

Aus dem Department für Diagnostische Labormedizin der
Universität Tübingen

Institut für Medizinische Genetik und angewandte Genomik

**Ataxin-3 als potenzieller Biomarker in der
neurodegenerativen Erkrankung der Spinozerebellären
Ataxie Typ 3**

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

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

vorgelegt von

Kaucher, Gabriele Anna

2020

Dekan:	Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter:	Universitätsprofessor Dr. Olaf Rieß
2. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. R. Schüle-Freyer
Tag der Disputation:	14.01.2020

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	
Tabellenverzeichnis.....	
Abkürzungsverzeichnis.....	
1 Einleitung	1
1.1 Polyglutamin-Erkrankungen und Pathomechanismen	2
1.2 Spinocerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3)	5
1.3 Ataxin-3 Protein	8
1.4 Biomarker und relevante klinische Scores	11
1.5 TR-FRET in der Proteinbestimmung	14
1.6 Polymorphismen als modulierende Faktoren	18
1.7 <i>European Spinocerebellar Ataxia Type 3/ Machado-Joseph Disease Initiative (ESMI-Projekt)</i>	20
1.8 Zielsetzung der Arbeit	21
2 Material und Methoden	23
2.1 Verwendete Geräte, Software und Verbrauchsmittel	23
2.2 Puffer und Lösungen	25
2.3 Chemikalien, Enzyme und Oligonukleotide (Primer)	25
2.4 Antikörper	26
2.5 Hersteller Kits	26
2.6 Herkunft der Blutproben und Patientenauswahl in ESMI.....	27
2.7 Molekularbiologische Methoden.....	27
2.7.1 DNA Isolation	27
2.7.2 PCR zur Analyse von bekannten Polymorphismen	28
2.7.3 Gelelektrophorese	29
2.7.4 PCR Aufreinigung	29
2.7.5 Sequenzierung	30
2.7.6 Einheitliche Bestimmung der <i>CAG-Repeat</i> -Längen mittels PCR und Fragment-Längenanalyse	31
2.8 Zellbiologische Methoden	33
2.8.1 Blutabnahme	33
2.8.2 Extraktion der PBMCs aus Blutproben.....	33
2.8.3 Lyse der PBMCs und Proteingewinnung.....	34
2.8.4 Transfektion von HEK-Zellen zur Gewinnung von Ataxin-3	34
2.9 Proteinbiochemische Methoden	36
2.9.1 Gesamtproteinbestimmung mittels Bradford-Test	36
2.9.2 Gesamtproteinbestimmung mittels BCA-Test	36
2.9.3 Vorverdünnung und Lagerung der Proteine	37
2.10 Förster-Resonanz-Energietransfer (TR-FRET)	37
2.10.1 TR-FRET in der Ataxin-3 Messung.....	37
2.10.2 Kalkulation der gemessenen Signalwerte.....	38
2.10.3 Statistische Auswertung und graphische Darstellung der Daten.....	39

3	Ergebnisse	40
3.1	Verfahren der Datenerhebung und Fragestellungen	40
3.2	Teil A: Etablierung der TR-FRET Messung für expandiertes Ataxin-3	42
3.2.1	Etablierung des Antikörpers 1C2-D2 als Messparameter für Polyglutamin- expandiertes Ataxin-3 Protein	42
3.2.2	Überprüfung der Reproduzierbarkeit des TR-FRET Assays	45
3.2.3	Detektionsbereich des Assays für verschiedene Konzentrationen des überexprimiertem EGFP Ataxin-3	48
3.2.4	Detektionsbereich des Assays für verschiedene Konzentrationen von endogenem Ataxin-3 aus iPSC-Homogenaten	51
3.2.5	Messung von expandiertem Ataxin-3 Protein in verschiedenen humanen Biomaterialien	55
3.2.6	Vergleich der Methoden zur Gesamtproteinbestimmung	59
3.2.7	Zusammenfassung Ergebnisse Teil A (Etablierung und Validierung)	61
3.3	Teil B: Ergebnisse der expandierten Ataxin-3 Messung in PBMCs	62
3.3.1	Übersicht der analysierten ESMI-Kohorte für PBMCs	62
3.3.2	Korrelation expandiertes Ataxin-3 mit Alter, Geschlecht, AAO, DD	64
3.3.3	Korrelation expandierte Ataxin-3 Protein-Level mit klinischen <i>Scores</i>	69
3.3.4	Korrelation exp. Ataxin-3 mit der expandierten CAG-Länge und der Zeit zwischen Nahrungsaufnahme und Blutabnahme	72
3.3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse Teil B (Ataxin-3 Messungen)	74
3.4	Teil C: Ergebnisse der Analyse der CAG-Repeat-Längen und Polymorphismen	76
3.4.1	Übersicht der Kohorte für CAG-Repeat Längenbestimmung	76
3.4.2	Übersicht der Kohorte für die Polymorphismen Bestimmung	76
3.4.3	Korrelationen CAG-Repeat-Länge und Patienten-Daten	78
3.4.4	Korrelation Haplotypen und Patienten-Daten	79
3.4.5	Korrelation Haplotypen und exp. Ataxin-3 Messwerte	83
3.4.6	Zusammenfassung der Ergebnisse Teil C (CAG und SNP Analyse)	86
4	Diskussion	88
4.1	Etablierung und Validierung des TR-FRET Assays für den expandierten Ataxin-3 Protein Nachweis	88
4.2	Zusammenhänge der klinischen Daten analysierter SCA3 Patienten und der gemessenen Ataxin-3 Protein-Level	96
4.3	Fazit: Ataxin-3 Protein als potenzieller Biomarker?	103
5	Zusammenfassung	104
6	Literaturverzeichnis	107
7	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertation	117
8	Danksagung	118
9	Anlagen im Anhang	120

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht der Verteilung der häufigsten Subtypen der erblichen Ataxien modifiziert nach Bird 1993	1
Abbildung 2: Mikroskopische Darstellungen von Ataxin-3 Aggregaten	3
Abbildung 3: Eine schematische Darstellung der Verkettungen möglicher Pathomechanismen, modifiziert nach Evers et al., 2014	5
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Ataxin-3 Proteins und seine Verteilung. 10	
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Energie-Transfers beim Binden der Antikörper (AK).....	14
Abbildung 6: Schema des Energie-Transfers bei der Reaktion zwischen Donor und Akzeptor, modifiziert nach Cui et al., 2014	15
Abbildung 7: Schema des FRET am Proteinmolekül Ataxin-3, modