 Wo nach Injektion | Auffälligkeiten                                                                        |
|--------------------|-----------|-------------|---------|-------------|---------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>WT-ASO</b>      | YAC84Q/WT | 30          | 3       | 10-11       | 3                         |                                                                                        |
|                    | YAC84Q/WT | 60          | 3       | 10-11       | 1                         |                                                                                        |
|                    | WT        | 60          | 1       | 10-11       | 0                         | Darm und Magen überbläht, Stenotisches Segment V.a. Ileus                              |
| <b>Mut-ASO</b>     | YAC84Q/WT | 30          | 3       | 10-11       | 2                         | Vorzeitig verstorbene Maus schwarzer Darm Infarzierung/ Ileus?                         |
|                    | YAC84Q/WT | 60          | 4       | 10-11       | 2 vorzeitig nach 8 Tagen  | Vorzeitig verstorbene Tiere: Darm und Magen überbläht, Stenotisches Segment V.a. Ileus |
|                    | WT        | 60          | 1       | 10-11       | 1                         |                                                                                        |
| <b>Unbehandelt</b> | YAC84Q/WT |             | 1       |             | 1                         |                                                                                        |
| <b>Ges.</b>        |           |             | 15      |             |                           |                                                                                        |

### 3.3.2.9 Ergebnisse des *Western Blots* aus dem Cerebellum

Nach Präparation der Gehirne der Versuchstiere (drei YAC84Q-Tiere mit 30 µg wtASO, zwei YAC84Q-Tiere mit 30 µg mutASO) sowie der Kontrollen (ein unbehandeltes wildtypisches Tier, ein unbehandeltes YAC84Q-Tier) sollten zuerst die Proteine aus dem Cerebellum isoliert werden, um die Expressionslevel des humanen mutanten ATXN3 zu bestimmen. Ebenso wurde das wildtypische humane ATXN3 (sollte sowohl in der YAC84Q-Maus als auch in der wildtypischen Maus negativ sein), sowie das endogene, also das murine Atxn3 bestimmt. Dies wurde im *Western Blot* mit Normalisierung auf Vinculin durchgeführt und quantifiziert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.40 zu finden. Es ist zu sehen, dass sowohl bei der WT/YAC84Q-Kontrollmaus als auch bei allen der behandelten WT/YAC84Q-Mäuse eine deutliche Bande für mutantes humATXN3

erkennbar war. Diese scheint auf den ersten Blick für alle Versuchstiere gleich stark ausgeprägt. Für die wildtypische Kontrollmaus in der Spalte ganz links (diese ist in der Abbildung fälschlicherweise als YAC#32 beschriftet) ist keine Bande für das mutante humane ATXN3 entstanden. Es zeigt sich außerdem, dass das endogene murine Ataxin-3 in allen Tieren exprimiert war, was an der schwachen Bande auf Höhe von 37 kDa nachzuvollziehen ist. Bei 40-43 kDa, wo das wildtypische humane ATXN3 zu erwarten wäre, findet sich für keine der Mäuse eine Bande. Die humane PatientInnenkontrolle dagegen weist Banden sowohl für das wildtypische als auch das mutante ATXN3 auf.

In der Quantifizierung bestätigten sich die visuellen Ergebnisse des *Western Blots*. Zuerst wurden die Expressionswerte des mutATXN3 auf Vinculin und die unbehandelte WT/YAC84Q-Maus normalisiert. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Werte zwischen den Tieren leicht schwankten, jedoch kein eindeutiger Unterschied bedingt durch die Behandlungsgruppe zu erkennen war. Die Expressionslevel des mutanten ATXN3 fallen in der Behandlungsgruppe der mutASO sogar höher aus als in der unbehandelten Maus und der Gruppe der wtASO. Die Expressionslevel des endogenen Atxn3 wiesen normalisiert auf Vinculin und die unbehandelte Maus zwar große interindividuelle Unterschiede auf, konnten jedoch auch keinem Trend zugeordnet werden. In beiden Behandlungsgruppen gab es einzelne Mäuse, die eine ähnliche oder eine erhöhte Expression des humATXN3 gegenüber der unbehandelten WT/YAC84Q-Maus aufwiesen. Die Expression des mutanten ATXN3 wurde ebenfalls auf das endogene Atxn3 und die unbehandelte Maus normalisiert. Auch hier lag eine breite Streuung der Werte vor, jedoch ohne erkennbaren Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen. Es lässt sich diskutieren, ob man andere Ergebnisse in der Behandlungsgruppe der mutASO mit 60 µg erwarten könnte. Da sich diese Konzentration jedoch während des Versuchs als stark toxisch erwiesen hatte, wurde der Versuch zum Schutze der Tiere vorzeitig beendet. Bei der Entscheidung wurde auch berücksichtigt, dass unter 30 µg der mutASO kein Therapieeffekt im *Western Blot* vorzufinden war. Dadurch wurden weniger Tiere behandelt und die Expressionsanalysen der RNA des Ataxin-3 wurde auch nicht mehr durchgeführt.

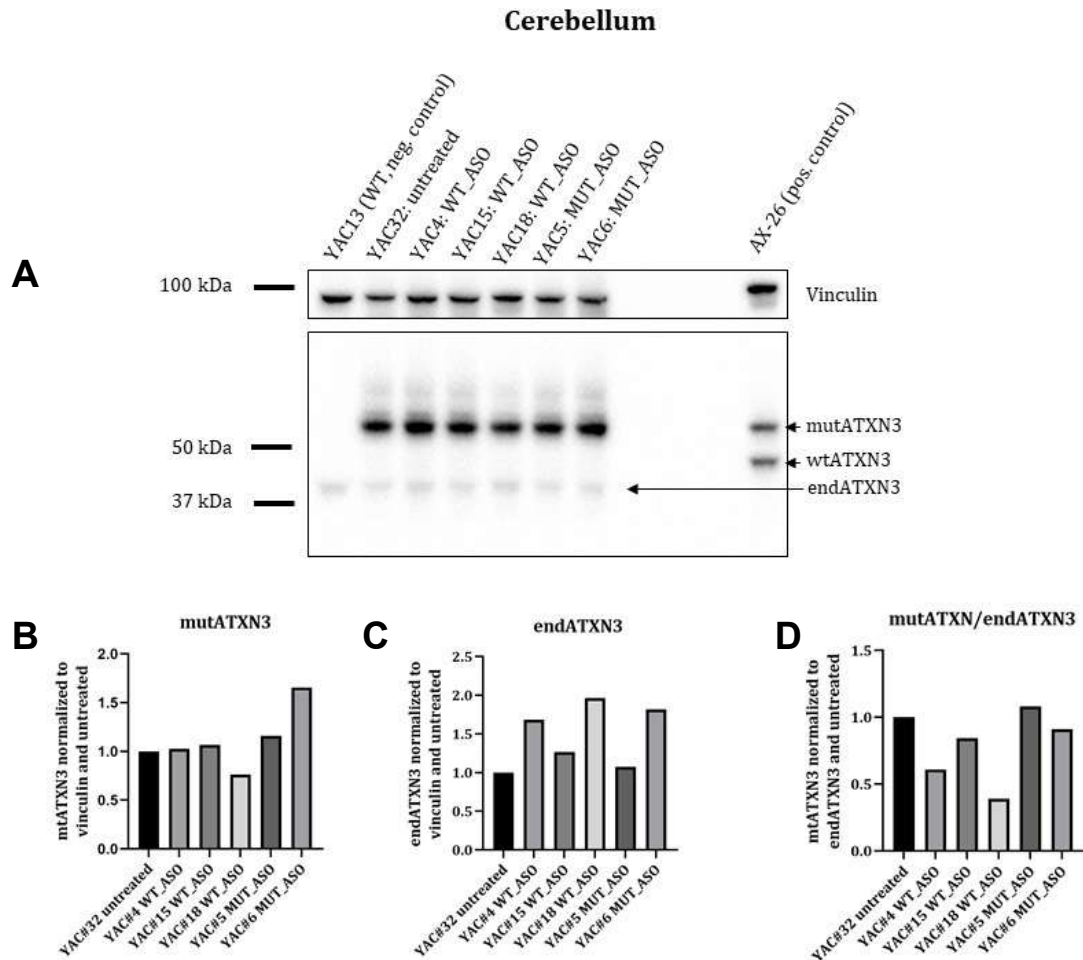


Abbildung 3.40 Ergebnisse des Western Blots aus dem Cerebellum

In der Abbildung werden die Ergebnisse des Western Blots der Proteinproben aus dem Cerebellum dargestellt. (A) Im oberen Bereich erkennt man, dass alle Proben eine Bande für die Vinculin-Ladekontrolle aufwiesen. In der rechten Spalte wurde zur Kontrolle zusätzlich eine humane PatientInnenprobe mitlaufen gelassen. Diese wies Banden für das mutante sowie für das wildtypische ATXN3 auf. Die wildtypische Kontrollmaus (linke Spalte fälschlich als YAC#32 bezeichnet) hatte nur eine Bande für endogenes Atxn3. Die WT/YAC84Q-Kontrollmaus sowie die behandelten WT/YAC84Q-Tiere zeigten Banden für das endogene Atxn3 und das humane mutante ATXN3.

Im unteren Bereich der Abbildung sind die Ergebnisse der Quantifizierung zu erkennen. (B) Links sind die Expressionswerte des mutATXN3 normalisiert auf Vinculin und die unbehandelte WT/YAC84Q-Maus dargestellt. Es zeigte sich, dass die Werte zwischen den Tieren leicht schwanken, es ließ sich jedoch kein Trend erkennen, zumal die Expressionslevel in der Behandlungsgruppe der mutASO höher ausfielen, also in der unbehandelten Maus und der Gruppe der wtASO. (C) Die Expressionslevel des endogenen Atxn3 wiesen normalisiert auf Vinculin und die unbehandelte Maus keinen eindeutigen Trend auf. Es gab in beiden Behandlungsgruppen Tiere, die eine ähnliche oder eine erhöhte Expression im Vergleich zur unbehandelten WT/YAC84Q-Maus aufwiesen. (D) Letztlich wurde die Expression des mutanten ATXN3 normalisiert auf das endogene Atxn3 und die unbehandelte Maus bestimmt. Auch hier lag eine breite Streuung der Werte vor, es ließ sich jedoch kein Trend bzw. Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen feststellen.

## 3.3.2.10 Zusammenfassung Studie 2

Tabelle 3.16 Übersicht der Ergebnisse Studie 2

| ASO           | Toxizität                          | Phänotyp                              | Gewicht                                                              | Präparation                       | Regulation ATXN3-Protein                 |
|---------------|------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------|
| <b>wtASO</b>  | 3 Tiere gestorben, 2 unter Narkose | 1 Maus neurologisch auffällig         | Abnahme nach OP, Erholung bis 7. Tag                                 | 1 Tier unter Narkose V.a. Ileus   | <b>Kontrollgruppe</b>                    |
| <b>mutASO</b> | 5 Tiere gestorben, 1 unter Narkose | <b>4 Mäuse neurologisch auffällig</b> | Abnahme nach OP, leichte Erholung, <b>massive Abnahme bis 7. Tag</b> | 3 Tiere V.a. Darm-Ischämie/ Ileus | Im Cerebellum keine erkennbare Reduktion |

In Tabelle 3.18 sind die Ergebnisse der Studie 2 zu den Allel-spezifischen ASOs in einer Übersicht mit Fokus auf der Toxizität, dem Gewicht, dem Phänotyp sowie der Regulation des ATXN3-Proteins dargestellt. In dicker Schrift sind die besonders relevanten Ergebnisse hervorgehoben. Es zeigt sich, dass in den Behandlungsgruppen mit der wtASO zwar 3 Tiere verstorben sind, davon 2 jedoch direkt unter der Narkose. Bei der mutASO sind insgesamt 5 Tiere verstorben, wovon eins unter Narkose verstarb. Die hohe Mortalität hatte sich auch schon durch den neurologischen Phänotyp angedeutet, welcher bei diesen 4 Tieren auffällig gewesen war. In der Gruppe der wtASO war eine Maus kurz nach den Operationen neurologisch auffällig, erholte sich jedoch frühzeitig wieder. Das Gewicht nahm kurz nach den Behandlungen in beiden Gruppen ab, konnte sich im Falle der wtASO bis zum 7. Tag wieder stabilisieren. Die mit der mutASO behandelten Tiere dagegen nahmen bis zum 7. Tag weiter stark an Gewicht ab.

Letztlich wurde die Expression des mutATXN3 im Cerebellum der Versuchstiere analysiert. Dabei zeigte sich keine Regulation des mutATXN3. Ebenso wurde keine Regulation des endogenen Atxn3 durch die ASOs festgestellt.

Insgesamt zeigte sich, dass die wtASO gut verträglich war, jedoch auch Auffälligkeiten bei den Versuchstieren hervorrief. Im Falle der mutASO zeigte sich eine starke Toxizität, die konzentrationsabhängig zu sein schien.

## 4 Diskussion

Die Spinocerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3) ist eine fatal verlaufende neurodegenerative Erkrankung (Riess et al., 2008). Sie beruht auf einer autosomal dominant vererbten, verlängerten CAG-Sequenz, die im zugehörigen Gen *Ataxin-3* liegt. Dadurch entsteht im entsprechenden Protein eine verlängerte Polyglutamin-Kette. Dieses Protein wird Ataxin-3 (ATXN3) genannt. Die SCA3 gehört zu den Polyglutamin-Erkrankungen (Kawaguchi et al., 1994; Schols, Amoiridis, et al., 1995). Die Veränderung der Proteinstruktur führt im Verlauf zu einer Ablagerung des veränderten Proteins in den Neuronen, vor allem im Cerebellum, im Hirnstamm und in den Basalganglien (Paulson, Perez, et al., 1997). Dies trägt wahrscheinlich zum Auftreten der typischen ataktischen Symptome im Alter von 30-50 Jahren bei. Diese bestehen vor allem in einer progressiven Koordinationsstörung. Ebenso können sowohl Seh- als auch Schluckstörungen auftreten. Die PatientInnen werden immobil und es kommt zu wiederholten Infektionen, vor allem zu Aspirationspneumonien. Letztlich verläuft die Erkrankung letal, da bis heute keine kausalen oder verlaufsmodifizierenden Therapien existieren (Kieling et al., 2007; Rub et al., 2008). Als symptomatische Therapien gibt es Physiotherapie sowie Medikamente aus dem Kreis der Parkinson-Pharmazeutika und Antiepileptika. Dadurch können die motorischen Symptome kurzfristig verbessert werden. Allerdings stellen sie keine zufriedenstellende Therapie dar, da die Symptome nur gelindert, die Progression jedoch nicht aufgehalten wird (Klockgether et al., 2019; Riess et al., 2008; Schols et al., 2000). Dennoch gibt es Hoffnung, da proteinreduzierende Gentherapien immer weiterentwickelt und in klinischen Studien untersucht werden. Antisense-Oligonukleotide (ASOs) sind gentherapeutische Mittel, die auf RNA-Ebene in die Proteinbiosynthese eingreifen (Bennett & Swayze, 2010). Im Falle der SCA3 wurden bereits einige ASO-Therapien *in vitro*, *in vivo* sowie klinisch untersucht (Moore et al., 2019; Moore et al., 2017; NIH, 2024a; Toonen et al., 2017). Die erste Phase I Studie wurde jedoch im Verlauf abgebrochen (NCT05160558). Eine weitere Phase I Studie läuft aktuell an (NCT05822908). Außer dem ASO-Ansatz gibt es weitere gentherapeutische Ansätze auf RNA-Ebene mittels RNA-Interferenz durch mikroRNA (Martier et al., 2019; Rodriguez-Lebron et al., 2013; Tang et al., 2023), siRNA (Alves et al., 2010; Conceicao et al., 2016) und shRNA (Nobrega et al., 2019).

In dieser Promotion wurden neuartige ASOs der dritten Generation getestet, die die ATXN3-Expression regulieren sollten. In einer ersten Studie (Studie 1) wurden allel-unspezifische und in einer zweiten Studie (Studie 2) wurden allel-spezifische ASOs getestet, die die mRNA des Ataxin-3 binden und herunterregulieren sollten. Die allel-spezifischen ASOs nutzen dafür einen Polymorphismus (SNP), der mit der expandierten CAG-Sequenz und damit dem krankheitsverursachenden Allel assoziiert ist. Dadurch soll nur dieses reguliert werden. Dieser SNP liegt bei 70% der PatientInnen weltweit vor und nur bei 2% der wildtypischen Gene (Alves et al., 2010; Hauser et al., 2022). Die ASOs wurden mittels stereotaktischer ICV-Injektion in die Gehirne der Versuchstiere eingebracht, da sie nicht Bluthirnschranken-gängig sind. Diese wurden nach 4 Wochen präpariert und auf die Expressionslevel der mRNA des mutanten Ataxin-3 bzw. das Expressionslevel des ATXN3 untersucht.

Zu Beginn dieser Promotionsarbeit wurden die SCA3-Versuchstiere aus der Reihe der WT/YAC84Q-Mäuse genotypisiert, wobei sich Wiederholungslängen zwischen 71-79 Wiederholungen ergaben. Damit entsprachen sie formal nicht mehr der Ursprungslinie, die 84 CAG-Wiederholungen aufwies (Cemal et al., 2002). Dennoch erreichten sie mit über 70 CAG-Wiederholungen den als pathologisch verlängerten definierten Bereich von über 60 (Da Silva et al., 2019; Kawaguchi et al., 1994). Auch in anderen Studien wurde gezeigt, dass sich die CAG-Sequenz in den nachgezüchteten Tieren über die Generationen verringert hat. Dies war damit assoziiert, dass die neurologischen Symptome nicht mehr vollständig abgebildet wurden, die histologischen Auffälligkeiten sowie die intrazellulären Aggregate aber weiter bestanden (Costa Mdo et al., 2013; Shakkottai et al., 2011; Toonen, Overzier, et al., 2018; Weber et al., 2020). Daher eignet sich das Modell weiterhin für Studien zur Wirksamkeit von proteinreduzierenden Therapien mittels Gentherapie. In Studien mit ASOs oder auch RNA-Interferenz konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass die zellulären Aggregate des ATXN3 im WT/YAC84Q-Mausmodell zuverlässig mittels Immunoblot oder Filtertrap (in der WT/YAC84Q-Kontrollgruppe) sowie deren Reduktion in der Behandlungsgruppe abgebildet werden konnten (Moore et al., 2019; Moore et al., 2017; Nobrega et al., 2013; Toonen et al., 2017). In manchen Studien wurden auch homozygote Tiere verwendet, in denen die Ausprägung sowohl der histologischen Merkmale als auch der Aggregate

stärker ausfiel. Somit konnte auch ein ausgeprägter Effekt durch die Therapie erwartet werden (Costa Mdo et al., 2013; Rodriguez-Lebron et al., 2013).

Im Rahmen der Versuche in dieser Promotion wurden Tiere im Alter von 7-10 bzw. 10-12 Wochen verwendet. Dadurch befanden sie sich noch im Wachstum, was sich auch in den Gewichtsverläufen widerspiegelte. Das Gewicht der Tiere nahm mit signifikanten Unterschieden zwischen Männchen und Weibchen konstant zu. Der Unterschied zwischen Männchen und Weibchen ist physiologisch. Er zeigt sich ebenso in der wildtypischen Linie (C57BL/6J), aus welcher die WT/YAC84Q-Mäuse gezüchtet wurden (JacksonLaboratory, 2024).

In Studie 2 fand sich ein leicht signifikanter Gewichtsunterschied zwischen den weiblichen YAC84Q-Mäusen und den wildtypischen Weibchen, was bei den männlichen Tieren lediglich als Trend ohne Erreichen von Signifikanz zu erkennen war. Ein geringeres Gewicht der WT/YAC84Q-Mäuse im Vergleich zu den wildtypischen Geschwistertieren wurde auch in der ersten Generation der WT/YAC84Q-Mäuse beschrieben (Cemal et al., 2002). Der erwähnte Unterschied, der sich hier zwischen WT/YAC84Q-Mäusen und ihren wildtypischen Geschwistern nur andeutet, entspricht dem Phänomen eines geringeren Gewichts von SCA3-PatientInnen im Vergleich zu Kontrollpersonen. Dies hat sich beim Menschen (Diallo et al., 2017; Saute et al., 2012) sowie auch in verschiedenen SCA3-Mausmodellen ausgeprägter als bei unseren Studien gezeigt (Boy et al., 2009; Haas et al., 2022; Hubener et al., 2012). Die WT/YAC84Q-Mäuse sind also vulnerabler, was Gewichtsschwankungen angeht. In einem SCA3-*KnockIn*-Modell war der Unterschied zwischen den SCA3-*KnockIn* und den wildtypischen männlichen Tieren größer als zwischen den weiblichen Tieren (Haas et al., 2022). In der Literatur wurde dieser Gewichtsunterschied anfangs nicht auf die SCA3 bedingte Dysphagie zurückgeführt. Die Gewichtsunterschiede wurden nämlich nicht größer, je stärker die Krankheit und damit die Dysphagie progredient war, sondern blieben konstant und bestanden von Beginn an (Saute et al., 2011; Saute et al., 2012). Stattdessen wurde eine Verbindung zu verändertem Insulin, den damit verbundenen Hormonen sowie deren Expression festgestellt. Hauptsächlich stellte sich eine Korrelation des Ausmaßes des Gewichtsunterschieds mit der CAG-Wiederholungslänge heraus (Saute et al., 2011; Saute et al., 2012). Diese Erkenntnis ist in den genetisch veränderten Mausmodellen jedoch schwer nachzuvollziehen, da die Versuchstiere meist

von einer ursprünglich veränderten Maus abstammen und somit alle ähnliche CAG-Wiederholungsanzahlen aufweisen. Später konnte zusätzlich gezeigt werden, dass doch auch ein kausaler Zusammenhang zwischen dem veränderten Gewicht und der SCA3-bedingten Dysphagie besteht, was auch für die Mausmodelle ein denkbarer Pathomechanismus wäre (Russo et al., 2015). Da das Gewicht bei Mäusen auch ein sensibler Indikator für das Wohlbefinden oder Stresssituationen darstellt, wurde es nicht nur über den gesamten Versuch hinweg wöchentlich, sondern auch intensiv in den Tagen nach den Injektionen erhoben.

Es ist bekannt, dass ASOs je nach Aufbau und Wirkweise toxische Eigenschaften haben können. Daher waren sowohl die Verträglichkeit des Verfahrens als auch Hinweise auf Toxizität der ASOs zu untersuchen. In klinischen Therapiestudien an PatientInnen wird zuerst beurteilt, ob eine Substanz toxische Effekte hat, bevor die Wirksamkeit untersucht wird. In einem aktuellen Review zu ASO-Therapien wurde zusammengefasst, dass es präklinisch zwar Forschung zur Toxizität gibt, dieses Thema insgesamt jedoch zu kurz komme, da in den *in vitro* und *in vivo* Studien vorrangig auf die Wirksamkeit geschaut wird (Goyenvallé et al., 2023). Daher wird in dieser Diskussion zuerst auf die Verträglichkeit der ASOs eingegangen, bevor die Wirksamkeit diskutiert wird.

Stereotaktische ICV-Injektionen stellen einen großen Eingriff dar. Publikationen zeigen, dass sie ein probates Mittel für die genaue Applikation von Therapeutika ins Gehirn von Nagetieren darstellen (Chen et al., 2018; DeVos & Miller, 2013; Ferry & Gervasoni, 2021). Dennoch stellen sie eine Belastung für die Tiere dar, sodass ein durchschnittlicher Gewichtsverlust zwischen 3-6% bedingt durch das Verfahren beschrieben ist. Der Verlust sollte aber 15% nicht übersteigen, da dies als Endpunkt der Studie definiert wurde (Fornari et al., 2012). Auch in unseren Studien stellte ein Gewichtsverlust von über 20% in Studie 1 bzw. über 10-20 % in Studie 2 den Endpunkt dar. Im Falle einer verträglichen Substanz ist davon auszugehen, dass sich die Tiere im Schnitt 7 Tage lang von den Eingriffen erholen und dass danach eine Erholung im Gewicht und Verhalten erwartet werden kann (Fornari et al., 2012). In unserer ersten Studie konnte gezeigt werden, dass das Gewicht in den ersten 3 Tagen nach den Injektionen abnahm, sich jedoch eine Woche danach wieder stabilisierte. Dieser Gewichtsverlauf war genauso in der Kontrollgruppe zu finden, welche Saline (die Kontrollsubstanz) ICV appliziert bekommen hatte. Dies ließ

einen unmittelbaren Einfluss der Operationen auf das Fressverhalten der Tiere vermuten und nicht eine generelle Unverträglichkeit der Substanzen. In der zweiten Studie nahmen die Tiere vor allem im Falle der mutASO auch langfristig an Gewicht ab. Es schien zum Effekt der OP ein dauerhafter Effekt durch die Therapie hinzuzukommen. In den vergleichbaren ASO-Studien an WT/YAC84Q-Mäusen finden sich leider keine dezidierten Angaben zur Gewichtsentwicklung nach den Injektionen. Dennoch wird in der Studie von Toonen et al. erwähnt, dass sich kein Einfluss der ASOs auf das Körpergewicht oder das motorische Verhalten der Tiere ergab (Toonen et al., 2017). In einer vorab durchgeführten Toxizitätsstudie von Moore et al. wurde der Effekt der ASO-Applikationen auf das Gewicht und das Verhalten von wildtypischen Tieren im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe untersucht. Auch im Hauptversuch an den WT/YAC84Q-Mäusen wurden diese wöchentlich gewogen und untersucht, wobei keine Unterschiede in der Gewichtsentwicklung oder anderen Faktoren zu den Kontrolltieren festgestellt werden konnten (Moore et al., 2017). Unsere Tiere wurden nach den Operationen jedoch täglich gewogen, wodurch sich die Gewichtveränderungen viel direkter und kleinschrittiger zeigten. Bei Moore et al. könnte sich ein Gewichtsverlust direkt nach den OPs innerhalb einer Woche wieder ausgeglichen haben.

Anders sah es für die die Mäuse unserer Studie 2 aus, die die allel-spezifische mutASO erhalten hatten. Die meisten Tiere, die die ersten Tage überlebt hatten, wiesen am 7. Tag zusätzlich zu neurologischen Auffälligkeiten so starke Gewichtsverluste auf, dass sie euthanasiert werden mussten. Es kann also davon ausgegangen werden, dass es sich eher um toxische Effekte der Substanz als um eine Nachwirkung der Operation handelte. Dennoch gibt es auch eine Verfahren-assozierte Mortalität. 2012 verglichen Fornari et al. das standardisierte Protokoll, das in den meisten Studien als Protokoll für die stereotaktischen Verfahren bei Nagetieren genutzt wird - und so auch bei uns verwendet wurde - mit einem neuen modifizierten Protokoll (Fornari et al., 2012). Das modifizierte Verfahren konnte die Sterberate nach den Injektionen senken. Entscheidende Bestandteile waren die Überwachung der Sauerstoffsättigung und der Herzfrequenz der Tiere während der Operationen sowie die perioperative Gabe von Sauerstoff, ähnlich einer Narkose beim Menschen. In unseren Studien haben wir auf solche Maßnahmen verzichtet und uns nach dem Standardprotokoll gerichtet, welches laut der Studie mit einer Mortalität von ca. 5% assoziiert war (Fornari et al., 2012). Dies würde die Ergebnisse unserer Studie 1 zu den

allel-unspezifischen ASOs erklären. Die Mortalität von 3,92% lag hier potenziell im OP-Risiko der ICV-Injektionen begründet und eher nicht in der ASO-Sequenz oder der Trägersubstanz. Auch in der ASO-Studie an WT/YAC84Q-Tieren von Moore et al. verstarb eine Maus bereits während der Operation, was die Forschungsgruppe ebenfalls eher dem Verfahren und nicht der ASO zuschrieb (Moore et al., 2017). Auch in den vergleichbaren ASO-Studien in der SCA3 von Toonen et al. sowie von Moore et al. zeigten sich weder eine erhöhte Mortalität noch andere Anzeichen für Toxizität durch die untersuchten ASOs (Moore et al., 2017; Toonen et al., 2017). Bei Toonen et al. wurden wiederholte ASO-Injektionen vorgenommen, wodurch sich eine Gesamtdosis von 1 mg ASO ergab, welche ebenfalls gut von den Tieren toleriert wurde. Es fanden sich keine Hinweise auf eine kumulative Toxizität (Toonen et al., 2017).

Im Falle unserer Studie 2 verstarben 3 von 15 Tieren perioperativ. Bei der Präparation fiel auf, dass diese Tiere einen schwarz gefärbten Darm hatten und stark dilatierte Darmschlingen vor einem stenotischen Abschnitt aufwiesen. Dies könnte auf einen Ileus oder einen Mesenterialinfarkt hinweisen. Bereits in der im Vorherein durchgeführten Toxizitätsstudie an wildtypischen Tieren starben alle (2 von 2) Tiere bei der Applikation von 150 µg der mutASO. Im Hauptversuch an den WT/YAC84Q-Mäusen starben 6 der 14 Tiere (entsprechend 42,86%). Aufgeteilt nach ASOs liegt die Mortalität für die mutASO sogar bei 6 von 8 Tieren, also 75%. Dieser Wert überschritt die verfahrensassoziierte Mortalität (5%) stark. Es ist jedoch auch zu erwähnen, dass sich in Studie 2 Probleme bei der Tierzucht ergeben hatten, da viele Jungtiere plötzlich verstarben. Dadurch fiel die Kohorte kleiner aus als vorab geplant. Dies erschwerte eine signifikante Aussage über den Therapieversuch, weshalb für spezifische tiefergehende Fragestellungen eine Wiederholung an einer größeren Gruppe sinnvoll sein könnte. Trotzdem zeigte sich eine eindeutige Unverträglichkeit der mutASO. Es ist daher zu diskutieren, wodurch die hohe Unverträglichkeit (die sich sowohl im Gewichtsverlust als auch im Phänotyp zeigte) sowie die hohe Mortalität in der Studie 2 zu den allelspezifischen ASOs verursacht wurde. In der Behandlungsgruppe der mutASO zeigten sich zudem neurologische Symptome, die sich in den meisten Fällen über mehrere Tage aggravierten. Bei manchen Tieren verbesserten sich die neurologischen Defizite jedoch wieder. Für ASOs ist bekannt, dass sie eine akute (Neuro-)Toxizität hervorrufen können. Diese tritt gewöhnlich in den Stunden unmittelbar nach der Applikation auf und

verbessert sich danach wieder (Hagedorn et al., 2022; Jia et al., 2023). Davon ist die sich über 1-2 Tage entwickelnde immunvermittelte Toxizität (Goyenvallé et al., 2023; Toonen, Casaca-Carreira, et al., 2018) und die hepatische Unverträglichkeit zu unterscheiden (Burdick et al., 2014; Hagedorn et al., 2013).

Um die Neurotoxizität genau zu untersuchen und objektiv festzustellen, haben wir in unseren Studien den *Wirehang*-Test durchgeführt. Bei diesem Test müssen die Tiere kopfüber an einem Gitter hangeln, wobei die Zeit gemessen wird, die sie am Stück durchhalten. Der Test wurde mit der Maximalzeit beendet, wenn die Mäuse fünf Minuten durchgängig gehangelt hatten. In einem lentiviral-basierten Mausmodell der SCA3 hat sich gezeigt, dass Mäuse mit 84Q vs. mit 28Q im Alter von 3 bzw. 6 Monaten signifikant schlechter in einem *Wirehang*-Test abschnitten als wildtypische Tiere derselben Linie und im selben Alter. Allerdings wurde der *Wirehang* hier als *Score* gemessen, der davon abhängig war, wie oft die Maus beim Hangeln in einer gewissen Zeit abfiel. Das grundsätzliche Prinzip war jedoch dasselbe, da die Hangelfähigkeit der Mäuse getestet werden sollte (Jansen-West et al., 2022). In unseren Versuchen waren die Tiere in Studie 1 etwa 2 Monate und in der 2. Studie 2,5-3 Monate alt. Es wurden nur WT/YAC84Q-Tiere untereinander verglichen, sodass kein Einfluss durch den Genotyp oder die Mauslinie zu erwarten war. In anderen ASO-Studien in der SCA3 lassen sich keine vergleichbaren Tests auf die neurologische Fähigkeit der Tiere nach den Applikationen finden, jedoch in ASO-Studien aus anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie der Parkinson-Erkrankung (Boutros et al., 2021; Yang et al., 2021; Zhao et al., 2017). Eine dieser Studien testete in einem Tiermodell der Parkinson-Erkrankung ASOs, die alpha-Synuclein binden. Die koordinatorische Fähigkeit der Tiere wurde vor und nach den Injektionen untersucht. Dafür wurde die Version des *Wirehang*-Tests auf Basis eines *Scores* gewählt. Es ergab sich, dass die Tiere, die die ASO ICV verabreicht bekommen hatten, eine schlechtere Performance im Test hatten als vor der Verabreichung, ebenso im Vergleich zu Tieren, die eine zerschnittene ASO verabreicht bekommen hatten. Das Ergebnis dieser Studie legt nahe, dass nicht nur die Prozedur an sich, sondern auch die Substanz als solche einen Einfluss auf die koordinatorischen Fähigkeiten hatte (Boutros et al., 2021). Zwei weitere ASO-Studien zur Behandlung der Parkinson-Erkrankung konnten durch die ASO-Applikation die *Wirehang*-Dauer in erkrankten Mäusen

verlängern, also deren motorische Fähigkeiten sowie Koordination verbessern (Yang et al., 2021; Zhao et al., 2017). Die beiden zitierten Studien haben den *Wirehang*-Test wie wir als Latenz bis zum Herunterfallen der Tiere gemessen. Es lässt sich diskutieren, ob verschiedene Arten der Durchführung des *Wirehang*-Tests auch verschiedene Ergebnisse liefern. Andererseits könnten die unterschiedlichen ASOs eine andere Verträglichkeit bzw. Neurotoxizität besitzen. Es könnte daher gut sein, dass der *Wirehang*-Test ein sensibles Maß für die Verträglichkeit bzw. Neurotoxizität der ASO ist, während er gleichzeitig eine Verbesserung der motorischen Fähigkeiten, also die Wirksamkeit der Behandlung zeigt. Für unsere beiden Studien ergab sich, dass die Tiere, die die Operation überlebt hatten, am Tag danach eine gute koordinatorische Fähigkeit aufwiesen. Im Falle der mutASO reduzierte sie sich jedoch im Verlauf einer Woche stark. Am 7. Tag wiesen sie ein starkes neurologisches Defizit auf. Dieses Defizit war dosisabhängig. Die mit der wtASO behandelten Tiere schnitten besser im Test ab, auch wenn hier die 60 µg Gruppe ein schlechteres Ergebnis hatte als die 30 µg Gruppe. Daraus ließ sich schlussfolgern, dass die mutASO einen neurologischen Phänotyp auslöste. Ihre Neurotoxizität wies zwei Komponenten auf, eine akute unmittelbar nach den Operationen sowie eine langfristige, welche sich über Tage entwickelte. Die wtASO wies dies alles nicht auf. Bei näherer Betrachtung der unterschiedlichen Sequenzen der beiden verwendeten ASOs in unserer Studie (siehe Kapitel 2.1.9) fällt auf, dass die mutASO 5 Guanine enthält (GGTCCCGCTGCTGC), während die wtASO nur 4 Guanine aufweist (GGTCCCCCTGCTGC). Die beiden ASOs unterscheiden sich also nur in der Base Guanin anstatt Cytosin. Dadurch sollte die mutASO das mutierte Allel spezifisch über den SNP c.987G>C (rs12895357) angreifen, welcher bei 70% der PatientInnen auf dem mutierten Allel zu finden ist. In der Aminosäuresequenz wird dadurch Glycin an Position 306 zu Arginin (p.Gly306Arg) (Alves et al., 2010; Hauser et al., 2022; Weishaupl et al., 2019). Hagedorn et al. haben 2022 einen Zusammenhang zwischen der ASO-Sequenz und einer erhöhten Toxizität sowie Mortalität beschrieben. Die Toxizität wurde vor allem durch die Anzahl an Guanin-Basen und deren Position in Bezug auf das 3' Ende bedingt. Je geringer dieser Abstand war, desto neurotoxischer fiel die ASO aus. Adenin-Basen in der Sequenz dagegen wirkten protektiv. Auch Cytosin und Thymin (T) Basen wirkten eher anti-toxisch, jedoch nicht so stark wie die Adenin-Basen (Hagedorn et al., 2022). Ein möglicher Mechanismus, der die Neurotoxizität vermittelt, wird bei Jia et al.

diskutiert. Dort wurde ein Zusammenhang zwischen der Neurotoxizität und dem intrazellulären Calcium in den Neuronen festgestellt (Jia et al., 2023). Durch die Applikation toxischer ASOs scheint eine dosisabhängige intrazelluläre Reduktion des freien Calciums *in vitro* zu entstehen. Dies korrelierten sie mit dem *in vivo* ausgelösten Phänotyp, der vor allem durch Hypoaktivität, eine veränderte Körperhaltung sowie motorische Defizite gekennzeichnet war (Jia et al., 2023). Diese Ergebnisse decken sich mit den Beobachtungen, die wir in unserer Studie 2 gemacht haben. Auch hier bewegten sich die Tiere kaum noch, wiesen teilweise einen starken Tremor auf und waren koordinatorisch stark geschwächt. Jia et al. konnten *in vitro* zeigen, dass der intrazelluläre Calciumgehalt entscheidend durch die ASO-Sequenz beeinflusst wurde und dass der intrazelluläre Calciumgehalt mit dem Ausmaß der Neurotoxizität korreliert war (Jia et al., 2023). Der Mechanismus scheint mit dem AMPA-Rezeptor jedoch nicht mit dem NMDA-Rezeptor zusammenzuhängen. Beide regulieren als Glutamatrezeptoren den Calciumeinstrom in die Neuronen. Toxische ASOs scheinen spontane Calcium-Oszillationen zu unterbinden, welche wichtig für die normale Homöostase der Neuronen sind. Die Daten legen nahe, dass der Effekt der ASOs auf die AMPA-Rezeptoren die spontanen Oszillationen beeinflusst (Hagedorn et al., 2022; Jia et al., 2023). In älteren Studien zeigte sich, dass einzelne Guanin-Nukleotide in Rattengehirnen Glutamat kompetitiv an AMPA-Rezeptoren hemmen können (Dev et al., 1996; Gorodinsky et al., 1993). Noch früher wurde dargestellt, dass einzelne Guanin-Nukleotide auch am NMDA-Rezeptor eine Bindungsstelle haben, die die Affinität des Rezeptors für den eigentlichen Liganden Glutamat sowie für weitere Liganden mindert (Baron et al., 1989; Monahan et al., 1988). Dies hat sich bisher für ASOs, die Guanine enthalten, nicht bestätigt (Hagedorn et al., 2022). Es wäre sicher interessant, dies in weiteren Untersuchungen tiefer zu beleuchten.

Als weitere mögliche Erklärung der Absenkung des Calciums durch ASOs mit erhöhtem Guanin-Anteil wird diskutiert, dass ASOs eher negativ geladene Moleküle sind, die die positiv geladenen Calciumatome binden könnten. Der Effekt bleibt bislang jedoch ungeklärt (Jia et al., 2023). In einem *Paper*-Vorabdruck von Moazami et al. wurde die Neurotoxizität verringert, in dem die ASOs vor ICV-Applikation in einen Calcium-enhaltenden Puffer gegeben wurden. Dadurch wurden die Bindungsstellen der ASOs mit Calcium gesättigt, sodass die Chelation von Calcium im ZNS verringert werden sollte.

Tatsächlich konnte die akute Neurotoxizität der ASOs gesenkt werden (Moazami et al., 2021).

Unabhängig vom genauen Mechanismus scheint es einen eindeutigen Zusammenhang zwischen der Anzahl und Position der Guanin-Basen und einer Neurotoxizität zu geben. Daher sollte die Sequenz unserer toxischen mutASO mit den im SCA3-Mausmodell gut verträglichen ICV applizierten ASOs der anderen Studien verglichen werden. Eine Übersicht über die ASO-Sequenzen, der Anzahl der Nukleotide sowie den Abstand zwischen dem 3' Ende sowie der Base Guanin findet sich in Tabelle 4.1. Die enthaltenen Guanin-Basen sind fettgedruckt.

*Tabelle 4.1 Publierte in vitro getestete ASO-Sequenzen in der SCA3*

| <b><u>Studie</u></b>                 | <b>ASO-Sequenz 3' nach 5'</b>                                  | <b>Anzahl Guanine</b> | <b>G-freie Sequenz zum 3' Ende</b> | <b>Referenz</b>       |
|--------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-----------------------|------------------------------------|-----------------------|
| <b>Studie 2<br/>Allel-spezifisch</b> | <u>CGTCGTCGCCCTGG</u><br>= 14 Nukleotide<br>Target SNP         | 5                     | 1                                  | (Hauser et al., 2022) |
| <b>Toonen<br/>ASO 10.4</b>           | <u>TCGTCGTCGCCCTGG</u> GATA<br>= 18 Nukleotide.<br>Target SNP  | 5                     | 2                                  | (Toonen et al., 2017) |
| <b>Moore<br/>ASO 5</b>               | GCATCTTTTCATACT <b>G</b> GC<br>= 18 Nukleotide<br>Target 3'UTR | 3                     | 0                                  | (Moore et al., 2017)  |

Die ASO, die sich in den Studien von Moore et al. bewährte und in weiteren Maus-Studien untersucht wurde (ASO 5) enthält insgesamt drei Basen Guanin. Auch die anderen ASOs, die Moore et al. testeten und die sich im Tiermodell als nicht toxisch erwiesen hatten, besaßen maximal drei Basen Guanin (Moore et al., 2017). Im Gegensatz dazu enthielten die durch Toonen et al. getesteten ASOs eine sehr hohe Anzahl an Guaninen. So wurden ASOs getestet, die 3, 5 und 7 Basen Guanin aufwiesen. Besonders herausstechend ist die überlappende Sequenz unserer mutASO mit der ASO 10.4 von Toonen et al., die auch den SNP c.987G>C (rs12895357) bindet und daher ebenfalls 5 Guanine beinhaltet (Toonen et al., 2017). Spannend ist vor allem, dass die ASO 10.4 in den Studien die beste Wirksamkeit erzielte und dabei keine Anzeichen erhöhter Toxizität zu haben schien (Toonen et al., 2017). Aufgrund der überlappenden Sequenz ist dies ein

bemerkenswerter Unterschied zu der sehr hohen Toxizität unserer mutASO. Dieser Unterschied sollte weiter untersucht werden.

Die ASOs in der Studie von Toonen et al. wurden zuerst in von PatientInnen stammenden Fibroblasten auf ihre Wirksamkeit getestet (Toonen et al., 2017). Unsere mutASO wurde vorab sogar in neuronalen Kulturen von PatientInnen auf ihre Wirksamkeit untersucht. Dafür wurden Fibroblasten der PatientInnen gewonnen und in das Stadium pluripotenter Stammzellen zurückgeführt. Daraus konnten wiederum Neuronen induziert werden. Die Wirksamkeit und Verträglichkeit auf zellulärer Ebene wurde in dieser Studie also direkt in der Zielzelle getestet (Hauser et al., 2022). Weiterhin untersuchten Toonen et al., wie auch wir, die Wirksamkeit ihrer ASOs im WT/YAC84Q-Mausmodell, wobei alle ASOs von Toonen et al. ihre Wirksamkeit entfalteten und ein verkürztes ATXN3 hervorriefen. Die ASO 10.4, also die ASO mit Überlappung zur Sequenz unserer ASO, erwies die stärkste Effizienz. Auch im Applikationsverfahren lagen keine entscheidenden Unterschiede vor, außer dass Toonen et al. eine höhere Dosis und mehrfache Dosen verabreichten (Toonen et al., 2017). Dies stellt jedoch auch keine hinreichende Erklärung dar, da dadurch eher eine erhöhte Toxizität zu erwarten wäre.

Der entscheidende Unterschied könnte in der ASOs selbst zu finden sein. So ist die bei Toonen untersuchte ASO sowohl in 3' als auch in 5' Richtung um einige Basen länger als unsere mutASO. Dies könnte entscheidend sein, da in der Literatur beschrieben ist, dass abgesehen vom gesamten Guanin-Gehalt der ASO-Sequenz auch der Abstand der Guanin-Basen zum 3' Ende wichtig ist (Hagedorn et al., 2022; Jia et al., 2023). In einer Studie zu einer ASO für die Duchenne Muskeldystrophie wurde ebenfalls eine unerwartete akute Reaktion nach der systemischen Applikation gezeigt. Diese konnte durch das Austauschen einer einzigen Base verhindert werden. Die Studie legt nahe, dass sehr kleine Unterschiede in der Sequenz das Verhalten und die Verträglichkeit der ASOs gravierend verändern können (Aupy et al., 2020). Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden ASOs ist der Wirkmechanismus. Unsere mutASO sollte die RNaseH1 rekrutieren, um die gebundene mRNA abzubauen, während die ASO bei Toonen et al. mittels *Exon-Skip* funktioniert (Hauser et al., 2022; Toonen et al., 2017). Die unterschiedlichen Funktionsweisen benötigen verschiedene chemische Modifikationen, die wiederum die Verträglichkeit der ASOs beeinflussen. Die RNaseH1 benötigt Anteile

an Desoxyribonukleotiden, um die ASOs mit gebundener mRNA zu binden. Diese sind jedoch für den Abbau durch Nukleasen gefährdet. Ribonukleotide haben eine erhöhte Affinität für die *Target*-RNA und weisen eine geringe immunstimulierende Komponente sowie eine höhere Stabilität auf. Daher werden ASOs mittlerweile als sogenannte *Gapmers* hergestellt (Geary et al., 2015; Helm et al., 2022; Lima et al., 2007; Monia et al., 1993; Rook & Southwell, 2022). Dadurch werden die Vorteile beider kombiniert. Bei einer *Gapmer* ASO liegen innen Desoxyribonukleotide vor, die gut durch die RNaseH1 erkannt werden. Außen werden sie von modifizierten Ribonukleotiden flankiert. Die verschiedenen Wirkweisen der ASOs sowie die chemischen Modifikationen über die Generationen der ASOs hinweg sind auch in den Kapiteln 1.4.1 sowie 1.4.2 beschrieben. Im Falle unserer Studie 2 mit ASOs haben wir genau solche mit *Gapmer Design* verwendet. Diese wurden darüber hinaus als LNAs (*Locked Nucleic Acids*), also als „Schlösser“ designt. Über eine Etherbindung wird eine zirkuläre Struktur gebildet. Es ist jedoch beschrieben, dass LNAs in anderen Erkrankungen in den klinischen Tests oft als toxisch eingestuft wurden. Das Problem waren vor allem eine ausgeprägte Hepato- und Nephrotoxizität (Burel et al., 2016). Da unsere ASOs ins ZNS appliziert wurden und nicht BHS-gängig sind, war nicht davon auszugehen, dass sie Leber und Nieren erreichten. Für *Gapmer* ASOs ist eine dosisabhängige Neurotoxizität im Menschen beschrieben (Moazami et al., 2021). Die Anzahl an LNAs schien auch einen Unterschied bezüglich der Neurotoxizität auszumachen (Hagedorn et al., 2022). Bei Moore et al. kamen *Gapmers* mit jeweils 5 2'-O-Methoxyethylierten (2'MOE) Ribonukleotiden an beiden Rändern zum Einsatz, welche die unmodifizierten Desoxyribonukleotide flankierten (Moore et al., 2017). Der Unterschied zu unseren ASOs bestand also in den 2'-MOE-Nukleotiden im Gegensatz zu den LNAs bei unseren ASOs. Bei Toonen et al. kamen ausschließlich 2'-MOE-Nukleotide, also reine Ribonukleotide zum Einsatz. Dies war möglich, da der Mechanismus mittels *Exon-Skip* funktionierte und nicht die RNaseH1 rekrutieren musste. Die 2'MOE-Zucker-Modifikationen erwiesen sich als verträglicher und waren mit geringeren Calciumreduktionen im ZNS assoziiert (Jia et al., 2023). Insgesamt fanden sich jedoch keine eindeutigen Ergebnisse bezüglich unterschiedlicher Neurotoxizität zwischen den LNAs und den 2'MOE-Nukleotiden (Jia et al., 2023). Auch bei Hagedorn et al. wurden für die Modifikationen der Ribose keine eindeutigen Ergebnisse gefunden.

(Hagedorn et al., 2022). Bekannt ist, dass 2'-MOE modifizierte ASOs Proteine schwächer binden als andere Ribose-Modifikationen (Liang et al., 2016; Vickers & Crooke, 2016). Davon abgesehen wurde herausgefunden, dass das physiologische Vorliegen eines Phosphodiesterers im Rückgrat besser verträglich ist als die modifizierte und damit stabilere Form als Phosphothioat-Rückgrat (PS) (Hagedorn et al., 2022; Jia et al., 2023). In unserer 2. Studie wurden ASOs verwendet, die mit einem PS-Rückgrat gestaltet waren, ebenso wie die bei Toonen et al. beschriebene ASO (Hauser et al., 2022; Toonen et al., 2017). Hierin bestand also kein Unterschied. Auch die gut verträglichen ASOs von Moore et al. beinhalten ein PS-Rückgrat, da dieses die Stabilität sowie die Bioverfügbarkeit verbessert. Es wurde allerdings mit Phosphodiester-Anteilen gemischt - was als gemischtes Rückgrat bezeichnet wird - um die Verträglichkeit zu verbessern (Mansoor & Melendez, 2008; Moore et al., 2017). Eine Möglichkeit wäre, dass die Kombination aus *Gapmer* ASOs mit den LNAs und dem schlechter verträglichen reinen PS-Rückgrat unserer ASO den Nachteil gegenüber den besser verträglichen ASOs ausmachte.

Ein weiterer zu bedenkender Aspekt ist die Anzahl an Nukleotiden je ASO, wobei unsere ASO mit 14 Nukleotiden kürzer als die vergleichbaren ASOs mit jeweils 18 Nukleotiden war. In systematischen Studien zur Toxizität von ASOs wurde zwar festgestellt, dass die neurotoxischen Effekte unabhängig von der Anzahl an Nukleotiden auftraten (Hagedorn et al., 2022). Andererseits wurde gezeigt, dass die LNA-Modifikationen die ASOs unspezifischer binden lassen. Dies erhöht die Gefahr für *Off-Targets*, welche umso größer sind, je geringer die Anzahl an Nukleotiden ist (Burel et al., 2016; Kasuya et al., 2016).

Dies sind alles Hypothesen, die versuchen, die akute Neurotoxizität der ASOs zu erklären. In der Studie von Jia et al. wurde beobachtet, dass sich diese akute Neurotoxizität innerhalb von 24 Stunden wieder zurückbildete (Jia et al., 2023). Ebenso beschrieben Hagedorn et al., dass die akute Toxizität im Laufe der ersten 24 Stunden nach den Injektionen auftrat, dann wieder rückläufig war und auch nicht wieder vorkam. In unserer Studie zur mutASO ließ sich sowohl die akute Neurotoxizität als auch eine langfristige Komponente feststellen. Die chronische Komponente wies einerseits neurologische Symptome auf als auch systemische Effekte wie die starke Gewichtsabnahme und die Mortalität. Es stellt sich die Frage, wodurch die zusätzliche chronische bzw. systemische Komponente der Toxizität vermittelt wurde. Eine

Hypothese wäre die unabhängig beschriebene Hepatotoxizität von ASOs, die sich über Tage und Wochen entwickelt (Hagedorn et al., 2022).

Generell ist bekannt, dass eine zu hohe Dosierung sowie die spezifischen chemischen Modifikationen der ASOs eine renale und hepatische Toxizität bedingen können (Burdick et al., 2014; Hagedorn et al., 2022). Diese Toxizität bestehe unabhängig von der Menge an transkribiertem Target (Hagedorn et al., 2013). Auch in diesem Zusammenhang wurde bereits beschrieben, dass der toxische Effekt auf die Leber vom Guanin-Gehalt der ASO abhängt. Außerdem haben sich besonders die Sequenzen TGC und TCC als toxisch erwiesen, welche einerseits *in vitro* vermehrt hepatozelluläre Proteine gebunden, andererseits Stresssignalwege aktiviert haben. Dies wurde als mögliche Erklärung in Erwägung gezogen. Ebenso haben verschiedene chemische Modifikationen wie die LNA-Ribose-Modifikation oder die *Gapmers* einen toxischen Effekt erwiesen (Burdick et al., 2014; Swayze et al., 2007). Es wurde ein Zusammenhang mit dem Wirkmechanismus mittels RNaseH1 hergestellt. Diese soll aufgrund einer Stimulation durch die LNAs *Off-Target* mRNAs zerschnitten und so toxische Einflüsse ausgeübt haben (Burel et al., 2016; Kasuya et al., 2016). Andererseits wurde für *Gapmer* ASOs mit PS-Rückgrat, die systemisch appliziert wurden, gezeigt, dass sie zelluläre Proteine stark binden und im Nukleolus akkumulieren. Dabei scheint die Rekrutierung der RNaseH1 durch die ASOs eine entscheidende Rolle zu spielen. Die Toxizität scheint mit dieser Wirkweise der ASOs zusammenzuhängen. Außerdem wird die Expression der RNaseH1 durch die Bindung an PS-ASOs hochreguliert, was mit einer starken Hepatotoxizität korreliert war (Shen et al., 2019). Allerdings wurden die ASOs in allen zitierten Studien systemisch verabreicht. In unseren Studien dagegen wurden die ASOs intracerebal appliziert, da sie nicht BHS-gängig sind (Agrawal et al., 1991; Geary et al., 2015). Daher ist prinzipiell davon auszugehen, dass sie nicht aus dem ZNS in den systemischen Kreislauf übergegangen und nicht in Kontakt mit den inneren Organen gekommen sind. Erwartungsgemäß sollten sie keinen Effekt auf Leber oder Niere haben. Zur Sicherheit haben wir in unseren Studien bei der Präparation der Tiere auch Leber und Niere entnommen und makroskopisch beurteilt, wobei keine Auffälligkeiten festgestellt werden konnten. Aus der internen Kommunikation mit der pharmazeutischen Firma, die die ASOs für Studie 1 entwickelt hat, ergab sich, dass keine der ASOs in der Leber oder der Niere der Versuchstiere nachgewiesen werden konnte. Daher gingen wir auch in Studie 2 davon aus, dass die

ASOs das ZNS nicht verließen. Dennoch wäre es hilfreich gewesen, die inneren Organe auf Spuren der ASOs zu testen.

Da in Zusammenschau all dieser Aspekte eine ASO-vermittelte Hepatotoxizität als Erklärung der Symptome für die mutASO eher unwahrscheinlich zu sein scheint, ist über die Möglichkeit einer immunvermittelten Toxizität zu diskutieren.

Für die Applikation der ASOs direkt ins Gehirn ist bekannt, dass dort eine Immunreaktion ausgelöst werden kann. Ausdruck dessen ist eine Aktivierung der Astrozyten und der Mikroglia. Toonen, Casaca-Carrerira et al. haben 2018 gezeigt, dass ASOs mit 2'-O-Methylierung (2'-O-Me) der Ribose und PS-Modifikation noch 2 Monate nach ICV-Applikation eine Immunaktivierung im Gehirn aufwiesen. Dies war an der Hochregulierung spezifischer Immungene sowie in immunhistochemischen Färbungen für astrozytäre und mikrogliale Aktivierung erkennbar (Toonen, Casaca-Carreira, et al., 2018). Daher untersuchten auch Moore et al. nach ihren Injektionen Hinweise einer Immunaktivierung. Es zeigte sich keine erhöhte Aktivität der Parameter für mikrogliale Aktivierung (Moore et al., 2017). Weiterhin scheint es einen Zusammenhang zwischen den ASO-Sequenzen und einer Immunaktivierung zu geben. Hier sind wieder Polyguanin Bereiche am 3'Ende der ASOs relevant. Sie verbessern die zelluläre Aufnahme der ASOs, indem sie dreidimensionale Quartärstrukturen bilden, die spezifische Rezeptoren binden können, wie beispielsweise den *Scavenger* Rezeptor auf Monozyten (Kutyavin et al., 2002; Lee et al., 2000; Pearson et al., 1993). Diese Strukturen werden unabhängig von der *Watson-Crick*-Basenpaarung geschlossen, nämlich durch eine Selbstaggregation über die Seitenketten der Guanine. Dies konnte durch Substitution der Seitenketten mit anderen chemischen Molekülen unterbunden werden (Kutyavin et al., 2002). Es wurde gezeigt, dass die ASOs in Makrophagen aufgenommen wurden und diese stimulierten. Übertragen auf das Gehirn, wo es aufgrund der Bluthirnschranke ein eigenes Immunsystem gibt, käme eine Aufnahme der ASOs in die Mikroglia infrage (Dalpke et al., 2002). Mikroglia entsprechen den Makrophagen im Gehirn und weisen Überschneidungen zwischen den Rezeptoren mit den systemischen Immunzellen auf (Wilkinson & El Khoury, 2012). Es ist daher zu diskutieren, ob auch die cerebral applizierten ASOs mit hohem Guanin-Anteil solche 3D Strukturen bilden. Darüber könnten sie im Gehirn an bestimmte Rezeptoren binden und toxische oder immunologische Signalwege aktivieren. Allerdings handelt sich bei den beschriebenen

Studien um Untersuchungen zu Guanin-Ketten und nicht zu einem generell hohen Guanin-Anteil, der über die gesamte Sequenz verteilt ist, wie es bei unserer mutASO der Fall war.

Auch CG-reiche Oligonukleotide sind seit Längerem dafür bekannt, bei systemischer Applikation das Immunsystem zu aktivieren. Im Falle von Vakzinierungen wird dies genutzt, um die Impfung effektiver zu gestalten, was im Falle therapeutischer Ansätze jedoch unerwünscht ist (Dalpke et al., 2002; Kandimalla et al., 2001; Krieg et al., 1995). Des Weiteren verbessern CG-Elemente die zelluläre Aufnahme, was einerseits therapeutisch wichtig ist, andererseits aber auch den immunstimulierenden Effekt mitbegünstigt. Entscheidende Rollen werden den Seitengruppen der Basen zugeschrieben, da wiederum Modifizierungen dieser die Immunstimulierung verringerten (Kandimalla et al., 2001). Außerdem wurde die Entstehung von encephalitogenen T-Zellen *in vivo* durch CG-haltige ASOs festgestellt. Dabei handelt es sich um autoimmune T-Zellen, die durch Angreifen des Myelins zur Encephalitis geführt haben. ASOs scheinen also eine Autoimmunaktivierung hervorrufen zu können (Segal et al., 2000). Da die CG-Motive von 5' nach 3' der Sequenz gelesen werden, beinhaltet unsere mutASO nur ein solches Motiv (3'CGTCGTCGCCCTGG5'). Es ist also fraglich, inwiefern dieses als Erklärung der Toxizität dienen kann. Der Zusammenhang zwischen solchen Motiven, die bekannterweise das Immunsystem aktivieren und einer Unverträglichkeitsreaktion auf ICV-applizierte ASOs stellt dennoch eine interessante Forschungsfrage dar.

Ein weiterer spannender Aspekt ist, dass die Tiermodelle andere Immunsysteme besitzen als der Mensch. Es ist beschrieben, dass die Aktivierung des Komplementsystems in Affen weitreichendere Folgen für die Verträglichkeit von Substanzen hat als beim Menschen. Man tendiert dazu, eine Substanz im Affenmodell als unverträglicher einzuschätzen, sofern sie das Komplementsystem aktiviert (Shen et al., 2014). Bei Mäusen wird vermutet, dass sich die ASO-Sequenz toxischer auswirkt, als sie es beim Menschen tun würde. Die Sequenz-bedingte Toxizität wird also eher überschätzt, denn Mäuse scheinen sensibler auf bestimmte Basenabfolgen oder Basenanzahlen zu reagieren (Weber et al., 2012). Ferner wurde festgestellt, dass dieselbe ASO verschieden starke toxische Effekte in verschiedenen Mauslinien hatte. Der Effekt fiel in der Mauslinie C57BL/6J, also der Linie, aus der auch die WT/YAC84Q-Mäuse hervorgehen,

gravierender aus als in anderen Mauslinien (Jia et al., 2023). Es konnte gezeigt werden, dass die Regulation der AMPA-Rezeptoren durch Calcium in beiden Linien verschieden ausfiel (Menard et al., 2004). Dies wäre eine spannende Beobachtung für unsere mutASO, da zu vermuten ist, dass die Toxizität unter anderem durch den Guanin-Gehalt der ASO, also durch die Sequenz vermittelt wurde.

Ein weiterer Aspekt der Diskussion der Unverträglichkeit ist das Geschlecht der Versuchstiere. In unserer Studie 1 zu den allel-unspezifischen ASOs wurden im Schnitt doppelt so viele Männchen wie Weibchen je Versuchsgruppe getestet. Männchen und Weibchen wurden dieselben ASO-Konzentrationen appliziert. In Studie 2 zu den allel-spezifischen ASOs war der Anteil an weiblichen Tieren mit 66,6% noch größer. Es fällt auf, dass in den vergleichbaren Studien in der SCA3 (ohne Angabe von Gründen) ausschließlich männliche WT/YAC84Q-Mäuse mit ASOs behandelt wurden, welche diese durchgehend gut vertragen hatten (Moore et al., 2017; Toonen et al., 2017). In einer Studie zur Toxizität von ASOs wurde berichtet, dass männliche und weibliche Tiere toxische ASOs unterschiedlich schlecht vertragen, wobei Weibchen robuster als die Männchen zu sein schienen. Jedoch wurden Weibchen getestet, die genauso schwer waren wie die Männchen (Jia et al., 2023). Bei uns waren die Weibchen signifikant leichter als die Männchen, da die Tiere im selben Alter sein sollten. Daher fielen die Männchen bei uns absolut gesehen robuster aus, was beispielsweise Gewichtsschwankungen angeht. Bei der SCA3 handelt es sich um eine autosomal vererbte Erkrankung, weshalb beide Geschlechter betroffen sind. Im Hinblick darauf, dass an der SCA3 nicht nur Männer, sondern genauso Frauen erkranken, ist es unerlässlich, die entsprechenden Therapiestudien auch an beiden Geschlechtern durchzuführen. Eventuelle geschlechtsbedingte Einflüsse könnten so aufgedeckt werden. Es wäre allerdings zu diskutieren, ob Männchen und Weibchen im Tierversuch getrennt beobachtet und ausgewertet werden sollten. Gegebenenfalls könnten gewichtsadaptierte Konzentrationen verabreicht werden.

Zusammenfassend lässt sich für unsere 2. Studie zu den allel-spezifischen ASOs schwer differenzieren, was der Hauptgrund für die hohe Toxizität und Mortalität war. Naheliegender scheint, dass die akut unter der Narkose verstorbenen Tiere schon zuvor eine beginnende Darmpathologie aufwiesen, welche unter der Narkose aggraviert wurde und

letal verlief. Außerdem könnten die unter der OP verstorbenen Tiere dem Risiko des Verfahrens unterlegen sein. Die im Verlauf verstorbenen Tiere entwickelten ihre Auffälligkeiten im Anschluss an die Injektionen entsprechend einer akuten Neurotoxizität. Dies ließe sich im Zusammenhang eines toxischen Effekts der mutASO sehen, was wiederum zum erhöhten Guanin-Gehalt der ASO-Sequenz sowie den chemischen Modifikationen passen könnte. Jedoch verlief die Verschlechterung des Zustandes auch nach 24 Stunden progressiv, was eher zu einer systemischen oder immunbedingten Unverträglichkeit passen würde. Auch könnte eine chronische Neurotoxizität durch die ASOs ausgelöst worden sein, die so bisher noch nicht beschrieben wurde. Makroskopisch ergab sich kein Hinweis auf eine Veränderung am Hirngewebe, allerdings haben wir keine tiefergehenden immunhistochemischen Färbungen durchgeführt. Dies wären sicher wichtige Untersuchungen für zukünftige Studien. An den inneren Organen konnten wir keine Auffälligkeiten finden.

Abgesehen von der Verträglichkeit der ASOs ist das eigentliche Therapieziel zu beurteilen. Die genaue Definition dessen ist wichtig. Mithilfe von ASOs sollte sowohl in einem allel-unspezifischen als auch in einem allel-spezifischen Ansatz das Erkrankungsprotein ATXN3 und diesem vorgeschaltet die zugehörige mRNA herunterreguliert werden. Der Vorteil des allel-spezifischen Ansatzes bestand darin, dass nur das mutierte Allel herunterreguliert werden sollte, das wildtypische dagegen weiter exprimiert wird. So kann das gesunde Protein weiterhin seine physiologische Funktion im Organismus ausüben (Hauser et al., 2022). Dafür wurde der SNP c.987G>C (rs12895357) genutzt, da dieser mit dem mutierten Allel assoziiert ist und direkt hinter der CAG-Sequenz liegt. Die mutASO wurde dafür designt, genau diesen SNP zu binden, sodass das wildtypische Allel aufgrund der unpassenden *Watson-Crick*-Basenpaarung nicht gebunden wird. Den SNP tragen ca. 70% der SCA3-PatientInnen weltweit sowie die gesamte Tübinger Kohorte und nur 2% der wildtypischen Allele (Alves et al., 2010; Hauser et al., 2022). Außerdem gibt es einige wenige PatientInnen, die den SNP c.987C>G auf dem wildtypischen Allel und die andere Version, also G>C, auf dem mutanten Allel exprimieren. Für dieses Kollektiv wäre die wtASO eine mögliche allel-spezifische Therapieoption. Der genaue Mechanismus der Allel-Spezifität ist im Kapitel 3.3.2.2 beschrieben und in Abbildung 3.32 graphisch dargestellt. In der WT/YAC84Q-

Maus ist zu beachten, dass die Tiere ausschließlich das mutante humane *ATXN3* mit dem SNP c.987G>C tragen, da das eingefügte Gen aus einem menschlichen Patienten und SNP-Träger kloniert wurde (Toonen et al., 2017). Die WT/YAC84Q-Maus trägt jedoch nicht das wildtypische humane Gen. Es war also nur durch die mutASO - jedoch nicht durch die wtASO - eine Regulation zu erwarten. Stattdessen besitzt die Maus noch zweimal das murine wildtypische *Atnx3*. Daher ist zu bedenken, dass alle ASOs in diesem Modell - unabhängig davon, ob sie allel-spezifisch oder unspezifisch sind - nur das humane mutante *ATXN3* regulieren können. Normalerweise sollte das murine *Atnx3* nicht reguliert werden, was bereits vor den Studien mittels *in silico* Verfahren analysiert wurde. Daher kann im Mausmodell nicht unterschieden werden, ob es durch den *KnockOut* des humanen wildtypischen *ATXN3* unerwünschte Effekte gibt, da die Maus ihr endogenes wildtypisches *Atnx3* weiter exprimiert. Dennoch gibt es andere *KnockOut*-Mäuse, bei denen auch der gesamte *KnockOut* gut vertragen wurde (Schmitt et al., 2007; Switonski et al., 2011).

In unseren beiden Studien konnte keine Regulation des mutanten *ATXN3* bzw. dessen RNA in den beiden Hirnregionen Cerebellum und Hirnstamm festgestellt werden. Nur die ASO 3 der Studie 1 zeigte im Frontalen Cortex eine leicht signifikante Reduktion von 26% in der 30 µg Gruppe. In der 10 µg Gruppe sowie der 100 µg Gruppe dagegen war keine Reduktion im Vergleich zur Kontrollgruppe zu finden. Die Regulation schien also nicht konzentrationsabhängig zu sein. Allerdings fand sich in der 30 µg Gruppe eine reduzierte Stichprobe von 4 im Vergleich zu den sonst 6 Versuchstieren, was die Aussagekraft einschränken könnte. Daher wäre zu überlegen, den Versuch mit einer größeren Stichprobe zu wiederholen. Interessanterweise wies ASO 3 als einzige der allel-unspezifischen ASOs eine leichte Unverträglichkeit auf. Dies könnte gegebenenfalls im Zusammenhang mit der Regulation stehen. Die anderen allel-unspezifischen ASOs erreichten auch im Frontalen Cortex keine Regulation der RNA des *ATXN3*. Auch die mutASO konnte im *Western Blot* keine Reduktion des *ATXN3* erreichen. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der anderen ASO-Studien in der SCA3, in welchen durch die ASO-Applikation eine Reduktion des Erkrankungsproteins von über 50% in den Hauptpathogenese-Orten erreicht werden konnte (Moore et al., 2017) oder eine signifikante Menge an verändertem *ATXN3* mittels *Exon-Skip* gebildet wurde (Toonen et al., 2017). Bei der Diskussion der Unterschiede der Wirksamkeit ist zuerst der

Studienaufbau bzw. das Studiendesign zu beleuchten. Bereits das Applikationsverfahren hat einen entscheidenden Einfluss auf den Erfolg bzw. die Wirksamkeit der Therapie. In unseren beiden Studien wurde als Applikationsmethode genauso wie in den vergleichbaren ASO-Studien zur SCA3 die stereotaktische Injektion in die lateralen Hirnventrikel verwendet. Es finden sich Studien, die unilateral injiziert haben (Moore et al., 2017) oder die ASOs wie bei uns bilateral verabreicht haben (Toonen et al., 2017). Aufgrund der Verbindung der beiden Ventrikel ist fraglich, ob sich dadurch Unterschiede in der Verteilung der ASOs ergeben haben oder ob die ASOs jeweils gleichmäßig durch die Liquorzirkulation im Gehirn verteilt wurden. Alle Studien verwendeten hemizygote Tiere desselben bekannten WT/YAC84Q-Mausmodell der SCA3. McLoughlin et al. untersuchten weiterhin den Effekt ihrer wirksamsten ASO in homozygoten YAC84Q-Mäusen, da diese einen deutlicheren Motorphänotyp ausprägen (McLoughlin et al., 2018). Ein weiterer Aspekt, der beim Vergleich der Studienprotokolle auffällt, ist die Auswahl der Koordinaten für die stereotaktischen Injektionen. Diese sind in Tabelle 4.3 zu erkennen.

*Tabelle 4.2 Koordinaten der ICV-Injektionen in den SCA3 ASO-Studien*

| Koordinaten in Bezug zu Bregma | Studie 1 | Studie 2 | (Moore et al., 2017) | (Toonen et al., 2017) |
|--------------------------------|----------|----------|----------------------|-----------------------|
| Medial-lateral                 | ±2,6 mm  | ±0,26 mm | 1 mm                 | 1 mm                  |
| Anterior-posterior             | 0,9 mm,  | 0,9 mm   | 0,3 mm,              | 0,2 mm                |
| Dorsal-ventral                 | -2,3 mm  | -2,3 mm  | -3 mm                | -2,2 mm               |

Es fällt auf, dass unsere Koordinaten vor allem in Studie 1 lateraler sowie weiter posterior als in den vergleichbaren Protokollen ausfallen. Grundsätzlich sollen in allen Studien die Ventrikel der Mausgehirne erreicht werden, um die Zirkulation des Liquor cerebrospinalis zur Verteilung der ASOs im Gehirn zu nutzen. Da in allen drei verglichenen Studien dasselbe Mausmodell der WT/YAC84Q-Mäuse verwendet wurde, kann grundsätzlich davon ausgegangen werden, dass sich die Ventrikel an derselben Stelle befanden. Dennoch haben auch das Alter - solange sich die Tiere noch im Wachstum befinden - und die Größe der Tiere einen nicht zu unterschätzenden Einfluss auf die Lage und Ausdehnung der Ventrikel. In unseren Studien wurden die Tiere im

Alter von 7-10 Wochen (allel-unspezifisch) bzw. 10-12 Wochen (allel-spezifisch) behandelt. Bei Moore et al. und bei McLoughlin et al. waren die Tiere 8 Wochen und bei Toonen et al. zwischen 2 und 2,5 Monaten alt (McLoughlin et al., 2018; Moore et al., 2017; Toonen et al., 2017). Auch diese Altersunterschiede könnten verschiedene Koordinaten bedingen. Ebenso die dreidimensionale Ausdehnung der Ventrikel vor allem in der anterior-posterioren Achse können die Unterschiede der Koordinaten begründen. Dennoch wäre eine mögliche, wenn auch unwahrscheinliche Erklärung der ausbleibenden Regulation, dass wir nicht den Ventrikel getroffen haben, sondern das Gehirngewebe daneben.

Von Martier et al. ICV-applizierte mikroRNAs, die ATXN3 regulieren sollten, wurden mit der Liquorzirkulation nicht gut im Gehirn verteilt (Martier et al., 2019). Auch eine unzureichende Distribution der ASOs ist als mögliche Ursache der ausbleibenden Wirksamkeit in unseren Studien anzusehen, auch wenn es in den vergleichbaren ASO-Studien keinen Anhalt dafür gab (Moore et al., 2017). Eine bessere Konzentration in den Hauptpathogenese-Orten des Cerebellums und Hirnstammes konnte mithilfe von Injektionen in die Cisterna Magna oder die direkte Injektion in die tiefen cerebellären Kerne erreicht werden (Martier et al., 2019). Allerdings stellt sich dabei die Frage der Übertragbarkeit auf den Menschen, bei welchem dieser Zugangsweg nicht denkbar wäre aufgrund der Nähe zum gesamten Hirnstamm und der Gefahr, vital wichtige Strukturen zu verletzen. Perspektivisch sind sogenannte Exosomen in der Entwicklung, die als Transportpartikel Substanzen wie mikroRNA über die Blut-Hirn-Schranke transportieren sollen (Conceicao et al., 2016; Tang et al., 2023). Fraglich ist hier, inwiefern diese Exosomen auch für ASOs verwendet werden können. Es könnte aber durchaus ein vielversprechender Ansatz sein, da die ASOs intravenös appliziert werden können, was schonender und komplikationsloser als die Applikation direkt ins ZNS ist.

Weiterhin fällt beim Vergleich unserer Studien mit den anderen ASO-Studien in der SCA3 auf, dass unsere ASO-Dosis deutlich unter den anderen verwendeten Dosen lag. Wir verwendeten bei den allel-unspezifischen ASOs Dosen von 10, 30 und 100 µg bzw. 30 und 60 µg bei den allel-spezifischen ASOs. In der Studie von Moore et al. wurden 500 µg an ASO appliziert (Moore et al., 2017), bei Toonen et al. 500 µg sowie danach zweimal 250 µg, sodass insgesamt 1 mg appliziert wurde (Toonen et al., 2017). Dies könnte eine

mögliche Erklärung der Tatsache sein, dass wir bei keiner unserer ASOs eine signifikante Reduktion der Ataxin-3 RNA oder des ATXN3 finden konnten, in anderen Studien dagegen schon (Moore et al., 2017; Toonen et al., 2017). Diese Hypothese wird dadurch bestärkt, dass das Ausmaß der Regulation in den anderen Studien dosisabhängig zu sein schien (Toonen et al., 2017). Dagegen ist einzuwenden, dass die erwähnten Studien ASOs der 2. Generation verwendet haben, während in unseren Studien ASOs der 3. Generation zum Einsatz kamen. Diese Unterschiede in den chemischen Modifikationen wurden bereits im Zusammenhang mit der Toxizität diskutiert. (Lauffer et al., 2024; Mansoor & Melendez, 2008; Oberemok et al., 2018). Ein Vorteil der ASOs dritter Generation ist die niedrigere benötigte Konzentration, da die chemischen Modifikationen die Stabilität und die zelluläre Aufnahme verbessert haben. Außerdem weisen diese ASOs eine erhöhte Affinität für ihr Target auf, sodass weniger zur Regulation benötigt wird (Interne Kommunikation mit pharmazeutischer Firma). Es könnte jedoch auch sein, dass sich die angestrebte verbesserte Wirksamkeit *in vivo* nicht bewährt hat.

In unserer allel-unspezifischen Studie untersuchten wir die Wirksamkeit mittels qRT-PCR, indem wir schauten, ob die Expression der Ataxin-3 mRNA durch die Therapie reduziert wurde. In den beiden vergleichbaren Studien konnte bereits in der qPCR eine gute Reduktion der Ataxin-3 mRNA durch die ASO-Therapie beobachtet werden. Im Falle unserer allel-spezifischen Therapie untersuchten wir die Proteinexpression des mutATXN3 im *Western Blot*, wobei ebenfalls keine Regulation zu erkennen war. Durch den *Western Blot* konnte in den anderen ASO-Studien in der SCA3 eine Veränderung der Expression des mutanten ATXN3 detektiert werden (McLoughlin et al., 2018; Moore et al., 2017; Toonen et al., 2017). Die gewählten biochemischen Methoden waren also die richtigen, um eine Regulation zu zeigen.

Ferner ist anzumerken, dass für unsere Studie 2 mit den allel-spezifischen ASOs *in vitro* Vorstudien an induzierten Neuronen aus PatientInnen zur wtASO und mutASO durchgeführt wurden (Hauser et al., 2022). Es zeigte sich für die wtASO, dass die Regulation bis zum 4. Tag immer größer wurde, danach aber bereits wieder sank, sodass sie am 10. Tag nicht mehr nachweisbar war. Die mutASO dagegen zeigte auch nach 10 Tagen noch eine stabile Reduktion des mutanten ATXN3. Nach wiederholten Gaben konnte gezeigt werden, dass die Level des mutanten ATXN3 nach 3 Wochen wieder stiegen und erst nach 8 Wochen die Proteinlevel wie vor der Gabe erreichten (Hauser et

al., 2022). In unserer Studie zu den allel-spezifischen ASOs wurden die Tiere 4 Wochen nach den Injektionen präpariert. Eventuell könnte eine (geringe) Regulation stattgefunden haben und es wurde wieder neues ATXN3 nachgebildet. Es könnte außerdem sein, dass die ASOs *in vitro* langsamer abgebaut werden als *in vivo*. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die ASOs *in vitro* in einer anderen relativen Dosis verabreicht wurden. Wahrscheinlich erscheint dies jedoch nicht, da die Zeit zwischen Injektionen und Gewinnung der Gehirne auch in vergleichbaren ASO Studien 4 Wochen (Moore et al., 2017) bzw. 3,5 Monate nach der letzten von insgesamt 3 gestaffelte Injektionen betrug (Toonen et al., 2017). Es sollte also auch *in vivo* von einer gewissen Stabilität der ASOs und einem andauernden Effekt ausgegangen werden. Der Unterschied der Wirksamkeit zwischen den *in vitro* und *in vivo* Verfahren sollte in weitergehenden systematischen Studien beleuchtet werden. Sicherlich besteht weiterhin die Hoffnung, dass die hier analysierten ASOs durch weitere Verbesserungen und Anpassungen der Dosis, der chemischen Modifikationen und der Sequenzen doch noch zu vielversprechenden Therapiekandidaten werden könnten. Dies müsste in weiteren Studien untersucht werden.

Zusätzlich ist zu bedenken, dass eine gute Wirksamkeit und geringe Toxizität in embryonalen humanen Stammzellen sowie im Tiermodell letztlich keine Garanten für die gleiche Wirkung beim Menschen sind. Die in den präklinischen *in vivo* Studien gut verträgliche und wirksame ASO der Gruppe um Moore und McLoughlin erreichte die Phase I Studie, diese wurde jedoch vorzeitig abgebrochen. Die genauen Gründe dafür sind nicht bekannt (McLoughlin et al., 2018; Moore et al., 2019; Moore et al., 2017) (NCT05160558). Weitere bereits durchgeführte bzw. angefangene klinische Studien mit ASOs in der Huntington-Erkrankung wurden abgebrochen, obwohl auch sie vielversprechende präklinische Daten geliefert hatten (Rook & Southwell, 2022). Ein Grund war ein zu geringer Nutzen beim erhöhten Risiko durch die Therapie. Es wird diskutiert, ob die Liquorzirkulation bei der tiefen lumbalen Applikation der ASOs nicht ausreicht, die ASOs bis ins Cerebrum zu verteilen. Ein weiterer zu beachtender Aspekt ist, dass es sich um ASOs der 2. Generation handelte, welche sich oft im humanen Organismus als nicht potent genug erweisen (Rook & Southwell, 2022).

Da ASOs leicht herzustellen, nur aktuell in der klinischen Testung und Anwendung noch aufwändig sind, stellen sie eine vielversprechende Aussicht auf Therapien seltener Erkrankungen dar (Lauffer et al., 2024). Mittlerweile bieten ASOs in einigen wenigen Fällen sogar die Möglichkeit für n=1 Studien und Therapien. So im Falle der ASO Milasen, die für ein Kind entwickelt wurde, das an einer neu beschriebenen Erkrankung, der Neuronalen *Ceroid Lipofuscinosis 7*, einer Form der Batten's Erkrankung, litt. Die Entwicklung der ASO dauerte nur ein Jahr, bis sich ihr Einsatz im Patienten wirksam zeigte (Kim et al., 2019). Es gibt immer mehr solcher Berichte von ASOs, die für den Einzelfall entwickelt wurden (Lauffer et al., 2024). Dies zeigt, wie individualisiert ASO-Therapien sein können.

In Reviews wurde mehrfach diskutiert, was für eine erfolgreiche Therapie der SCA3 in PatientInnen notwendig wäre (Costa, 2020; Lauffer et al., 2024; Stahl et al., 2024). So ist ein Vorteil einer monogenetischen Erkrankung, dass Genträger in betroffenen Familien durch die genetische Testung auf das krankheitsverursachende Gen schon früh diagnostiziert werden können. Eine Therapie wäre bereits vor Auftreten von Symptomen möglich (Costa, 2020). Wie bereits in den Kapiteln zu RNA und Protein dargestellt ist, wurden mehrere Erklärungen der Pathophysiologie der SCA3 aufgezeigt. Es stellt sich die Frage, auf welcher Ebene man eine gute Therapie ansetzen sollte. Am hilfreichsten wäre es, nicht erst das Protein zu adressieren, sondern bereits vorher einzugreifen. Möglich wäre es, auf RNA-Ebene anzusetzen. In Studien zeigte sich, dass auch die mutante RNA unabhängig vom Protein an der Entstehung der SCA3 mitwirken könnte (Li et al., 2008). Außer den ASOs gibt es auch andere gentherapeutische Ansätze auf RNA-Ebene. Klinische Studien zum im Tiermodell vielversprechenden Therapieansatz mit siRNA wurden von den klinischen KollegInnen allerdings unterbunden. Die siRNA verbleibt aufgrund ihres Wirkprinzips dauerhaft im Körper, wenn sie einmal eingebracht wurde. Dies wäre bei PatientInnen problematisch, da mögliche toxische Effekte nicht wieder abklingen könnten. Außerdem stehen die mit siRNA behandelten PatientInnen nicht mehr für weitere klinische Studien zur Verfügung. Aufgrund der geringen Anzahl an PatientInnen in der SCA3 wäre dies nachteilig für die SCA3-Forschung. Diese Tatsache bestätigt sich auch in einer Datenbanksuche zu aktuell laufenden oder abgelaufenen klinischen Studien in der SCA3 mit siRNA. Ebenso sieht es für klinische Studien mit mikroRNA oder shRNA aus. Für die Eingabe der Stichworte SCA3 +

Antisense Oligonukleotide findet sich ein Treffer (NIH, 2024a), wohingegen die Eingabe SCA3 + siRNA (NIH, 2024d) oder mikroRNA (NIH, 2024b) oder shRNA (NIH, 2024c) keinen Treffer ergab.

Ferner könnte man auf Ebene der DNA eingreifen. Dort werden sehr starke Gentherapien benötigt, die das Genom verändern und dadurch einen großen und unumkehrbaren Eingriff darstellen. Eine Möglichkeit stellt die DNA-Nuklease Crispr-Cas9 dar. Sie wurde bereits erfolgreich in pluripotenten Stammzellen der SCA3 getestet. (He et al., 2021). Dennoch ist die Anwendung am Menschen (im Moment) nicht umsetzbar, da potenzielle *Off-Targets* sehr schwierig zu kontrollieren sind sowie auch der ethische Aspekt für solche das Genom verändernde Therapien zu beachten ist. Insofern scheint der Therapieansatz auf RNA-Ebene aktuell am vielversprechendsten.

Mit der andauernden Entschlüsselung des menschlichen Genoms und damit auch der Entdeckung weiterer Erkrankungsgene werden sich hoffentlich immer mehr Möglichkeiten geben, ASOs zur Therapie zu nutzen. Der Bereich der neurodegenerativen Erkrankungen stellt nur einen Ausschnitt des Anwendungsbereiches dieser Therapeutika dar. In diesem Feld sind sie aber besonders bedeutsam, da es sich um heutzutage unheilbare Erkrankungen handelt. Dennoch muss ausdrücklich auf die Limitierungen hingewiesen werden. Eine ASO-Therapie beinhaltet immer das Risiko von *Off-Targets*. Durch die Entschlüsselung des menschlichen Genoms kann bereits bei der Entwicklung der Substanzen eine präzisere Vorhersage dieser stattfinden, dennoch können sie abschließend erst im Organismus festgestellt werden. Außerdem sind auch die nicht durch den Mechanismus bedingten *Off-Target*-Effekte beispielsweise durch die Bindung der Substanzen an Proteine oder andere Zellbestandteile zu berücksichtigen. Ferner sind ASOs zwar eine kausale Therapie, sie sind jedoch nicht heilend. Die PatientInnen tragen weiterhin das Erkrankungsgen, welches durch die Therapie kontrolliert wird. Dennoch können die TrägerInnen dieses Gen weitervererben, worauf explizit hingewiesen werden muss (Lauffer et al., 2024). Auch die Langzeiteffekte der Gentherapien bei regelmäßiger ASO-Applikation müssen zukünftig tiefergehend beurteilt werden.

Im Hinblick auf die chemische Gestaltung der ASOs wird es wohl in den nächsten Jahren neue Entwicklungen geben, damit diese effizienter werden. Die Dosen sollen reduziert werden. Ebenso wird gehofft, die Toxizität weiter zu senken. Beispielsweise werden

## Diskussion

aktuell neue chemische Modifikationen der ASOs entwickelt, welche speziell die Neurotoxizität verringern sollen (Matsubayashi et al., 2024). Möglicherweise werden auch die chemischen Modifikationen der Basen, im Speziellen der Guanine, weiterentwickelt, um die sequenzbedingte Neurotoxizität zu verringern.

Insgesamt zeigen die im Rahmen dieser Promotion durchgeführten Studien, dass auch *in vitro* vielversprechende Ergebnisse *in vivo* nicht wirken können. Ebenso können unerwartete Unverträglichkeitsreaktionen vorkommen. Eine graphische Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Promotion ist in Abbildung 4.1 als Netzdiagramm dargestellt.

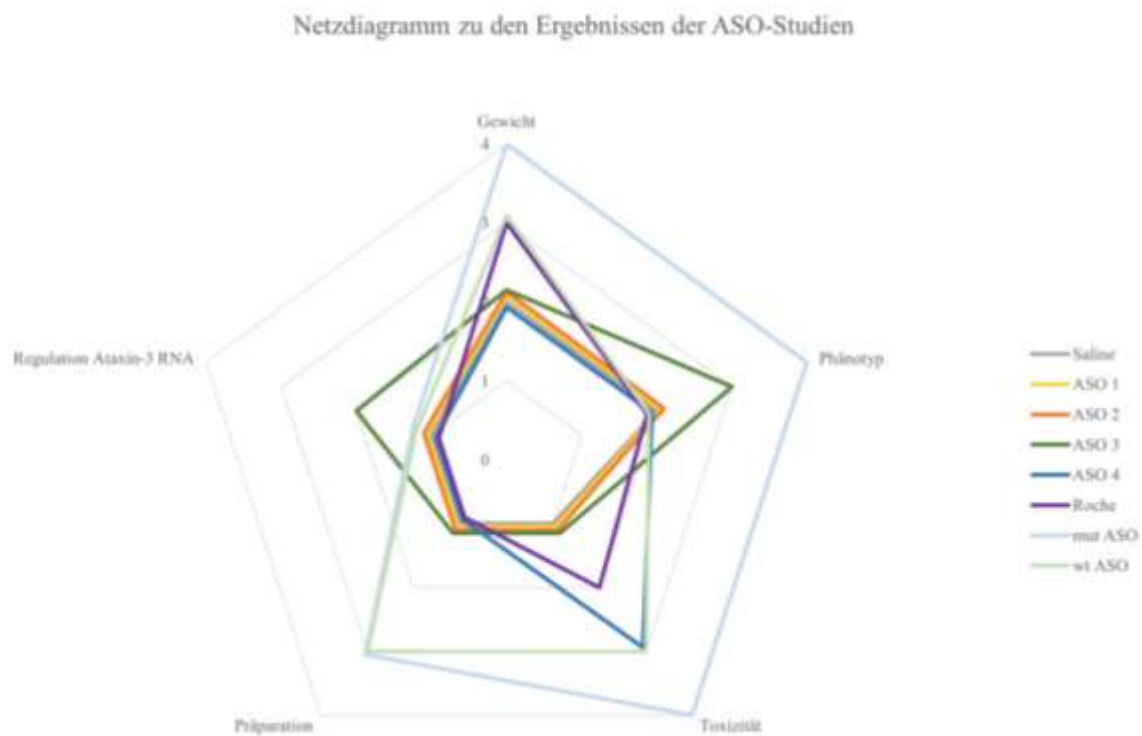


Abbildung 4.1 Ergebnisse der in dieser Promotion durchgeführten ASO-Studien

In der Abbildung ist eine graphische Zusammenfassung der Erkenntnisse durch die im Rahmen dieser Promotion untersuchten ASOs als Netzdiagramm dargestellt. Die Achse in der Mitte gilt für die 5 Kriterien, die außen an den Ecken des Netzes aufgetragen sind. Die untersuchten Kriterien sind der Einfluss der ASO auf das Gewicht und den Phänotyp, die ASO-assoziierte Toxizität, Auffälligkeiten in der Präparation sowie die Regulation entweder der Ataxin-3-RNA oder des ATXN3. Der Wert 1 wurde vergeben, wenn kein Einfluss durch die ASO zu finden war. Der Wert 2 wurde für einen leichten, der Wert 3 für einen mittelmäßigen und der Wert 4 für einen starken Einfluss der ASO verteilt. Die Bewertung der ASOs erfolgte auf Grundlage der Tabellen 3.11 und 3.18 der Ergebniskapitel. Die farbigen Fünfecke entsprechen den Ergebnissen der

## Diskussion

*ASOs. Man erkennt auf den ersten Blick, dass keine außer der allel-unspezifischen ASO 3 im Frontalen Cortex eine Regulation erreichen konnte. Dafür zeigten sich große Unterschiede in Bezug auf die Toxizität. Diese war besonders ausgeprägt für die mutASO. Ebenso konnte eine leicht erhöhte Toxizität für ASO 4 und die Roche-ASO festgestellt werden. Auch konnte eine Unverträglichkeitsreaktion erkennbar im Gewicht und dem Phänotyp für die wtASO sowie für ASO 3 erkannt werden. Die mutASO und wtASO wiesen außerdem Auffälligkeiten bei der Präparation auf, diese waren vor allem stenotische und überblähte sowie infarzierte Darmschlingen.*

Hypothesen für die abgesehen von ASO 3 im Frontalen Cortex ausbleibende Regulation wurden besonders mit Augenmerk auf die Generation, die Injektionsstelle und die Zeit zwischen Injektionen und Präparation der Gehirne beleuchtet. Die unerwartet starke toxische Reaktion der mutASO im allel-spezifischen Ansatz reichte über den bekannten Rahmen einer akuten Neurotoxizität hinaus. Es könnte ein Zusammenhang zwischen der ASO-Sequenz und einer immunologischen oder systemischen Reaktion bestehen. Diese Erklärungen decken allerdings nicht das gesamte Ausmaß der Unverträglichkeitsreaktion ab. Daher wären tiefergehende, systematische Studien notwendig, um den Grund der Toxizität vollständig nachzuvollziehen. Nichtsdestotrotz scheint ein allel-spezifischer Ansatz zukunftsreich, da sich auch zeigte, dass die sehr ähnliche ASO von Toonen et al. gut wirksam und verträglich war (Toonen et al., 2017). Es wäre also denkbar, dass man bereits mit leichten Anpassungen der ASO-Sequenz und ihrer chemischen Modifikationen das gewünschte Ziel erreichen kann. Auch hier wären weitere Studien sinnvoll und spannend.

## 5 Zusammenfassung

Die Spinocerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3) ist eine neurodegenerative, genetisch bedingte Erkrankung aus dem Formenkreis der Polyglutamin-Erkrankungen. Die zugrunde liegende Mutation ist eine Expansion der CAG-Sequenz im zugehörigen *Ataxin-3* Gen, durch welche im entsprechenden Protein eine Polyglutamin-Kette entsteht. Diese beeinflusst die Proteinfaltung so, dass es zu Proteinaggregaten in verschiedenen motorischen Zentren des Gehirns wie dem Cerebellum, dem Hirnstamm und den Basalganglien kommt. Diese Aggregate scheinen zur Neurodegeneration beizutragen, welche im Verlauf auftritt. Dies bewirkt einen Koordinationsverlust, der innerhalb von 10-15 Jahren zur Immobilität führt. Die PatientInnen versterben vor allem an Aspirationspneumonien und Infektionen. Aktuell stehen nur symptomatische Therapien zur Verfügung, wie intensive Physiotherapie oder Medikamente aus dem Bereich der Parkinsonbehandlung. Zur kausalen Behandlung werden daher Gentherapien immer attraktiver.

In dieser Promotion wurden zwei Ansätze mit Antisense-Oligonukleotiden (ASOs) getestet, die die mRNA des Ataxin-3 binden und mittels Rekrutierung der RNaseH1 abbauen sollten, sodass konsekutiv auch das Protein Ataxin-3 herunterreguliert werden sollte. Dafür wurde das SCA3 WT/YAC84Q-Mausmodell verwendet, da dieses den humanen Genlocus des Ataxin-3 mit allen regulatorischen Elementen exprimiert. Der erste Ansatz wurde allel-unspezifisch entwickelt, sodass die ASOs sowohl das mutante als auch das wildtypische ATXN3 regulieren sollten. Dies ist vertretbar, da sich in Tiermodellen gezeigt hat, dass ATXN3 für eine normale Zellfunktion nicht obligat zu sein scheint. In einem zweiten Ansatz wurden allel-spezifische ASOs getestet, die den Polymorphismus c.987G>C binden. Dieser ist mit der CAG-Sequenz assoziiert und liegt bei 70% der PatientInnen weltweit vor. Der SNP wird auch in der WT/YAC84Q-Maus abgebildet. Durch die sogenannte mutASO sollte nur das mutante ATXN3 reguliert werden, nicht jedoch das wildtypische. Die ASOs wurden im Alter von 7-10 bzw. 10-12 Wochen jeweils mittels intracerebroventrikulärer Injektion in die Gehirne der Versuchstiere eingebracht, um durch die Liquorzirkulation im ZNS verteilt zu werden. Nach 7 bzw. 4 Wochen wurden die Gehirne präpariert. Im Falle der allel-unspezifischen ASOs wurden die Expressionslevel der RNA des mutanten *ATXN3* mittels qRT-PCR bestimmt. In der Studie der allel-spezifischen ASOs wurden die Expressionslevel des

humanen ATXN3 mittels *Western Blot* analysiert. Außer für die allel-unspezifische ASO 3 im Frontalen Cortex konnte keine signifikante Regulation beobachtet werden. Als mögliche Erklärungen ist besonders auf die genaue Injektionsstelle, die chemischen Modifikationen, die Generation und die Dosis der ASOs sowie die Zeit zwischen Injektion und Präparation einzugehen.

Die allel-unspezifischen ASOs wurden gut vertragen. Die meisten beobachteten Auffälligkeiten zum Gewicht sowie dem Phänotyp konnten ebenso in der Kontrollgruppe festgestellt werden und schienen daher im Zusammenhang mit dem OP-Verfahren zu stehen. Im Falle der mutASO dagegen wurde eine starke konzentrationsabhängige (Neuro-)Toxizität festgestellt. Diese zeigte sich vor allem im Phänotyp durch Tremor und reduzierte koordinatorische Fähigkeiten, welche im *Wirehang*-Test auffielen. Als mögliche Ursache ist auch hier die Injektionstechnik zu diskutieren. Die direkte Applikation ins Gehirn ist mit einem hohen OP-Risiko und der Gefahr einer Immunreaktion verbunden. Weiterhin ist ein Zusammenhang zwischen der chemischen Struktur der ASOs und erhöhter Toxizität beschrieben. Es ist bekannt, dass eine erhöhte Guanin-Anzahl in der Sequenz der ASO zu einer starken akuten Neurotoxizität führen kann. Die Toxizität der mutASO entwickelte sich jedoch nicht nur akut, sondern auch über einige Tage hinweg. Als Erklärung könnte eine systemische Reaktion in Betracht gezogen werden. Es ist zu diskutieren, ob es zusätzlich zur akuten auch eine langfristige Neurotoxizität gibt, die so bisher noch nicht beschrieben wurde. Außerdem sind das Alter und Gewicht sowie die transgene Mauslinie als weitere Faktoren der Toxizität zu beleuchten. Aktuell werden dazu erste systematische Toxizitätsstudien in Mausmodellen neurodegenerativer Erkrankungen veröffentlicht. Jedoch ist das Wissen über die Unverträglichkeitsreaktion beim Menschen noch sehr begrenzt.

Zusammenfassend liefern die hier dargestellten Studien potenzielle Hypothesen zur Klärung der Frage, wieso *in vitro* vielversprechende Therapieansätze *in vivo* nicht wirksam sind. Weiterhin wird die Frage aufgeworfen, wodurch die Toxizität der allel-spezifischen ASOs genau verursacht wird und besonders wodurch die langfristige Komponente der (Neuro-)Toxizität bedingt ist. Um diese Fragen abschließend zu klären, wären weitere systematische Untersuchungen notwendig.

## Literaturverzeichnis

- Agrawal, S., Temsamani, J., & Tang, J. Y. (1991). Pharmacokinetics, biodistribution, and stability of oligodeoxynucleotide phosphorothioates in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(17), 7595-7599. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.17.7595>
- Alves, S., Nascimento-Ferreira, I., Dufour, N., Hassig, R., Auregan, G., Nobrega, C., Brouillet, E., Hantraye, P., Pedroso de Lima, M. C., Deglon, N., & de Almeida, L. P. (2010). Silencing ataxin-3 mitigates degeneration in a rat model of Machado-Joseph disease: no role for wild-type ataxin-3? *Hum Mol Genet*, 19(12), 2380-2394. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq111>
- Antony, P. M., Mantele, S., Mollenkopf, P., Boy, J., Kehlenbach, R. H., Riess, O., & Schmidt, T. (2009). Identification and functional dissection of localization signals within ataxin-3. *Neurobiol Dis*, 36(2), 280-292. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.020>
- Aupy, P., Echevarria, L., Relizani, K., Zarrouki, F., Haerberli, A., Komisarski, M., Tensorer, T., Jouvion, G., Svinartchouk, F., Garcia, L., & Goyenvall, A. (2020). Identifying and Avoiding tcDNA-ASO Sequence-Specific Toxicity for the Development of DMD Exon 51 Skipping Therapy. *Mol Ther Nucleic Acids*, 19, 371-383. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.11.020>
- Baron, B. M., Dudley, M. W., McCarty, D. R., Miller, F. P., Reynolds, I. J., & Schmidt, C. J. (1989). Guanine nucleotides are competitive inhibitors of N-methyl-D-aspartate at its receptor site both in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*, 250(1), 162-169. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2545857>
- Becker, L. A., Huang, B., Bieri, G., Ma, R., Knowles, D. A., Jafar-Nejad, P., Messing, J., Kim, H. J., Soriano, A., Auburger, G., Pulst, S. M., Taylor, J. P., Rigo, F., & Gitler, A. D. (2017). Therapeutic reduction of ataxin-2 extends lifespan and reduces pathology in TDP-43 mice. *Nature*, 544(7650), 367-371. <https://doi.org/10.1038/nature22038>
- Bennett, C. F., & Swayze, E. E. (2010). RNA targeting therapeutics: molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 50, 259-293. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.010909.105654>
- Benson, M. D., Waddington-Cruz, M., Berk, J. L., Polydefkis, M., Dyck, P. J., Wang, A. K., Plante-Bordeneuve, V., Barroso, F. A., Merlini, G., Obici, L., Scheinberg, M., Brannagan, T. H., 3rd, Litchy, W. J., Whelan, C., Drachman, B. M., Adams, D., Heitner, S. B., Conceicao, I., Schmidt, H. H., . . . Coelho, T. (2018). Inotersen Treatment for Patients with Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *N Engl J Med*, 379(1), 22-31. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1716793>
- Berke, S. J., Chai, Y., Marrs, G. L., Wen, H., & Paulson, H. L. (2005). Defining the role of ubiquitin-interacting motifs in the polyglutamine disease protein, ataxin-3. *J Biol Chem*, 280(36), 32026-32034. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506084200>
- Bettencourt, C., & Lima, M. (2011). Machado-Joseph Disease: from first descriptions to new perspectives. *Orphanet J Rare Dis*, 6, 35. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-6-35>
- Bettencourt, C., Santos, C., Montiel, R., Costa Mdo, C., Cruz-Morales, P., Santos, L. R., Simoes, N., Kay, T., Vasconcelos, J., Maciel, P., & Lima, M. (2010). Increased transcript diversity: novel splicing variants of Machado-Joseph disease gene

- (ATXN3). *Neurogenetics*, 11(2), 193-202. <https://doi.org/10.1007/s10048-009-0216-y>
- Bichelmeier, U., Schmidt, T., Hubener, J., Boy, J., Ruttiger, L., Habig, K., Poths, S., Bonin, M., Knipper, M., Schmidt, W. J., Wilbertz, J., Wolburg, H., Laccone, F., & Riess, O. (2007). Nuclear localization of ataxin-3 is required for the manifestation of symptoms in SCA3: in vivo evidence. *J Neurosci*, 27(28), 7418-7428. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4540-06.2007>
- Blair, H. A. (2023). Tofersen: First Approval. *Drugs*, 83(11), 1039-1043. <https://doi.org/10.1007/s40265-023-01904-6>
- Boutros, S. W., Raber, J., & Unni, V. K. (2021). Effects of Alpha-Synuclein Targeted Antisense Oligonucleotides on Lewy Body-Like Pathology and Behavioral Disturbances Induced by Injections of Pre-Formed Fibrils in the Mouse Motor Cortex. *J Parkinsons Dis*, 11(3), 1091-1115. <https://doi.org/10.3233/JPD-212566>
- Boy, J., Schmidt, T., Wolburg, H., Mack, A., Nuber, S., Bottcher, M., Schmitt, I., Holzmann, C., Zimmermann, F., Servadio, A., & Riess, O. (2009). Reversibility of symptoms in a conditional mouse model of spinocerebellar ataxia type 3. *Hum Mol Genet*, 18(22), 4282-4295. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp381>
- Buhmann, H., Mansouri, L., Wang, J., Beton, P. H., Mori, N., Eaves, L., Henini, M., & Potemski, M. (1995). Electron-concentration-dependent quantum-well luminescence: Evidence for a negatively charged exciton. *Phys Rev B Condens Matter*, 51(12), 7969-7972. <https://doi.org/10.1103/physrevb.51.7969>
- Burdick, A. D., Sciabola, S., Mantena, S. R., Hollingshead, B. D., Stanton, R., Warneke, J. A., Zeng, M., Martsen, E., Medvedev, A., Makarov, S. S., Reed, L. A., Davis, J. W., 2nd, & Whiteley, L. O. (2014). Sequence motifs associated with hepatotoxicity of locked nucleic acid--modified antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res*, 42(8), 4882-4891. <https://doi.org/10.1093/nar/gku142>
- Burel, S. A., Hart, C. E., Cauntay, P., Hsiao, J., Machemer, T., Katz, M., Watt, A., Bui, H. H., Younis, H., Sabripour, M., Freier, S. M., Hung, G., Dan, A., Prakash, T. P., Seth, P. P., Swayze, E. E., Bennett, C. F., Crooke, S. T., & Henry, S. P. (2016). Hepatotoxicity of high affinity gapmer antisense oligonucleotides is mediated by RNase H1 dependent promiscuous reduction of very long pre-mRNA transcripts. *Nucleic Acids Res*, 44(5), 2093-2109. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1210>
- Burnett, B., Li, F., & Pittman, R. N. (2003). The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin-3 binds polyubiquitylated proteins and has ubiquitin protease activity. *Hum Mol Genet*, 12(23), 3195-3205. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg344>
- Carvalho, D. R., La Rocque-Ferreira, A., Rizzo, I. M., Imamura, E. U., & Speck-Martins, C. E. (2008). Homozygosity enhances severity in spinocerebellar ataxia type 3. *Pediatr Neurol*, 38(4), 296-299. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2007.12.006>
- Cemal, C. K., Carroll, C. J., Lawrence, L., Lowrie, M. B., Ruddie, P., Al-Mahdawi, S., King, R. H., Pook, M. A., Huxley, C., & Chamberlain, S. (2002). YAC transgenic mice carrying pathological alleles of the MJD1 locus exhibit a mild and slowly progressive cerebellar deficit. *Hum Mol Genet*, 11(9), 1075-1094. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.9.1075>
- Cerillo, J. L., & Parmar, M. (2023). Tofersen. In *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37603661>
- Chang, J. L., Hinrich, A. J., Roman, B., Norrbom, M., Rigo, F., Marr, R. A., Norstrom, E. M., & Hastings, M. L. (2018). Targeting Amyloid-beta Precursor Protein, APP,

- Splicing with Antisense Oligonucleotides Reduces Toxic Amyloid-beta Production. *Mol Ther*, 26(6), 1539-1551. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.02.029>
- Chen, S. Y., Kuo, H. Y., & Liu, F. C. (2018). Stereotaxic Surgery for Genetic Manipulation in Striatal Cells of Neonatal Mouse Brains. *J Vis Exp*(137). <https://doi.org/10.3791/57270>
- Chuang, R. (2023). MERA Study Closure. <https://www.ataxia.org.uk/wp-content/uploads/2023/04/Biogen-letter-to-Ataxia-UK-April-2023.pdf>
- Conceicao, M., Mendonca, L., Nobrega, C., Gomes, C., Costa, P., Hirai, H., Moreira, J. N., Lima, M. C., Manjunath, N., & Pereira de Almeida, L. (2016). Intravenous administration of brain-targeted stable nucleic acid lipid particles alleviates Machado-Joseph disease neurological phenotype. *Biomaterials*, 82, 124-137. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.12.021>
- Correia, M., Coutinho, P., Silva, M. C., Guimaraes, J., Amado, J., & Matos, E. (1995). Evaluation of the effect of sulphamethoxazole and trimethoprim in patients with Machado-Joseph disease. *Rev Neurol*, 23(121), 632-634. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8597984>
- Costa, M. D. C. (2020). Recent therapeutic prospects for Machado-Joseph disease. *Curr Opin Neurol*, 33(4), 519-526. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000832>
- Costa Mdo, C., Luna-Cancelon, K., Fischer, S., Ashraf, N. S., Ouyang, M., Dharia, R. M., Martin-Fishman, L., Yang, Y., Shakkottai, V. G., Davidson, B. L., Rodriguez-Lebron, E., & Paulson, H. L. (2013). Toward RNAi therapy for the polyglutamine disease Machado-Joseph disease. *Mol Ther*, 21(10), 1898-1908. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.144>
- Costa Mdo, C., & Paulson, H. L. (2012). Toward understanding Machado-Joseph disease. *Prog Neurobiol*, 97(2), 239-257. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.11.006>
- Costa, V., Giacomello, M., Hudec, R., Lopreiato, R., Ermak, G., Lim, D., Malorni, W., Davies, K. J., Carafoli, E., & Scorrano, L. (2010). Mitochondrial fission and cristae disruption increase the response of cell models of Huntington's disease to apoptotic stimuli. *EMBO Mol Med*, 2(12), 490-503. <https://doi.org/10.1002/emmm.201000102>
- Crooke, S. T., Wang, S., Vickers, T. A., Shen, W., & Liang, X. H. (2017). Cellular uptake and trafficking of antisense oligonucleotides. *Nat Biotechnol*, 35(3), 230-237. <https://doi.org/10.1038/nbt.3779>
- D'Abreu, A., Franca, M. C., Jr., Paulson, H. L., & Lopes-Cendes, I. (2010). Caring for Machado-Joseph disease: current understanding and how to help patients. *Parkinsonism Relat Disord*, 16(1), 2-7. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2009.08.012>
- Da Silva, J. D., Teixeira-Castro, A., & Maciel, P. (2019). From Pathogenesis to Novel Therapeutics for Spinocerebellar Ataxia Type 3: Evading Potholes on the Way to Translation. *Neurotherapeutics*, 16(4), 1009-1031. <https://doi.org/10.1007/s13311-019-00798-1>
- Dalpke, A. H., Zimmermann, S., Albrecht, I., & Heeg, K. (2002). Phosphodiester CpG oligonucleotides as adjuvants: polyguanosine runs enhance cellular uptake and improve immunostimulative activity of phosphodiester CpG oligonucleotides in vitro and in vivo. *Immunology*, 106(1), 102-112. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2002.01410.x>

- Datson, N. A., Gonzalez-Barriga, A., Kourkouta, E., Weij, R., van de Giessen, J., Mulders, S., Kontkanen, O., Heikkinen, T., Lehtimäki, K., & van Deutekom, J. C. (2017). The expanded CAG repeat in the huntingtin gene as target for therapeutic RNA modulation throughout the HD mouse brain. *PLoS One*, 12(2), e0171127. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171127>
- De Vivo, D. C., Bertini, E., Swoboda, K. J., Hwu, W. L., Crawford, T. O., Finkel, R. S., Kirschner, J., Kuntz, N. L., Parsons, J. A., Ryan, M. M., Butterfield, R. J., Topaloglu, H., Ben-Omran, T., Sansone, V. A., Jong, Y. J., Shu, F., Staropoli, J. F., Kerr, D., Sandrock, A. W., . . . Group, N. S. (2019). Nusinersen initiated in infants during the presymptomatic stage of spinal muscular atrophy: Interim efficacy and safety results from the Phase 2 NURTURE study. *Neuromuscul Disord*, 29(11), 842-856. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2019.09.007>
- DeAraujo, M. R., N Kazachkova, J Vasconcelos, T KAy, et al. (2016). Trends in the Epidemiology of Spinocerebellar Ataxia Type 3/ Machado-Joseph Disease in the Azores Islands, Portugal. *JSM Brain Sci*, 1, 1001.
- Dev, K. K., Roberts, P. J., & Henley, J. M. (1996). Characterisation of the interaction between guanyl nucleotides and AMPA receptors in rat brain. *Neuropharmacology*, 35(11), 1583-1593. [https://doi.org/10.1016/s0028-3908\(96\)00123-2](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(96)00123-2)
- DeVos, S. L., Miller, R. L., Schoch, K. M., Holmes, B. B., Kebodeaux, C. S., Wegener, A. J., Chen, G., Shen, T., Tran, H., Nichols, B., Zanardi, T. A., Kordasiewicz, H. B., Swayze, E. E., Bennett, C. F., Diamond, M. I., & Miller, T. M. (2017). Tau reduction prevents neuronal loss and reverses pathological tau deposition and seeding in mice with tauopathy. *Sci Transl Med*, 9(374). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aag0481>
- DeVos, S. L., & Miller, T. M. (2013). Direct intraventricular delivery of drugs to the rodent central nervous system. *J Vis Exp*(75), e50326. <https://doi.org/10.3791/50326>
- Diallo, A., Jacobi, H., Cook, A., Labrum, R., Durr, A., Brice, A., Charles, P., Marelli, C., Mariotti, C., Nanetti, L., Panzeri, M., Rakowicz, M., Sobanska, A., Sulek, A., Schmitz-Hubsch, T., Schols, L., Hengel, H., Melegh, B., Filla, A., . . . Tezenas du Montcel, S. (2018). Survival in patients with spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6 (EUROSCA): a longitudinal cohort study. *Lancet Neurol*, 17(4), 327-334. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30042-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30042-5)
- Diallo, A., Jacobi, H., Schmitz-Hubsch, T., Cook, A., Labrum, R., Durr, A., Brice, A., Charles, P., Marelli, C., Mariotti, C., Nanetti, L., Panzeri, M., Rakowicz, M., Sobanska, A., Sulek, A., Schols, L., Hengel, H., Melegh, B., Filla, A., . . . Tezenas du Montcel, S. (2017). Body Mass Index Decline Is Related to Spinocerebellar Ataxia Disease Progression. *Mov Disord Clin Pract*, 4(5), 689-697. <https://doi.org/10.1002/mdc3.12522>
- Diener, C., Keller, A., & Meese, E. (2022). Emerging concepts of miRNA therapeutics: from cells to clinic. *Trends Genet*, 38(6), 613-626. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2022.02.006>
- Durr, A., Stevanin, G., Cancel, G., Duyckaerts, C., Abbas, N., Didierjean, O., Chneiweiss, H., Benomar, A., Lyon-Caen, O., Julien, J., Serdaru, M., Penet, C., Agid, Y., & Brice, A. (1996). Spinocerebellar ataxia 3 and Machado-Joseph disease: clinical, molecular, and neuropathological features. *Ann Neurol*, 39(4), 490-499. <https://doi.org/10.1002/ana.410390411>

- Duyao, M. P., Auerbach, A. B., Ryan, A., Persichetti, F., Barnes, G. T., McNeil, S. M., Ge, P., Vonsattel, J. P., Gusella, J. F., Joyner, A. L., & et al. (1995). Inactivation of the mouse Huntington's disease gene homolog Hdh. *Science*, 269(5222), 407-410. <https://doi.org/10.1126/science.7618107>
- Egli, M., & Manoharan, M. (2023). Chemistry, structure and function of approved oligonucleotide therapeutics. *Nucleic Acids Res*, 51(6), 2529-2573. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad067>
- EMA. (2017). Spinraza : EPAR - Summary for the public. *European Medicines Agency*. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/spinraza-epar-summary-public\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/spinraza-epar-summary-public_en.pdf)
- EMA. (2018a). Refusal of the marketing authorisation for Exondys (eteplirsen). *European Medicines Agency*. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/smop-initial/questions-and-answers-refusal-marketing-authorisation-exondys-eteplirsen-outcome-re-examination\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/smop-initial/questions-and-answers-refusal-marketing-authorisation-exondys-eteplirsen-outcome-re-examination_en.pdf)
- EMA. (2018b). Tegsedi : EPAR - Summary for the public. *European Medicines Agency*. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/tegsedi-epar-product-information\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/tegsedi-epar-product-information_en.pdf)
- EMA. (2024). Qalsody : EPAR - Medicine overview. *European Medicines Agency*. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/qalsody-epar-medicine-overview\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/qalsody-epar-medicine-overview_en.pdf)
- Ferry, B., & Gervasoni, D. (2021). Improving Stereotaxic Neurosurgery Techniques and Procedures Greatly Reduces the Number of Rats Used per Experimental Group- A Practice Report. *Animals (Basel)*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/ani11092662>
- Finkel, R. S., Mercuri, E., Darras, B. T., Connolly, A. M., Kuntz, N. L., Kirschner, J., Chiriboga, C. A., Saito, K., Servais, L., Tizzano, E., Topaloglu, H., Tulinius, M., Montes, J., Glanzman, A. M., Bishop, K., Zhong, Z. J., Gheuens, S., Bennett, C. F., Schneider, E., . . . Group, E. S. (2017). Nusinersen versus Sham Control in Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med*, 377(18), 1723-1732. <https://doi.org/10.1056/NEJMoA1702752>
- Fiszer, A., Wroblewska, J. P., Nowak, B. M., & Krzyzosiak, W. J. (2016). Mutant CAG Repeats Effectively Targeted by RNA Interference in SCA7 Cells. *Genes (Basel)*, 7(12). <https://doi.org/10.3390/genes7120132>
- Fornari, R. V., Wichmann, R., Atsak, P., Atucha, E., Barsegyan, A., Beldjoud, H., Messanvi, F., Thuring, C. M., & Roozendaal, B. (2012). Rodent stereotaxic surgery and animal welfare outcome improvements for behavioral neuroscience. *J Vis Exp*(59), e3528. <https://doi.org/10.3791/3528>
- Fowler, H. L. (1984). Machado-Joseph-Azorean disease. A ten-year study. *Arch Neurol*, 41(9), 921-925. <https://doi.org/10.1001/archneur.1984.04050200027013>
- Friedrich, M., & Aigner, A. (2022). Therapeutic siRNA: State-of-the-Art and Future Perspectives. *BioDrugs*, 36(5), 549-571. <https://doi.org/10.1007/s40259-022-00549-3>
- Gaspar, C., Lopes-Cendes, I., Hayes, S., Goto, J., Arvidsson, K., Dias, A., Silveira, I., Maciel, P., Coutinho, P., Lima, M., Zhou, Y. X., Soong, B. W., Watanabe, M., Giunti, P., Stevanin, G., Riess, O., Sasaki, H., Hsieh, M., Nicholson, G. A., . . . Rouleau, G. A. (2001). Ancestral origins of the Machado-Joseph disease mutation: a worldwide haplotype study. *Am J Hum Genet*, 68(2), 523-528. <https://doi.org/10.1086/318184>

- Geary, R. S., Norris, D., Yu, R., & Bennett, C. F. (2015). Pharmacokinetics, biodistribution and cell uptake of antisense oligonucleotides. *Adv Drug Deliv Rev*, 87, 46-51. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.01.008>
- Geary, R. S., Watanabe, T. A., Truong, L., Freier, S., Lesnik, E. A., Sioufi, N. B., Sasnor, H., Manoharan, M., & Levin, A. A. (2001). Pharmacokinetic properties of 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified oligonucleotide analogs in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 296(3), 890-897. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11181921>
- Giuffre, G. M., Quaranta, D., Costantini, E. M., Citro, S., Martellacci, N., De Ninno, G., Vita, M. G., Guglielmi, V., Rossini, P. M., Calabresi, P., & Marra, C. (2023). Cerebrospinal fluid neurofilament light chain and total-tau as biomarkers of neurodegeneration in Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Neurobiol Dis*, 186, 106267. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2023.106267>
- Gorodinsky, A., Paas, Y., & Teichberg, V. I. (1993). A ligand binding study of the interactions of guanine nucleotides with non-NMDA receptors. *Neurochem Int*, 23(3), 285-291. [https://doi.org/10.1016/0197-0186\(93\)90119-p](https://doi.org/10.1016/0197-0186(93)90119-p)
- Goti, D., Katzen, S. M., Mez, J., Kurtis, N., Kiluk, J., Ben-Haiem, L., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Kakizuka, A., Sharp, A. H., Ross, C. A., Mouton, P. R., & Colomer, V. (2004). A mutant ataxin-3 putative-cleavage fragment in brains of Machado-Joseph disease patients and transgenic mice is cytotoxic above a critical concentration. *J Neurosci*, 24(45), 10266-10279. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2734-04.2004>
- Goto, J., Watanabe, M., Ichikawa, Y., Yee, S. B., Ihara, N., Endo, K., Igarashi, S., Takiyama, Y., Gaspar, C., Maciel, P., Tsuji, S., Rouleau, G. A., & Kanazawa, I. (1997). Machado-Joseph disease gene products carrying different carboxyl termini. *Neurosci Res*, 28(4), 373-377. [https://doi.org/10.1016/s0168-0102\(97\)00056-4](https://doi.org/10.1016/s0168-0102(97)00056-4)
- Goyenvall, A., Jimenez-Mallebrera, C., van Roon, W., Sewing, S., Krieg, A. M., Arechavala-Gomeza, V., & Andersson, P. (2023). Considerations in the Preclinical Assessment of the Safety of Antisense Oligonucleotides. *Nucleic Acid Ther*, 33(1), 1-16. <https://doi.org/10.1089/nat.2022.0061>
- Haas, E., Incebacak, R. D., Hentrich, T., Huridou, C., Schmidt, T., Casadei, N., Maringer, Y., Bahl, C., Zimmermann, F., Mills, J. D., Aronica, E., Riess, O., Schulze-Hentrich, J. M., & Hubener-Schmid, J. (2022). A Novel SCA3 Knock-in Mouse Model Mimics the Human SCA3 Disease Phenotype Including Neuropathological, Behavioral, and Transcriptional Abnormalities Especially in Oligodendrocytes. *Mol Neurobiol*, 59(1), 495-522. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02610-8>
- Hagedorn, P. H., Brown, J. M., Easton, A., Pierdomenico, M., Jones, K., Olson, R. E., Mercer, S. E., Li, D., Loy, J., Hog, A. M., Jensen, M. L., Gill, M., & Cacace, A. M. (2022). Acute Neurotoxicity of Antisense Oligonucleotides After Intracerebroventricular Injection Into Mouse Brain Can Be Predicted from Sequence Features. *Nucleic Acid Ther*, 32(3), 151-162. <https://doi.org/10.1089/nat.2021.0071>
- Hagedorn, P. H., Yakimov, V., Ottosen, S., Kammler, S., Nielsen, N. F., Hog, A. M., Hedtjarn, M., Meldgaard, M., Moller, M. R., Orum, H., Koch, T., & Lindow, M. (2013). Hepatotoxic potential of therapeutic oligonucleotides can be predicted from their sequence and modification pattern. *Nucleic Acid Ther*, 23(5), 302-310. <https://doi.org/10.1089/nat.2013.0436>

- Harmuth, T., Prell-Schicker, C., Weber, J. J., Gellerich, F., Funke, C., Driessen, S., Magg, J. C. D., Krebiehl, G., Wolburg, H., Hayer, S. N., Hauser, S., Kruger, R., Schols, L., Riess, O., & Hubener-Schmid, J. (2018). Mitochondrial Morphology, Function and Homeostasis Are Impaired by Expression of an N-terminal Calpain Cleavage Fragment of Ataxin-3. *Front Mol Neurosci*, *11*, 368. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00368>
- Hauser, S., Helm, J., Kraft, M., Korneck, M., Hubener-Schmid, J., & Schols, L. (2022). Allele-specific targeting of mutant ataxin-3 by antisense oligonucleotides in SCA3-iPSC-derived neurons. *Mol Ther Nucleic Acids*, *27*, 99-108. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.11.015>
- He, L., Wang, S., Peng, L., Zhao, H., Li, S., Han, X., Habimana, J. D., Chen, Z., Wang, C., Peng, Y., Peng, H., Xie, Y., Lei, L., Deng, Q., Wan, L., Wan, N., Yuan, H., Gong, Y., Zou, G., . . . Jiang, H. (2021). CRISPR/Cas9 mediated gene correction ameliorates abnormal phenotypes in spinocerebellar ataxia type 3 patient-derived induced pluripotent stem cells. *Transl Psychiatry*, *11*(1), 479. <https://doi.org/10.1038/s41398-021-01605-2>
- Helm, J., Schols, L., & Hauser, S. (2022). Towards Personalized Allele-Specific Antisense Oligonucleotide Therapies for Toxic Gain-of-Function Neurodegenerative Diseases. *Pharmaceutics*, *14*(8). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081708>
- Hinrich, A. J., Jodelka, F. M., Chang, J. L., Brutman, D., Bruno, A. M., Briggs, C. A., James, B. D., Stutzmann, G. E., Bennett, D. A., Miller, S. A., Rigo, F., Marr, R. A., & Hastings, M. L. (2016). Therapeutic correction of ApoER2 splicing in Alzheimer's disease mice using antisense oligonucleotides. *EMBO Mol Med*, *8*(4), 328-345. <https://doi.org/10.15252/emmm.201505846>
- Hubener, J., Casadei, N., Teismann, P., Seeliger, M. W., Bjorkqvist, M., von Horsten, S., Riess, O., & Nguyen, H. P. (2012). Automated behavioral phenotyping reveals presymptomatic alterations in a SCA3 genetrapped mouse model. *J Genet Genomics*, *39*(6), 287-299. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2012.04.009>
- Hubener, J., Vauti, F., Funke, C., Wolburg, H., Ye, Y., Schmidt, T., Wolburg-Buchholz, K., Schmitt, I., Gardyan, A., Driessen, S., Arnold, H. H., Nguyen, H. P., & Riess, O. (2011). N-terminal ataxin-3 causes neurological symptoms with inclusions, endoplasmic reticulum stress and ribosomal dislocation. *Brain*, *134*(Pt 7), 1925-1942. <https://doi.org/10.1093/brain/awr118>
- Hubener, J., Weber, J. J., Richter, C., Honold, L., Weiss, A., Murad, F., Breuer, P., Wullner, U., Bellstedt, P., Paquet-Durand, F., Takano, J., Saido, T. C., Riess, O., & Nguyen, H. P. (2013). Calpain-mediated ataxin-3 cleavage in the molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3). *Hum Mol Genet*, *22*(3), 508-518. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds449>
- Ichikawa, Y., Goto, J., Hattori, M., Toyoda, A., Ishii, K., Jeong, S. Y., Hashida, H., Masuda, N., Ogata, K., Kasai, F., Hirai, M., Maciel, P., Rouleau, G. A., Sakaki, Y., & Kanazawa, I. (2001). The genomic structure and expression of MJD, the Machado-Joseph disease gene. *J Hum Genet*, *46*(7), 413-422. <https://doi.org/10.1007/s100380170060>
- Iwamoto, N., Butler, D. C. D., Svrzikapa, N., Mohapatra, S., Zlatev, I., Sah, D. W. Y., Meena, Standley, S. M., Lu, G., Apponi, L. H., Frank-Kamenetsky, M., Zhang, J. J., Vargeese, C., & Verdine, G. L. (2017). Control of phosphorothioate

- stereochemistry substantially increases the efficacy of antisense oligonucleotides. *Nat Biotechnol*, 35(9), 845-851. <https://doi.org/10.1038/nbt.3948>
- JacksonLaboratory. (2024). *Body Weight Information for C57BL/6J (000664)*. The Jackson Laboratory. Retrieved 2024-06-24 from <https://www.jax.org/jax-mice-and-services/strain-data-sheet-pages/body-weight-chart-000664#>
- Jansen-West, K., Todd, T. W., Daugherty, L. M., Yue, M., Tong, J., Carlomagno, Y., Del Rosso, G., Kurti, A., Jones, C. Y., Dunmore, J. A., Castanedes-Casey, M., Dickson, D. W., Wszolek, Z. K., Fryer, J. D., Petrucelli, L., & Prudencio, M. (2022). Plasma PolyQ-ATXN3 Levels Associate With Cerebellar Degeneration and Behavioral Abnormalities in a New AAV-Based SCA3 Mouse Model. *Front Cell Dev Biol*, 10, 863089. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.863089>
- Jardim, L. B., Silveira, I., Pereira, M. L., Ferro, A., Alonso, I., do Ceu Moreira, M., Mendonca, P., Ferreirinha, F., Sequeiros, J., & Giugliani, R. (2001). A survey of spinocerebellar ataxia in South Brazil - 66 new cases with Machado-Joseph disease, SCA7, SCA8, or unidentified disease-causing mutations. *J Neurol*, 248(10), 870-876. <https://doi.org/10.1007/s004150170072>
- Jia, C., Lei Mon, S. S., Yang, Y., Katsuyama, M., Yoshida-Tanaka, K., Nagata, T., Yoshioka, K., & Yokota, T. (2023). Change of intracellular calcium level causes acute neurotoxicity by antisense oligonucleotides via CSF route. *Mol Ther Nucleic Acids*, 31, 182-196. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2022.12.010>
- Juliano, R. L., & Carver, K. (2015). Cellular uptake and intracellular trafficking of oligonucleotides. *Adv Drug Deliv Rev*, 87, 35-45. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.04.005>
- Kanai, K., Kuwabara, S., Arai, K., Sung, J. Y., Ogawara, K., & Hattori, T. (2003). Muscle cramp in Machado-Joseph disease: altered motor axonal excitability properties and mexiletine treatment. *Brain*, 126(Pt 4), 965-973. <https://doi.org/10.1093/brain/awg073>
- Kandimalla, E. R., Yu, D., Zhao, Q., & Agrawal, S. (2001). Effect of chemical modifications of cytosine and guanine in a CpG-motif of oligonucleotides: structure-immunostimulatory activity relationships. *Bioorg Med Chem*, 9(3), 807-813. [https://doi.org/10.1016/s0968-0896\(00\)00316-3](https://doi.org/10.1016/s0968-0896(00)00316-3)
- Kasuya, T., Hori, S., Watanabe, A., Nakajima, M., Gahara, Y., Rokushima, M., Yanagimoto, T., & Kugimiya, A. (2016). Ribonuclease H1-dependent hepatotoxicity caused by locked nucleic acid-modified gapmer antisense oligonucleotides. *Sci Rep*, 6, 30377. <https://doi.org/10.1038/srep30377>
- Kawaguchi, Y., Okamoto, T., Taniwaki, M., Aizawa, M., Inoue, M., Katayama, S., Kawakami, H., Nakamura, S., Nishimura, M., Akiguchi, I., & et al. (1994). CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet*, 8(3), 221-228. <https://doi.org/10.1038/ng1194-221>
- Ketting, R. F., Fischer, S. E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G. J., & Plasterk, R. H. (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev*, 15(20), 2654-2659. <https://doi.org/10.1101/gad.927801>
- Kieling, C., Prestes, P. R., Saraiva-Pereira, M. L., & Jardim, L. B. (2007). Survival estimates for patients with Machado-Joseph disease (SCA3). *Clin Genet*, 72(6), 543-545. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2007.00910.x>
- Kim, J., Hu, C., Moufawad El Achkar, C., Black, L. E., Douville, J., Larson, A., Pendergast, M. K., Goldkind, S. F., Lee, E. A., Kuniholm, A., Soucy, A., Vaze,

- J., Belur, N. R., Fredriksen, K., Stojkowska, I., Tsytsykova, A., Armant, M., DiDonato, R. L., Choi, J., . . . Yu, T. W. (2019). Patient-Customized Oligonucleotide Therapy for a Rare Genetic Disease. *N Engl J Med*, 381(17), 1644-1652. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1813279>
- Klockgether, T., Mariotti, C., & Paulson, H. L. (2019). Spinocerebellar ataxia. *Nat Rev Dis Primers*, 5(1), 24. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0074-3>
- Klockgether, T., Schols, L., Abele, M., Burk, K., Topka, H., Andres, F., Amoiridis, G., Ludtke, R., Riess, O., Laccone, F., & Dichgans, J. (1999). Age related axonal neuropathy in spinocerebellar ataxia type 3/Machado-Joseph disease (SCA3/MJD). *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 66(2), 222-224. <https://doi.org/10.1136/jnnp.66.2.222>
- Klockgether, T., Skalej, M., Wedekind, D., Luft, A. R., Welte, D., Schulz, J. B., Abele, M., Burk, K., Laccone, F., Brice, A., & Dichgans, J. (1998). Autosomal dominant cerebellar ataxia type I. MRI-based volumetry of posterior fossa structures and basal ganglia in spinocerebellar ataxia types 1, 2 and 3. *Brain*, 121 ( Pt 9), 1687-1693. <https://doi.org/10.1093/brain/121.9.1687>
- Kordasiewicz, H. B., Stanek, L. M., Wancewicz, E. V., Mazur, C., McAlonis, M. M., Pytel, K. A., Artates, J. W., Weiss, A., Cheng, S. H., Shihabuddin, L. S., Hung, G., Bennett, C. F., & Cleveland, D. W. (2012). Sustained therapeutic reversal of Huntington's disease by transient repression of huntingtin synthesis. *Neuron*, 74(6), 1031-1044. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.05.009>
- Kourkouta, E., Weij, R., Gonzalez-Barriga, A., Mulder, M., Verheul, R., Bosgra, S., Groenendaal, B., Puolivali, J., Toivanen, J., van Deutekom, J. C. T., & Datson, N. A. (2019). Suppression of Mutant Protein Expression in SCA3 and SCA1 Mice Using a CAG Repeat-Targeting Antisense Oligonucleotide. *Mol Ther Nucleic Acids*, 17, 601-614. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.07.004>
- Krieg, A. M., Yi, A. K., Matson, S., Waldschmidt, T. J., Bishop, G. A., Teasdale, R., Koretzky, G. A., & Klinman, D. M. (1995). CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*, 374(6522), 546-549. <https://doi.org/10.1038/374546a0>
- Kristensen, L. V., Oppermann, F. S., Rauen, M. J., Fog, K., Schmidt, T., Schmidt, J., Harmuth, T., Hartmann-Petersen, R., & Thirstrup, K. (2018). Mass spectrometry analyses of normal and polyglutamine expanded ataxin-3 reveal novel interaction partners involved in mitochondrial function. *Neurochem Int*, 112, 5-17. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.10.013>
- Kutyavin, I. V., Lokhov, S. G., Afonina, I. A., Dempcy, R., Gall, A. A., Gorn, V. V., Lukhtanov, E., Metcalf, M., Mills, A., Reed, M. W., Sanders, S., Shishkina, I., & Vermeulen, N. M. (2002). Reduced aggregation and improved specificity of G-rich oligodeoxyribonucleotides containing pyrazolo[3,4-d]pyrimidine guanine bases. *Nucleic Acids Res*, 30(22), 4952-4959. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf631>
- Lang, A. E., Rogaeva, E. A., Tsuda, T., Hutterer, J., & St George-Hyslop, P. (1994). Homozygous inheritance of the Machado-Joseph disease gene. *Ann Neurol*, 36(3), 443-447. <https://doi.org/10.1002/ana.410360318>
- Lang, J., Haas, E., Hubener-Schmid, J., Anderson, C. J., Pulst, S. M., Giese, M. A., & Ilg, W. (2020). Detecting and Quantifying Ataxia-Related Motor Impairments in Rodents Using Markerless Motion Tracking With Deep Neural Networks. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc*, 2020, 3642-3648. <https://doi.org/10.1109/EMBC44109.2020.9176701>

- Lauffer, M. C., van Roon-Mom, W., Aartsma-Rus, A., & Collaborative, N. (2024). Possibilities and limitations of antisense oligonucleotide therapies for the treatment of monogenic disorders. *Commun Med (Lond)*, 4(1), 6. <https://doi.org/10.1038/s43856-023-00419-1>
- Lee, S. W., Song, M. K., Baek, K. H., Park, Y., Kim, J. K., Lee, C. H., Cheong, H. K., Cheong, C., & Sung, Y. C. (2000). Effects of a hexameric deoxyriboguanosine run conjugation into CpG oligodeoxynucleotides on their immunostimulatory potentials. *J Immunol*, 165(7), 3631-3639. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.7.3631>
- Li, F., Macfarlan, T., Pittman, R. N., & Chakravarti, D. (2002). Ataxin-3 is a histone-binding protein with two independent transcriptional corepressor activities. *J Biol Chem*, 277(47), 45004-45012. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205259200>
- Li, L. B., & Bonini, N. M. (2010). Roles of trinucleotide-repeat RNA in neurological disease and degeneration. *Trends Neurosci*, 33(6), 292-298. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.03.004>
- Li, L. B., Yu, Z., Teng, X., & Bonini, N. M. (2008). RNA toxicity is a component of ataxin-3 degeneration in Drosophila. *Nature*, 453(7198), 1107-1111. <https://doi.org/10.1038/nature06909>
- Liang, X. H., Shen, W., Sun, H., Kinberger, G. A., Prakash, T. P., Nichols, J. G., & Crooke, S. T. (2016). Hsp90 protein interacts with phosphorothioate oligonucleotides containing hydrophobic 2'-modifications and enhances antisense activity. *Nucleic Acids Res*, 44(8), 3892-3907. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw144>
- Lim, K. R., Maruyama, R., & Yokota, T. (2017). Eteplirsen in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Drug Des Devel Ther*, 11, 533-545. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S97635>
- Lima, L., & Coutinho, P. (1980). Clinical criteria for diagnosis of Machado-Joseph disease: report of a non-Azorena Portuguese family. *Neurology*, 30(3), 319-322. <https://doi.org/10.1212/wnl.30.3.319>
- Lima, W. F., Murray, H. M., Damle, S. S., Hart, C. E., Hung, G., De Hoyos, C. L., Liang, X. H., & Crooke, S. T. (2016). Viable RNaseH1 knockout mice show RNaseH1 is essential for R loop processing, mitochondrial and liver function. *Nucleic Acids Res*, 44(11), 5299-5312. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw350>
- Lima, W. F., Rose, J. B., Nichols, J. G., Wu, H., Migawa, M. T., Wyrzykiewicz, T. K., Vasquez, G., Swayze, E. E., & Crooke, S. T. (2007). The positional influence of the helical geometry of the heteroduplex substrate on human RNase H1 catalysis. *Mol Pharmacol*, 71(1), 73-82. <https://doi.org/10.1124/mol.106.025429>
- Liu, C. S., Hsu, H. M., Cheng, W. L., & Hsieh, M. (2005). Clinical and molecular events in patients with Machado-Joseph disease under lamotrigine therapy. *Acta Neurol Scand*, 111(6), 385-390. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.2005.00405.x>
- Maciel, P., Gaspar, C., DeStefano, A. L., Silveira, I., Coutinho, P., Radvany, J., Dawson, D. M., Sudarsky, L., Guimaraes, J., Loureiro, J. E., & et al. (1995). Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease. *Am J Hum Genet*, 57(1), 54-61. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7611296>
- Maciel, P., Gaspar, C., Guimaraes, L., Goto, J., Lopes-Cendes, I., Hayes, S., Arvidsson, K., Dias, A., Sequeiros, J., Sousa, A., & Rouleau, G. A. (1999). Study of three intragenic polymorphisms in the Machado-Joseph disease gene (MJD1) in

- relation to genetic instability of the (CAG)<sub>n</sub> tract. *Eur J Hum Genet*, 7(2), 147-156. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200264>
- Mansoor, M., & Melendez, A. J. (2008). Advances in antisense oligonucleotide development for target identification, validation, and as novel therapeutics. *Gene Regul Syst Bio*, 2, 275-295. <https://doi.org/10.4137/grsb.s418>
- Mao, Y., Senic-Matuglia, F., Di Fiore, P. P., Polo, S., Hodsdon, M. E., & De Camilli, P. (2005). Deubiquitinating function of ataxin-3: insights from the solution structure of the Josephin domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(36), 12700-12705. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506344102>
- Martier, R., Sogorb-Gonzalez, M., Stricker-Shaver, J., Hubener-Schmid, J., Keskin, S., Klima, J., Toonen, L. J., Juhas, S., Juhasova, J., Ellederova, Z., Motlik, J., Haas, E., van Deventer, S., Konstantinova, P., Nguyen, H. P., & Evers, M. M. (2019). Development of an AAV-Based MicroRNA Gene Therapy to Treat Machado-Joseph Disease. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 15, 343-358. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.10.008>
- Marwick, C. (1998). First "antisense" drug will treat CMV retinitis. *JAMA*, 280(10), 871. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9739955>
- Matsubayashi, T., Yoshioka, K., Lei Mon, S. S., Katsuyama, M., Jia, C., Yamaguchi, T., Hara, R. I., Nagata, T., Nakagawa, O., Obika, S., & Yokota, T. (2024). Erratum: Favorable efficacy and reduced acute neurotoxicity by antisense oligonucleotides with 2',4' -BNA/LNA with 9-(aminoethoxy)phenoxazine. *Mol Ther Nucleic Acids*, 35(2), 102182. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2024.102182>
- McCampbell, A., Cole, T., Wegener, A. J., Tomassy, G. S., Setnicka, A., Farley, B. J., Schoch, K. M., Hoyer, M. L., Shabsovich, M., Sun, L., Luo, Y., Zhang, M., Comfort, N., Wang, B., Amacker, J., Thankamony, S., Salzman, D. W., Cudkowicz, M., Graham, D. L., . . . Miller, T. M. (2018). Antisense oligonucleotides extend survival and reverse decrement in muscle response in ALS models. *J Clin Invest*, 128(8), 3558-3567. <https://doi.org/10.1172/JCI99081>
- McLoughlin, H. S., Moore, L. R., Chopra, R., Komlo, R., McKenzie, M., Blumenstein, K. G., Zhao, H., Kordasiewicz, H. B., Shakkottai, V. G., & Paulson, H. L. (2018). Oligonucleotide therapy mitigates disease in spinocerebellar ataxia type 3 mice. *Ann Neurol*, 84(1), 64-77. <https://doi.org/10.1002/ana.25264>
- Menard, C., Valastro, B., Martel, M. A., Martinoli, M. G., & Massicotte, G. (2004). Strain-related variations of AMPA receptor modulation by calcium-dependent mechanisms in the hippocampus: contribution of lipoxygenase metabolites of arachidonic acid. *Brain Res*, 1010(1-2), 134-143. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.03.012>
- Mercuri, E., Darras, B. T., Chiriboga, C. A., Day, J. W., Campbell, C., Connolly, A. M., Iannaccone, S. T., Kirschner, J., Kuntz, N. L., Saito, K., Shieh, P. B., Tulinius, M., Mazzone, E. S., Montes, J., Bishop, K. M., Yang, Q., Foster, R., Gheuens, S., Bennett, C. F., . . . Group, C. S. (2018). Nusinersen versus Sham Control in Later-Onset Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med*, 378(7), 625-635. <https://doi.org/10.1056/NEJMoal710504>
- Miller, T., Cudkowicz, M., Shaw, P. J., Andersen, P. M., Atassi, N., Bucelli, R. C., Genge, A., Glass, J., Ladha, S., Ludolph, A. L., Maragakis, N. J., McDermott, C. J., Pestronk, A., Ravits, J., Salachas, F., Trudell, R., Van Damme, P., Zinman, L., Bennett, C. F., . . . Ferguson, T. A. (2020). Phase 1-2 Trial of Antisense

- Oligonucleotide Tofersen for SOD1 ALS. *N Engl J Med*, 383(2), 109-119. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2003715>
- Miller, V. M., Xia, H., Marrs, G. L., Gouvion, C. M., Lee, G., Davidson, B. L., & Paulson, H. L. (2003). Allele-specific silencing of dominant disease genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(12), 7195-7200. <https://doi.org/10.1073/pnas.1231012100>
- Moazami, M. P., Rembetsy-Brown, J. M., Wang, F., Krishnamurthy, P. M., Weiss, A., Marosfoi, M., King, R. M., Motwani, M., Gray-Edwards, H., Fitzgerald, K. A., Brown, R. H., & Watts, J. K. (2021). Quantifying and Mitigating Motor Phenotypes Induced by Antisense Oligonucleotides in the Central Nervous System. *bioRxiv*, 2021.2002.2014.431096. <https://doi.org/10.1101/2021.02.14.431096>
- Monahan, J. B., Hood, W. F., Michel, J., & Compton, R. P. (1988). Effects of guanine nucleotides on N-methyl-D-aspartate receptor-ligand interactions. *Mol Pharmacol*, 34(2), 111-116. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2842650>
- Monia, B. P., Lesnik, E. A., Gonzalez, C., Lima, W. F., McGee, D., Guinasso, C. J., Kawasaki, A. M., Cook, P. D., & Freier, S. M. (1993). Evaluation of 2'-modified oligonucleotides containing 2'-deoxy gaps as antisense inhibitors of gene expression. *J Biol Chem*, 268(19), 14514-14522. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8390996>
- Moore, L. R., Keller, L., Bushart, D. D., Delatorre, R. G., Li, D., McLoughlin, H. S., do Carmo Costa, M., Shakkottai, V. G., Smith, G. D., & Paulson, H. L. (2019). Antisense oligonucleotide therapy rescues aggregates formation in a novel spinocerebellar ataxia type 3 human embryonic stem cell line. *Stem Cell Res*, 39, 101504. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2019.101504>
- Moore, L. R., Rajpal, G., Dillingham, I. T., Qutob, M., Blumenstein, K. G., Gattis, D., Hung, G., Kordasiewicz, H. B., Paulson, H. L., & McLoughlin, H. S. (2017). Evaluation of Antisense Oligonucleotides Targeting ATXN3 in SCA3 Mouse Models. *Mol Ther Nucleic Acids*, 7, 200-210. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.04.005>
- Moscato, A., Grothe, M. J., Ashton, N. J., Karikari, T. K., Lantero Rodriguez, J., Snellman, A., Suarez-Calvet, M., Blennow, K., Zetterberg, H., Scholl, M., & Alzheimer's Disease Neuroimaging, I. (2021). Longitudinal Associations of Blood Phosphorylated Tau181 and Neurofilament Light Chain With Neurodegeneration in Alzheimer Disease. *JAMA Neurol*, 78(4), 396-406. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.4986>
- Nakano, K. K., Dawson, D. M., & Spence, A. (1972). Machado disease. A hereditary ataxia in Portuguese emigrants to Massachusetts. *Neurology*, 22(1), 49-55. <https://doi.org/10.1212/wnl.22.1.49>
- Nandagopal, R., & Moorthy, S. G. (2004). Dramatic levodopa responsiveness of dystonia in a sporadic case of spinocerebellar ataxia type 3. *Postgrad Med J*, 80(944), 363-365. <https://doi.org/10.1136/pgmj.2003.015297>
- NeuromuscularDiseaseCenter. (2024). Hereditary Ataxias: Dominant. *Washington University, USA*.
- NIH. (2024a). *ClinicalTrials.gov - SCA3 | antisense oligonucleotide*. National Library of Medicine. Retrieved 2024-06-23 from <https://clinicaltrials.gov/search?cond=SCA3&intr=antisense%20oligonucleotide>

- NIH. (2024b). *ClinicalTrials.gov - SCA3 | microRNA*. National Library of Medicine. Retrieved 2024-06-23 from <https://clinicaltrials.gov/search?cond=SCA3&intr=microRNA>
- NIH. (2024c). *ClinicalTrials.gov - SCA3 | shRNA*. National Library of Medicine. Retrieved 2024-06-23 from <https://clinicaltrials.gov/search?cond=SCA3&intr=shRNA>
- NIH. (2024d). *ClinicalTrials.gov - SCA3 | siRNA*. National Library of Medicine. Retrieved 2024-06-23 from <https://clinicaltrials.gov/search?cond=SCA3&intr=siRNA>
- Nobre, R. J., Lobo, D. D., Henriques, C., Duarte, S. P., Lopes, S. M., Silva, A. C., Lopes, M. M., Mariet, F., Schwarz, L. K., Baatje, M. S., Ferreira, V., Valles, A., Pereira de Almeida, L., Evers, M. M., & Toonen, L. J. A. (2022). miRNA-Mediated Knockdown of ATXN3 Alleviates Molecular Disease Hallmarks in a Mouse Model for Spinocerebellar Ataxia Type 3. *Nucleic Acid Ther*, 32(3), 194-205. <https://doi.org/10.1089/nat.2021.0020>
- Nobrega, C., Codesso, J. M., Mendonca, L., & Pereira de Almeida, L. (2019). RNA Interference Therapy for Machado-Joseph Disease: Long-Term Safety Profile of Lentiviral Vectors Encoding Short Hairpin RNAs Targeting Mutant Ataxin-3. *Hum Gene Ther*, 30(7), 841-854. <https://doi.org/10.1089/hum.2018.157>
- Nobrega, C., Nascimento-Ferreira, I., Onofre, I., Albuquerque, D., Hirai, H., Deglon, N., & de Almeida, L. P. (2013). Silencing mutant ataxin-3 rescues motor deficits and neuropathology in Machado-Joseph disease transgenic mice. *PLoS One*, 8(1), e52396. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052396>
- Oberemok, V. V., Laikova, K. V., Repetskaya, A. I., Kenyo, I. M., Gorlov, M. V., Kasich, I. N., Krasnodubets, A. M., Gal'chinsky, N. V., Fomochkina, II, Zaitsev, A. S., Bekirova, V. V., Seidosmanova, E. E., Dydik, K. I., Meshcheryakova, A. O., Nazarov, S. A., Smagliy, N. N., Chelengerova, E. L., Kulanova, A. A., Deri, K., . . . Kubyshev, A. V. (2018). A Half-Century History of Applications of Antisense Oligonucleotides in Medicine, Agriculture and Forestry: We Should Continue the Journey. *Molecules*, 23(6). <https://doi.org/10.3390/molecules23061302>
- Paulson, H. (2012). Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3. *Handb Clin Neurol*, 103, 437-449. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-51892-7.00027-9>
- Paulson, H., & Groff, L. (2022). Ataxia - Molecular and cellular mechanisms. [https://s3-us-east-2.amazonaws.com/mds-lms/FroalaFiles/Lecture%20Slides\\_Ataxia%20-%20Molecular%20and%20Cellular%20Mechanisms%20-%20Henry%20Paulson\\_10112022043902.pdf](https://s3-us-east-2.amazonaws.com/mds-lms/FroalaFiles/Lecture%20Slides_Ataxia%20-%20Molecular%20and%20Cellular%20Mechanisms%20-%20Henry%20Paulson_10112022043902.pdf)
- Paulson, H., & Shakkottai, V. (1993). Spinocerebellar Ataxia Type 3. In M. P. Adam, J. Feldman, G. M. Mirzaa, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. H. Bean, K. W. Gripp, & A. Amemiya (Eds.), *GeneReviews((R))*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301375>
- Paulson, H. L. (2007). Dominantly inherited ataxias: lessons learned from Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3. *Semin Neurol*, 27(2), 133-142. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971172>
- Paulson, H. L., Das, S. S., Crino, P. B., Perez, M. K., Patel, S. C., Gotsdiner, D., Fischbeck, K. H., & Pittman, R. N. (1997). Machado-Joseph disease gene product is a cytoplasmic protein widely expressed in brain. *Ann Neurol*, 41(4), 453-462. <https://doi.org/10.1002/ana.410410408>

- Paulson, H. L., Perez, M. K., Trotter, Y., Trojanowski, J. Q., Subramony, S. H., Das, S. S., Vig, P., Mandel, J. L., Fischbeck, K. H., & Pittman, R. N. (1997). Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinocerebellar ataxia type 3. *Neuron*, 19(2), 333-344. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80943-5](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80943-5)
- Pearson, A. M., Rich, A., & Krieger, M. (1993). Polynucleotide binding to macrophage scavenger receptors depends on the formation of base-quartet-stabilized four-stranded helices. *J Biol Chem*, 268(5), 3546-3554. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8429030>
- Perez, M. K., Paulson, H. L., Pendse, S. J., Saionz, S. J., Bonini, N. M., & Pittman, R. N. (1998). Recruitment and the role of nuclear localization in polyglutamine-mediated aggregation. *J Cell Biol*, 143(6), 1457-1470. <https://doi.org/10.1083/jcb.143.6.1457>
- Pozzi, C., Valtorta, M., Tedeschi, G., Galbusera, E., Pastori, V., Bigi, A., Nonnis, S., Grassi, E., & Fusi, P. (2008). Study of subcellular localization and proteolysis of ataxin-3. *Neurobiol Dis*, 30(2), 190-200. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.01.011>
- Pulst, S. M. (2019). [Antisense therapies for neurological diseases]. *Nervenarzt*, 90(8), 781-786. <https://doi.org/10.1007/s00115-019-0724-4> (Antisense-Therapie neurologischer Erkrankungen.)
- Ramani, B., Harris, G. M., Huang, R., Seki, T., Murphy, G. G., Costa Mdo, C., Fischer, S., Saunders, T. L., Xia, G., McEachin, R. C., & Paulson, H. L. (2015). A knockin mouse model of spinocerebellar ataxia type 3 exhibits prominent aggregate pathology and aberrant splicing of the disease gene transcript. *Hum Mol Genet*, 24(5), 1211-1224. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu532>
- Riess, O., Rub, U., Pastore, A., Bauer, P., & Schols, L. (2008). SCA3: neurological features, pathogenesis and animal models. *Cerebellum*, 7(2), 125-137. <https://doi.org/10.1007/s12311-008-0013-4>
- Rodrigues, A. J., Coppola, G., Santos, C., Costa Mdo, C., Ailion, M., Sequeiros, J., Geschwind, D. H., & Maciel, P. (2007). Functional genomics and biochemical characterization of the C. elegans orthologue of the Machado-Joseph disease protein ataxin-3. *FASEB J*, 21(4), 1126-1136. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7002com>
- Rodriguez-Lebron, E., Costa Mdo, C., Luna-Cancelon, K., Peron, T. M., Fischer, S., Boudreau, R. L., Davidson, B. L., & Paulson, H. L. (2013). Silencing mutant ATXN3 expression resolves molecular phenotypes in SCA3 transgenic mice. *Mol Ther*, 21(10), 1909-1918. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.152>
- Rook, M. E., & Southwell, A. L. (2022). Antisense Oligonucleotide Therapy: From Design to the Huntington Disease Clinic. *BioDrugs*, 36(2), 105-119. <https://doi.org/10.1007/s40259-022-00519-9>
- Rosenberg, R. N. (1992). Machado-Joseph disease: an autosomal dominant motor system degeneration. *Mov Disord*, 7(3), 193-203. <https://doi.org/10.1002/mds.870070302>
- Rosenberg, R. N., Nyhan, W. L., Bay, C., & Shore, P. (1976). Autosomal dominant striatonigral degeneration. A clinical, pathologic, and biochemical study of a new genetic disorder. *Neurology*, 26(8), 703-714. <https://doi.org/10.1212/wnl.26.8.703>

- Rub, U., Brunt, E. R., & Deller, T. (2008). New insights into the pathoanatomy of spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease). *Curr Opin Neurol*, 21(2), 111-116. <https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e3282f7673d>
- Rub, U., de Vos, R. A., Brunt, E. R., Sebesteny, T., Schols, L., Auburger, G., Bohl, J., Ghebremedhin, E., Gierga, K., Seidel, K., den Dunnen, W., Heinsen, H., Paulson, H., & Deller, T. (2006). Spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3): thalamic neurodegeneration occurs independently from thalamic ataxin-3 immunopositive neuronal intranuclear inclusions. *Brain Pathol*, 16(3), 218-227. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2006.00022.x>
- Russo, A. D., Reckziegel, E. R., Krum-Santos, A. C., Augustin, M. C., Scheeren, B., Freitas, C. D., Torman, V. L., Saraiva-Pereira, M. L., Saute, J. A., & Jardim, L. B. (2015). Clinical Scales Predict Significant Videofluoroscopic Dysphagia in Machado Joseph Disease Patients. *Mov Disord Clin Pract*, 2(3), 260-266. <https://doi.org/10.1002/mdc3.12173>
- Sakai, T., Antoku, Y., Matsuishi, T., & Iwashita, H. (1996). Tetrahydrobiopterin double-blind, crossover trial in Machado-Joseph disease. *J Neurol Sci*, 136(1-2), 71-72. [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(95\)00296-e](https://doi.org/10.1016/0022-510x(95)00296-e)
- Sakai, T., Matsuishi, T., Yamada, S., Komori, H., & Iwashita, H. (1995). Sulfamethoxazole-trimethoprim double-blind, placebo-controlled, crossover trial in Machado-Joseph disease: sulfamethoxazole-trimethoprim increases cerebrospinal fluid level of biopterin. *J Neural Transm Gen Sect*, 102(2), 159-172. <https://doi.org/10.1007/BF01276511>
- Saliminejad, K., Khorram Khorshid, H. R., Soleymani Fard, S., & Ghaffari, S. H. (2019). An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J Cell Physiol*, 234(5), 5451-5465. <https://doi.org/10.1002/jcp.27486>
- Saute, J. A., da Silva, A. C., Muller, A. P., Hansel, G., de Mello, A. S., Maeda, F., Vedolin, L., Saraiva-Pereira, M. L., Souza, D. O., Arpa, J., Torres-Aleman, I., Portela, L. V., & Jardim, L. B. (2011). Serum insulin-like system alterations in patients with spinocerebellar ataxia type 3. *Mov Disord*, 26(4), 731-735. <https://doi.org/10.1002/mds.23428>
- Saute, J. A., Silva, A. C., Souza, G. N., Russo, A. D., Donis, K. C., Vedolin, L., Saraiva-Pereira, M. L., Portela, L. V., & Jardim, L. B. (2012). Body mass index is inversely correlated with the expanded CAG repeat length in SCA3/MJD patients. *Cerebellum*, 11(3), 771-774. <https://doi.org/10.1007/s12311-011-0326-6>
- Scheel, H., Tomiuk, S., & Hofmann, K. (2003). Elucidation of ataxin-3 and ataxin-7 function by integrative bioinformatics. *Hum Mol Genet*, 12(21), 2845-2852. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg297>
- Schmidt, T., Landwehrmeyer, G. B., Schmitt, I., Trottier, Y., Auburger, G., Laccone, F., Klockgether, T., Volpel, M., Epplen, J. T., Schols, L., & Riess, O. (1998). An isoform of ataxin-3 accumulates in the nucleus of neuronal cells in affected brain regions of SCA3 patients. *Brain Pathol*, 8(4), 669-679. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1998.tb00193.x>
- Schmitt, I., Linden, M., Khazneh, H., Evert, B. O., Breuer, P., Klockgether, T., & Wuellner, U. (2007). Inactivation of the mouse Atxn3 (ataxin-3) gene increases protein ubiquitination. *Biochem Biophys Res Commun*, 362(3), 734-739. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.08.062>
- Schmitz-Hubsch, T., Coudert, M., Bauer, P., Giunti, P., Globas, C., Baliko, L., Filla, A., Mariotti, C., Rakowicz, M., Charles, P., Ribai, P., Szymanski, S., Infante, J., van

- de Warrenburg, B. P., Durr, A., Timmann, D., Boesch, S., Fancellu, R., Rola, R., . . . Klockgether, T. (2008). Spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6: disease severity and nonataxia symptoms. *Neurology*, 71(13), 982-989. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000325057.33666.72>
- Schmitz-Hubsch, T., du Montcel, S. T., Baliko, L., Berciano, J., Boesch, S., Depondt, C., Giunti, P., Globas, C., Infante, J., Kang, J. S., Kremer, B., Mariotti, C., Melegh, B., Pandolfo, M., Rakowicz, M., Ribai, P., Rola, R., Schols, L., Szymanski, S., . . . Fancellu, R. (2006). Scale for the assessment and rating of ataxia: development of a new clinical scale. *Neurology*, 66(11), 1717-1720. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000219042.60538.92>
- Schols, L., Amoiridis, G., Langkafel, M., Buttner, T., Przuntek, H., Riess, O., Vieira-Saecker, A. M., & Epplen, J. T. (1995). Machado-Joseph disease mutations as the genetic basis of most spinocerebellar ataxias in Germany. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 59(4), 449-450. <https://doi.org/10.1136/jnnp.59.4.449>
- Schols, L., Haan, J., Riess, O., Amoiridis, G., & Przuntek, H. (1998). Sleep disturbance in spinocerebellar ataxias: is the SCA3 mutation a cause of restless legs syndrome? *Neurology*, 51(6), 1603-1607. <https://doi.org/10.1212/wnl.51.6.1603>
- Schols, L., Peters, S., Szymanski, S., Kruger, R., Lange, S., Hardt, C., Riess, O., & Przuntek, H. (2000). Extrapyrmidal motor signs in degenerative ataxias. *Arch Neurol*, 57(10), 1495-1500. <https://doi.org/10.1001/archneur.57.10.1495>
- Schols, L., Vieira-Saecker, A. M., Schols, S., Przuntek, H., Epplen, J. T., & Riess, O. (1995). Trinucleotide expansion within the MJD1 gene presents clinically as spinocerebellar ataxia and occurs most frequently in German SCA patients. *Hum Mol Genet*, 4(6), 1001-1005. <https://doi.org/10.1093/hmg/4.6.1001>
- Schulte, T., Mattern, R., Berger, K., Szymanski, S., Klotz, P., Kraus, P. H., Przuntek, H., & Schols, L. (2001). Double-blind crossover trial of trimethoprim-sulfamethoxazole in spinocerebellar ataxia type 3/Machado-Joseph disease. *Arch Neurol*, 58(9), 1451-1457. <https://doi.org/10.1001/archneur.58.9.1451>
- Scoles, D. R., Minikel, E. V., & Pulst, S. M. (2019). Antisense oligonucleotides: A primer. *Neurol Genet*, 5(2), e323. <https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000323>
- Segal, B. M., Chang, J. T., & Shevach, E. M. (2000). CpG oligonucleotides are potent adjuvants for the activation of autoreactive encephalitogenic T cells in vivo. *J Immunol*, 164(11), 5683-5688. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.11.5683>
- Shakkottai, V. G., do Carmo Costa, M., Dell'Orco, J. M., Sankaranarayanan, A., Wulff, H., & Paulson, H. L. (2011). Early changes in cerebellar physiology accompany motor dysfunction in the polyglutamine disease spinocerebellar ataxia type 3. *J Neurosci*, 31(36), 13002-13014. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2789-11.2011>
- Shen, L., Frazer-Abel, A., Reynolds, P. R., Giclas, P. C., Chappell, A., Pangburn, M. K., Younis, H., & Henry, S. P. (2014). Mechanistic understanding for the greater sensitivity of monkeys to antisense oligonucleotide-mediated complement activation compared with humans. *J Pharmacol Exp Ther*, 351(3), 709-717. <https://doi.org/10.1124/jpet.114.219378>
- Shen, W., De Hoyos, C. L., Migawa, M. T., Vickers, T. A., Sun, H., Low, A., Bell, T. A., 3rd, Rahdar, M., Mukhopadhyay, S., Hart, C. E., Bell, M., Riney, S., Murray, S. F., Greenlee, S., Crooke, R. M., Liang, X. H., Seth, P. P., & Crooke, S. T. (2019). Chemical modification of PS-ASO therapeutics reduces cellular protein-binding

- and improves the therapeutic index. *Nat Biotechnol*, 37(6), 640-650. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0106-2>
- Shibata-Hamaguchi, A., Ishida, C., Iwasa, K., & Yamada, M. (2009). Prevalence of spinocerebellar degenerations in the Hokuriku district in Japan. *Neuroepidemiology*, 32(3), 176-183. <https://doi.org/10.1159/000195686>
- Silveira, I., Miranda, C., Guimaraes, L., Moreira, M. C., Alonso, I., Mendonca, P., Ferro, A., Pinto-Basto, J., Coelho, J., Ferreira, F., Poirier, J., Parreira, E., Vale, J., Januario, C., Barbot, C., Tuna, A., Barros, J., Koide, R., Tsuji, S., . . . Sequeiros, J. (2002). Trinucleotide repeats in 202 families with ataxia: a small expanded (CAG)<sub>n</sub> allele at the SCA17 locus. *Arch Neurol*, 59(4), 623-629. <https://doi.org/10.1001/archneur.59.4.623>
- Sobue, G., Doyu, M., Nakao, N., Shimada, N., Mitsuma, T., Maruyama, H., Kawakami, S., & Nakamura, S. (1996). Homozygosity for Machado-Joseph disease gene enhances phenotypic severity. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 60(3), 354-356. <https://doi.org/10.1136/jnnp.60.3.354-a>
- Stahl, F., Evert, B. O., Han, X., Breuer, P., & Wullner, U. (2024). Spinocerebellar Ataxia Type 3 Pathophysiology-Implications for Translational Research and Clinical Studies. *Int J Mol Sci*, 25(7). <https://doi.org/10.3390/ijms25073984>
- Swayze, E. E., Siwkowski, A. M., Wancewicz, E. V., Migawa, M. T., Wyrzykiewicz, T. K., Hung, G., Monia, B. P., & Bennett, C. F. (2007). Antisense oligonucleotides containing locked nucleic acid improve potency but cause significant hepatotoxicity in animals. *Nucleic Acids Res*, 35(2), 687-700. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl1071>
- Switonski, P. M., Fiszler, A., Kazmierska, K., Kurpysz, M., Krzyzosiak, W. J., & Figiel, M. (2011). Mouse ataxin-3 functional knock-out model. *Neuromolecular Med*, 13(1), 54-65. <https://doi.org/10.1007/s12017-010-8137-3>
- Switonski, P. M., Szlachcic, W. J., Krzyzosiak, W. J., & Figiel, M. (2015). A new humanized ataxin-3 knock-in mouse model combines the genetic features, pathogenesis of neurons and glia and late disease onset of SCA3/MJD. *Neurobiol Dis*, 73, 174-188. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.09.020>
- Takei, A., Hamada, T., Yabe, I., & Sasaki, H. (2005). Treatment of cerebellar ataxia with 5-HT1A agonist. *Cerebellum*, 4(3), 211-215. <https://doi.org/10.1080/14734220500222318>
- Takiyama, Y., Nishizawa, M., Tanaka, H., Kawashima, S., Sakamoto, H., Karube, Y., Shimazaki, H., Soutome, M., Endo, K., Ohta, S., & et al. (1993). The gene for Machado-Joseph disease maps to human chromosome 14q. *Nat Genet*, 4(3), 300-304. <https://doi.org/10.1038/ng0793-300>
- Takiyama, Y., Oyanagi, S., Kawashima, S., Sakamoto, H., Saito, K., Yoshida, M., Tsuji, S., Mizuno, Y., & Nishizawa, M. (1994). A clinical and pathologic study of a large Japanese family with Machado-Joseph disease tightly linked to the DNA markers on chromosome 14q. *Neurology*, 44(7), 1302-1308. <https://doi.org/10.1212/wnl.44.7.1302>
- Tang, Z., Hu, S., Wu, Z., & He, M. (2023). Therapeutic effects of engineered exosome-based miR-25 and miR-181a treatment in spinocerebellar ataxia type 3 mice by silencing ATXN3. *Mol Med*, 29(1), 96. <https://doi.org/10.1186/s10020-023-00695-6>
- Toonen, L. J., Schmidt, I., Luijsterburg, M. S., van Attikum, H., & van Roon-Mom, W. M. (2016). Antisense oligonucleotide-mediated exon skipping as a strategy to

- reduce proteolytic cleavage of ataxin-3. *Sci Rep*, 6, 35200. <https://doi.org/10.1038/srep35200>
- Toonen, L. J. A., Casaca-Carreira, J., Pellise-Tintore, M., Mei, H., Temel, Y., Jahanshahi, A., & van Roon-Mom, W. M. C. (2018). Intracerebroventricular Administration of a 2'-O-Methyl Phosphorothioate Antisense Oligonucleotide Results in Activation of the Innate Immune System in Mouse Brain. *Nucleic Acid Ther*, 28(2), 63-73. <https://doi.org/10.1089/nat.2017.0705>
- Toonen, L. J. A., Overzier, M., Evers, M. M., Leon, L. G., van der Zeeuw, S. A. J., Mei, H., Kielbasa, S. M., Goeman, J. J., Hettne, K. M., Magnusson, O. T., Poirel, M., Seyer, A., t Hoen, P. A. C., & van Roon-Mom, W. M. C. (2018). Transcriptional profiling and biomarker identification reveal tissue specific effects of expanded ataxin-3 in a spinocerebellar ataxia type 3 mouse model. *Mol Neurodegener*, 13(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s13024-018-0261-9>
- Toonen, L. J. A., Rigo, F., van Attikum, H., & van Roon-Mom, W. M. C. (2017). Antisense Oligonucleotide-Mediated Removal of the Polyglutamine Repeat in Spinocerebellar Ataxia Type 3 Mice. *Mol Ther Nucleic Acids*, 8, 232-242. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.06.019>
- Trottier, Y., Cancel, G., An-Gourfinkel, I., Lutz, Y., Weber, C., Brice, A., Hirsch, E., & Mandel, J. L. (1998). Heterogeneous intracellular localization and expression of ataxin-3. *Neurobiol Dis*, 5(5), 335-347. <https://doi.org/10.1006/nbdi.1998.0208>
- Tsoi, H., Lau, C. K., Lau, K. F., & Chan, H. Y. (2011). Perturbation of U2AF65/NXF1-mediated RNA nuclear export enhances RNA toxicity in polyQ diseases. *Hum Mol Genet*, 20(19), 3787-3797. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr297>
- Tuite, P. J., Rogaeva, E. A., St George-Hyslop, P. H., & Lang, A. E. (1995). Dopa-responsive parkinsonism phenotype of Machado-Joseph disease: confirmation of 14q CAG expansion. *Ann Neurol*, 38(4), 684-687. <https://doi.org/10.1002/ana.410380422>
- Vickers, T. A., & Crooke, S. T. (2016). Development of a Quantitative BRET Affinity Assay for Nucleic Acid-Protein Interactions. *PLoS One*, 11(8), e0161930. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161930>
- Wang, G., Ide, K., Nukina, N., Goto, J., Ichikawa, Y., Uchida, K., Sakamoto, T., & Kanazawa, I. (1997). Machado-Joseph disease gene product identified in lymphocytes and brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 233(2), 476-479. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6484>
- Warrick, J. M., Morabito, L. M., Bilen, J., Gordesky-Gold, B., Faust, L. Z., Paulson, H. L., & Bonini, N. M. (2005). Ataxin-3 suppresses polyglutamine neurodegeneration in Drosophila by a ubiquitin-associated mechanism. *Mol Cell*, 18(1), 37-48. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.02.030>
- Weber, C., Muller, C., Podszuweit, A., Montino, C., Vollmer, J., & Forsbach, A. (2012). Toll-like receptor (TLR) 3 immune modulation by unformulated small interfering RNA or DNA and the role of CD14 (in TLR-mediated effects). *Immunology*, 136(1), 64-77. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2012.03559.x>
- Weber, J. J., Golla, M., Guaitoli, G., Wanichawan, P., Hayer, S. N., Hauser, S., Krah, A. C., Nagel, M., Samer, S., Aronica, E., Carlson, C. R., Schols, L., Riess, O., Gloeckner, C. J., Nguyen, H. P., & Hubener-Schmid, J. (2017). A combinatorial approach to identify calpain cleavage sites in the Machado-Joseph disease protein ataxin-3. *Brain*, 140(5), 1280-1299. <https://doi.org/10.1093/brain/awx039>

- Weber, J. J., Haas, E., Maringer, Y., Hauser, S., Casadei, N. L. P., Chishti, A. H., Riess, O., & Hubener-Schmid, J. (2020). Calpain-1 ablation partially rescues disease-associated hallmarks in models of Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet*, 29(6), 892-906. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddaa010>
- Weishaupl, D., Schneider, J., Peixoto Pinheiro, B., Ruess, C., Dold, S. M., von Zweyendorf, F., Gloeckner, C. J., Schmidt, J., Riess, O., & Schmidt, T. (2019). Physiological and pathophysiological characteristics of ataxin-3 isoforms. *J Biol Chem*, 294(2), 644-661. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005801>
- Wilder-Smith, E., Tan, E. K., Law, H. Y., Zhao, Y., Ng, I., & Wong, M. C. (2003). Spinocerebellar ataxia type 3 presenting as an L-DOPA responsive dystonia phenotype in a Chinese family. *J Neurol Sci*, 213(1-2), 25-28. [https://doi.org/10.1016/s0022-510x\(03\)00129-1](https://doi.org/10.1016/s0022-510x(03)00129-1)
- Wilkinson, K., & El Khoury, J. (2012). Microglial scavenger receptors and their roles in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis*, 2012, 489456. <https://doi.org/10.1155/2012/489456>
- Winborn, B. J., Travis, S. M., Todi, S. V., Scaglione, K. M., Xu, P., Williams, A. J., Cohen, R. E., Peng, J., & Paulson, H. L. (2008). The deubiquitinating enzyme ataxin-3, a polyglutamine disease protein, edits Lys63 linkages in mixed linkage ubiquitin chains. *J Biol Chem*, 283(39), 26436-26443. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803692200>
- Woods, B. T., & Schaumburg, H. H. (1972). Nigro-spino-dentatal degeneration with nuclear ophthalmoplegia. A unique and partially treatable clinico-pathological entity. *J Neurol Sci*, 17(2), 149-166. [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(72\)90137-2](https://doi.org/10.1016/0022-510x(72)90137-2)
- Wu, H., Lima, W. F., Zhang, H., Fan, A., Sun, H., & Crooke, S. T. (2004). Determination of the role of the human RNase H1 in the pharmacology of DNA-like antisense drugs. *J Biol Chem*, 279(17), 17181-17189. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311683200>
- Yang, J., Luo, S., Zhang, J., Yu, T., Fu, Z., Zheng, Y., Xu, X., Liu, C., Fan, M., & Zhang, Z. (2021). Exosome-mediated delivery of antisense oligonucleotides targeting alpha-synuclein ameliorates the pathology in a mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 148, 105218. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105218>
- Yu, Y. C., Kuo, C. L., Cheng, W. L., Liu, C. S., & Hsieh, M. (2009). Decreased antioxidant enzyme activity and increased mitochondrial DNA damage in cellular models of Machado-Joseph disease. *J Neurosci Res*, 87(8), 1884-1891. <https://doi.org/10.1002/jnr.22011>
- Zamecnik, P. C., & Stephenson, M. L. (1978). Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75(1), 280-284. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.1.280>
- Zhao, H. T., John, N., Delic, V., Ikeda-Lee, K., Kim, A., Weihofen, A., Swayze, E. E., Kordasiewicz, H. B., West, A. B., & Volpicelli-Daley, L. A. (2017). LRRK2 Antisense Oligonucleotides Ameliorate alpha-Synuclein Inclusion Formation in a Parkinson's Disease Mouse Model. *Mol Ther Nucleic Acids*, 8, 508-519. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.08.002>

# Anhang

Tabelle A Scoresheet für die postoperative Nachsorge in HG07-21G

| Beobachtung                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                          | Punktwertung      | Datum<br>----- |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|----------------|
| <b>Körpergewicht in g</b>                                                                                                                                   |                                                                                                                                                          |                   | g              |
| Keine Veränderung                                                                                                                                           |                                                                                                                                                          | 0                 |                |
| Änderung < 5%                                                                                                                                               |                                                                                                                                                          | 1                 |                |
| Gewichtsreduktion 5-10%                                                                                                                                     |                                                                                                                                                          | 5                 |                |
| Gewichtsreduktion 11-< 20%                                                                                                                                  |                                                                                                                                                          | 10                |                |
| Gewichtsreduktion ≥ 20%                                                                                                                                     |                                                                                                                                                          | 20                |                |
| <b>II Allgemeinzustand</b>                                                                                                                                  |                                                                                                                                                          |                   |                |
| Fell glatt, glänzend; Körperöffnungen sauber; Augen klar, glänzend                                                                                          |                                                                                                                                                          | 0                 |                |
| Felldefekte (verminderte oder übersteigerte Körperpflege)                                                                                                   |                                                                                                                                                          | 1                 |                |
| Fell stumpf, ungeordnet, ungepflegte Körperöffnungen, Augen trüb und/oder erhöhter Muskeltonus                                                              |                                                                                                                                                          | 5                 |                |
| Schmutziges Fell, verklebte oder feuchte Körperöffnungen, unnormale Haltung, Augen trüb und/oder hoher Muskeltonus                                          |                                                                                                                                                          | 10                |                |
| Krämpfe, Lähmungen (Rumpfmuskulatur, Extremitäten), Atemgeräusche oder Untertemperatur                                                                      |                                                                                                                                                          | 20                |                |
| <b>III Spontanverhalten</b>                                                                                                                                 |                                                                                                                                                          |                   |                |
| normales Verhalten (Schlafen, Reaktion auf Anblasen und Berührung, Neugier, Sozialkontakte)                                                                 |                                                                                                                                                          | 0                 |                |
| geringe Abweichungen vom Normalverhalten (einer oder mehrere der folgenden Aspekte: Schlafen, Reaktion auf Anblasen und Berührung, Neugier, Sozialkontakte) |                                                                                                                                                          | 1                 |                |
| eingeschränkte Motorik oder Hyperkinetik                                                                                                                    |                                                                                                                                                          | 5                 |                |
| Isolation, Lethargie; ausgeprägte Hyperkinetik bzw. Verhaltensstereotypen; augenscheinliche Koordinationsstörungen                                          |                                                                                                                                                          | 10                |                |
| Schmerzlaute beim Ergreifen, Automutilation (Autoaggression)                                                                                                |                                                                                                                                                          | 20                |                |
| <b>IV Wundheilungsstörungen</b>                                                                                                                             |                                                                                                                                                          |                   |                |
| Normal (keine Anzeichen einer Infektion, Naht intakt)                                                                                                       |                                                                                                                                                          | 0                 |                |
| Zeichen einer Infektion (Wunde sieht gerötet oder geschwollen aus, Austritt von Flüssigkeit, Eiter oder Blut)                                               |                                                                                                                                                          | 15                |                |
| <b>Bewertung, Maßnahmen</b>                                                                                                                                 |                                                                                                                                                          | <b>Punktsumme</b> |                |
| Belastungsgrad 0 = keine Belastung                                                                                                                          | Normal                                                                                                                                                   | 0                 |                |
| Belastungsgrad 1 = geringe Belastung                                                                                                                        | sorgfältig weiter beobachten (1x tägl.), evtl. unterstützende Maßnahmen (Nassfutter, Wärmezufuhr) und tierärztliche Versorgung (Analgesie, Antibiotikum) | 1-9               |                |
| Belastungsgrad 2 = mittelgradige Belastung                                                                                                                  | Tierärztliche Versorgung, wenn innerhalb von 12 Stunden trotz Medikation keine Besserung Eintritt: Euthanasie                                            | 10-19             |                |
| Humaner Endpunkt                                                                                                                                            | Sofortige Euthanasie                                                                                                                                     | 20                |                |

## Anhang

*Tabelle B Scoresheet für die postoperative Nachsorge in HG06-21G*

| Beobachtung                                                                                                                                                 |                                                                                                                         | Punktwertung      | Datum<br>----- |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|----------------|
| <b>Körpergewicht in g</b>                                                                                                                                   |                                                                                                                         |                   | g              |
| Keine Veränderung                                                                                                                                           |                                                                                                                         | 0                 |                |
| Änderung < 5%                                                                                                                                               |                                                                                                                         | 1                 |                |
| Gewichtsreduktion 5-10%                                                                                                                                     |                                                                                                                         | 5                 |                |
| Gewichtsreduktion >10-20%                                                                                                                                   |                                                                                                                         | 10                |                |
| <b>II Allgemeinzustand</b>                                                                                                                                  |                                                                                                                         |                   |                |
| Fell glatt, glänzend; Körperöffnungen sauber; Augen klar, glänzend                                                                                          |                                                                                                                         | 0                 |                |
| Felldefekte (verminderte oder übersteigerte Körperpflege)                                                                                                   |                                                                                                                         | 1                 |                |
| Fell stumpf, ungeordnet, ungepflegte Körperöffnungen, Augen trüb und/oder erhöhter Muskeltonus                                                              |                                                                                                                         | 5                 |                |
| Schmutziges Fell, verklebte oder feuchte Körperöffnungen, unnormale Haltung, Augen trüb und/oder hoher Muskeltonus                                          |                                                                                                                         | 10                |                |
| <b>III Spontanverhalten</b>                                                                                                                                 |                                                                                                                         |                   |                |
| normales Verhalten (Schlafen, Reaktion auf Anblasen und Berührung, Neugier, Sozialkontakte)                                                                 |                                                                                                                         | 0                 |                |
| geringe Abweichungen vom Normalverhalten (einer oder mehrere der folgenden Aspekte: Schlafen, Reaktion auf Anblasen und Berührung, Neugier, Sozialkontakte) |                                                                                                                         | 1                 |                |
| Augenscheinlich eingeschränkte Motorik oder Hyperkinetik                                                                                                    |                                                                                                                         | 5                 |                |
| Isolation, Lethargie; ausgeprägte Hyperkinetik bzw. Verhaltensstereotypen; augenscheinliche Koordinationsstörungen                                          |                                                                                                                         | 10                |                |
| <b>IV Wundheilungsstörungen</b>                                                                                                                             |                                                                                                                         |                   |                |
| Normal (keine Anzeichen einer Infektion, Naht intakt)                                                                                                       |                                                                                                                         | 0                 |                |
| Wunde sieht gerötet oder geschwollen aus                                                                                                                    |                                                                                                                         | 5                 |                |
| Zeichen einer Infektion (Austritt von Flüssigkeit, Eiter oder Blut)                                                                                         |                                                                                                                         | 10                |                |
| <b>Bewertung, Maßnahmen</b>                                                                                                                                 |                                                                                                                         | <b>Punktsomme</b> |                |
| Belastungsgrad 0 = keine Belastung                                                                                                                          | Normal                                                                                                                  | 0                 |                |
| Belastungsgrad 1 = geringe Belastung                                                                                                                        | sorgfältig weiter beobachten (1x tägl.), unterstützende Maßnahmen (Nassfutter, Wärmezufuhr) und ggf. tierärztlicher Rat | 1-4               |                |
| Belastungsgrad 2 = mittelgradige Belastung                                                                                                                  | tierärztliche Versorgung, wenn innerhalb von 12 Stunden trotz Medikation keine Besserung Eintritt: Euthanasie           | 5-9               |                |
| Belastungsgrad 3                                                                                                                                            | Sofortige Euthanasie                                                                                                    | 10                |                |

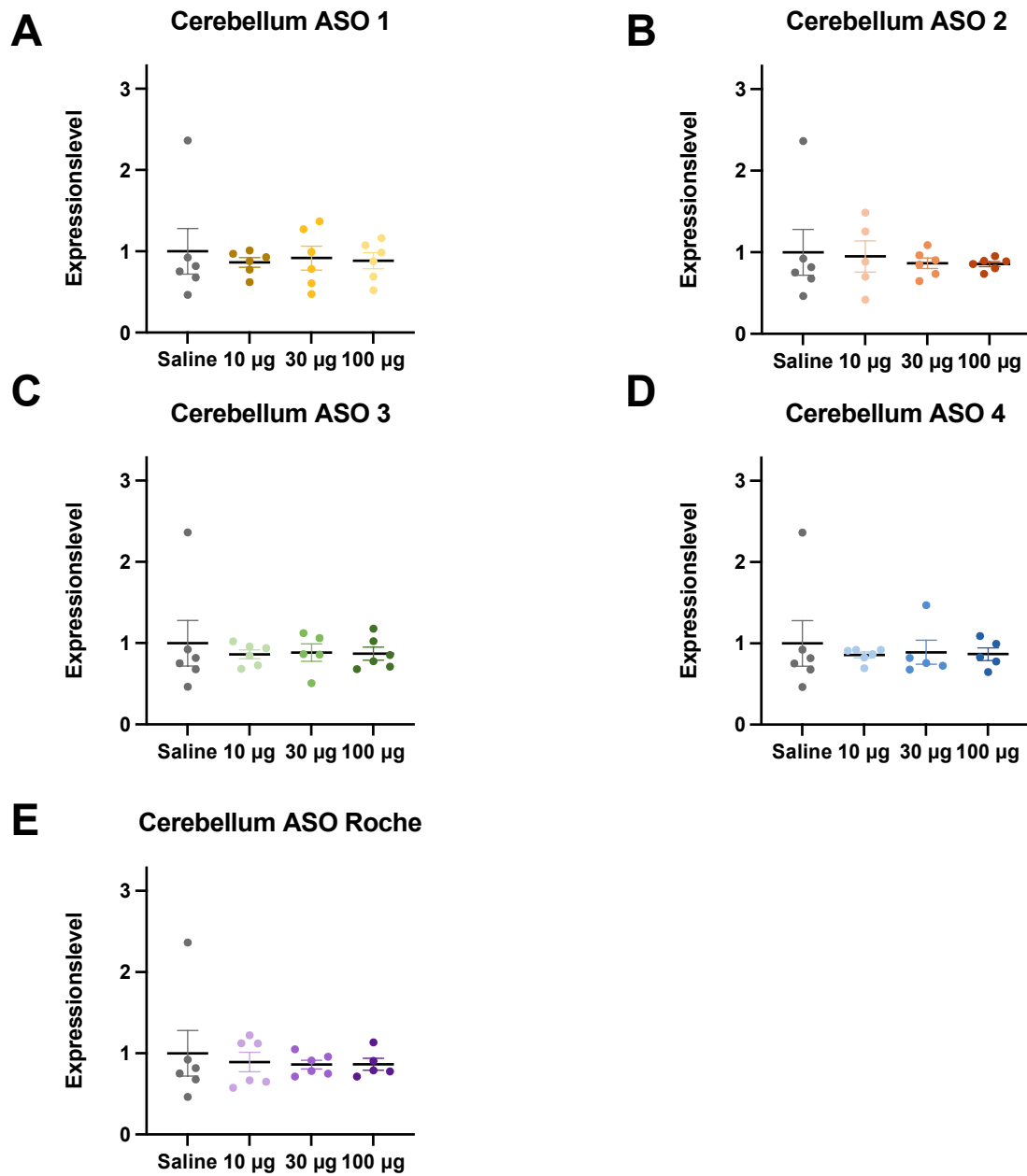


Abbildung A RNA-Expressionslevel im Cerebellum mit Ausreißerwerten.

In der Abbildung sieht man die Expressionswerte der RNA des Ataxin-3 im Cerebellum aufgeteilt nach Behandlungsgruppen vor Ausschluss der Ausreißerwerten. Die x-Achse stellt jeweils die applizierte ASO-Menge dar. Auf der y-Achse ist das Expressionslevel im Bezug zur Kontrollgruppe mit Saline abgebildet. In der Saline-Gruppe zeigte sich bereits graphisch ein stark abweichender Werte, welche sich in der statistischen Analyse als signifikanter Ausreißerwert bestätigte.

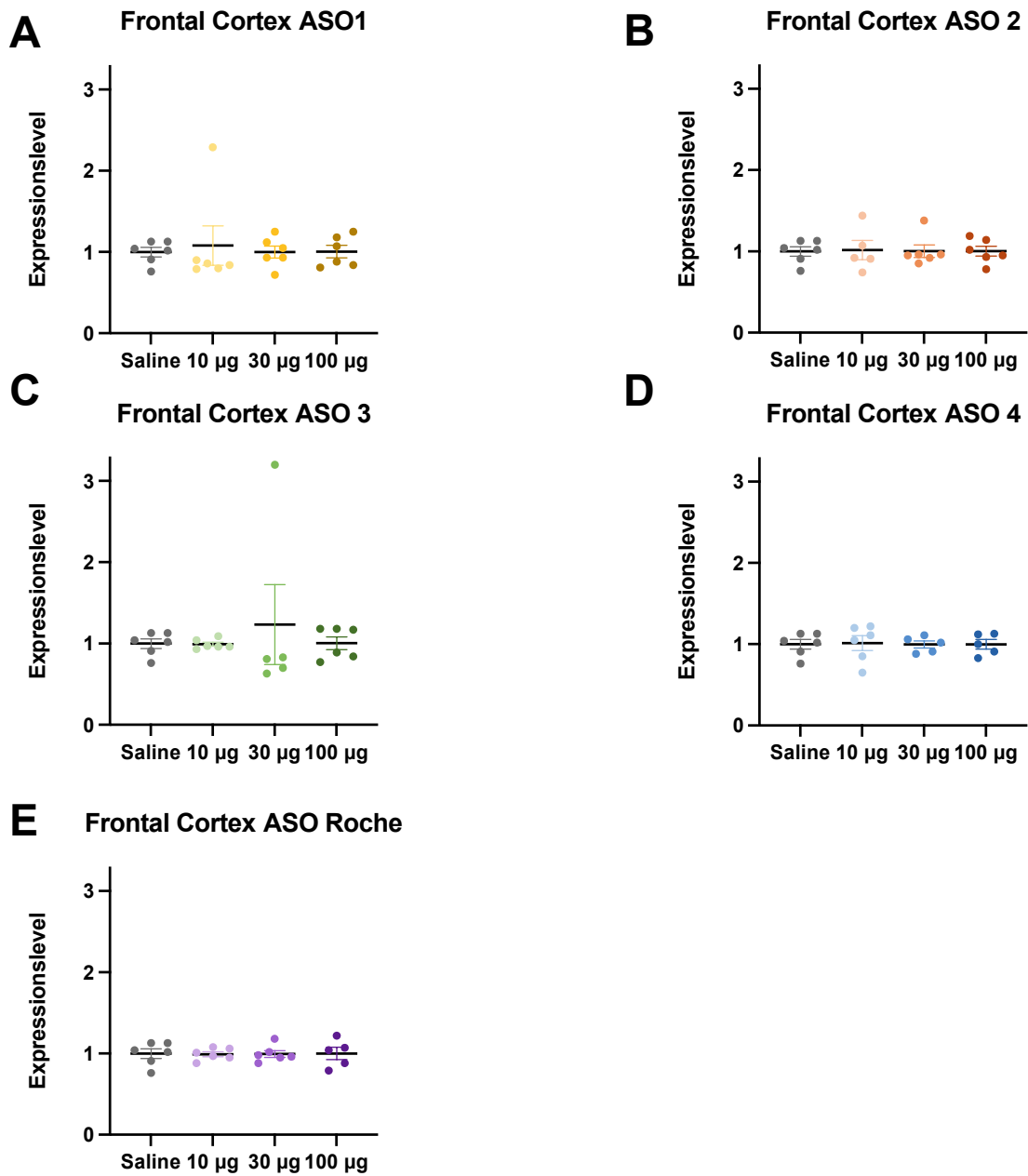


Abbildung B RNA-Expressionslevel im Frontalen Cortex mit Ausreißerwerte.

In der Abbildung sieht man die Expressionswerte der RNA des Ataxin-3 im Frontalen Cortex aufgeteilt nach Behandlungsgruppen vor Ausschluss der Ausreißerwerten. Die x-Achse stellt jeweils die applizierte ASO-Menge dar. Auf der y-Achse ist das Expressionslevel im Bezug zur Kontrollgruppe mit Saline abgebildet. In der 10 µg Gruppe der ASO 1 sowie der 30 µg der ASO3 zeigen sich bereits graphisch stark abweichende Werte, welche sich in der statistischen Analyse als signifikante Ausreißerwerte bestätigten.

## Erklärung zum Eigenanteil

Die Doktorarbeit erfolgte am Institut für medizinische Genetik und Genomik unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Olaf Rieß.

Das Konzept der ersten Studie wurde von meiner Betreuerin Frau PD Dr. Jeannette Hübener-Schmid in Zusammenarbeit mit einer Pharmafirma erstellt.

Die zweite Studie wurde von Herrn Dr. Stefan Hauser und Frau PD Dr. Jeannette Hübener-Schmid entwickelt.

Die Genotypisierungen und Fragmentlängenanalysen der Versuchstiere beider Studien wurden vollständig von mir durchgeführt. Ebenso habe ich die quantitative RT-PCR der RNA-Proben zur ersten Studie inklusive der Vorversuche vollständig absolviert.

Die Operationen der Versuchstiere habe ich für 40 Tiere unter Anleitung und Aufsicht meiner Betreuerin Frau Dr. Jeannette Hübener-Schmid erlernt und ausgeführt. Ebenso habe ich die Tiere über den Versuch hinweg wöchentlich gewogen sowie die Nachsorge nach den Operationen zusammen mit meiner Betreuerin vorgenommen. Auch die Präparationstechnik der Versuchstiere habe ich von ihr erlernt und so 45 Tiere selbst präpariert. Die Entnahme des Liquor cerebrospinalis habe ich erlernt.

Den *Beam-Walk*, der in der zweiten Studie durchgeführt und analysiert wurde, habe ich zusammen mit Herrn Jacob Helm (Doktorand DZNE) aufgenommen und ausgewertet. Ebenso haben wir die *Western Blot* Analysen gemeinsam vorgenommen.

Die statistische Auswertung und graphische Aufarbeitung meiner Ergebnisse habe ich selbstständig nach Anleitung meiner Betreuerin unternommen.

Ich habe dieses Manuskript selbstständig verfasst und versichere, keine anderen, als die hier aufgeführten Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 24.06.2024

## Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei allen Personen bedanken, die mich bei meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Mein aufrichtiger Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Olaf Rieß für die freundliche Betreuung dieser Arbeit. Die Möglichkeit, meine Promotion an seinem Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik durchzuführen, hat mir wertvolle Einblicke in die Grundlagenforschung und Laborarbeit bereitet.

Danken möchte ich auch meiner 2. Berichterstatterin Frau Prof. Dr. Ellen Reisinger für das Gutachten zu dieser Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin PD Dr. Jeannette Hübener-Schmid, die mich unermüdlich motiviert und alle meine Fragen mit viel Geduld beantwortet hat. Eine solche zuverlässige Betreuung ist nicht selbstverständlich. Die enge Zusammenarbeit während der ASO-Studien war sehr wertvoll für mich. Ihre immer ehrlichen und gleichzeitig aufbauenden Worte haben mich zum Abschluss dieser Arbeit gebracht.

Ich danke Frau Dr. Kathrin Gonsior herzlich für die Empfehlung der Betreuung und die Begeisterung für die SCA3.

Ich danke Herrn Dr. Stefan Hauser und Jacob Helm für die freundliche Zusammenarbeit an der Studie zu den allel-spezifischen Studien, zur Bereitstellung der verwendeten ASOs sowie für die gemeinsame Auswertung des *Western Blots*. Ebenso möchte ich mich bei Sven Poths und Team für die Extraktion der RNA bedanken.

Außerdem gilt mein Dank der Arbeitsgruppe Biomarker und allen im Labor in der Nägelestraße für die freundliche und hilfsbereite Atmosphäre.

An der Stelle möchte ich mich auch bei Constanze Frank für den sowohl fachlichen als auch freundschaftlichen Austausch bedanken. Dieser hat mich durch die Höhen und Tiefen bis zum Abschluss dieser Arbeit begleitet, vielen Dank dafür.

Meiner Familie und meinen FreundInnen danke ich von Herzen für die fortlaufende Motivation während der Durchführung der Promotion sowie während des Schreibprozesses. Im Besonderen möchte mich bei meinen Eltern Yvonne Krüger-Goertz und Michael Krüger, meiner Schwester Rebecca Krüger und Marco Schäfer für das aufmerksame Lesen, die Unterstützung und die motivierenden Worte danken. Ich danke meinen Großeltern, dass sie immer an mich geglaubt haben und glauben.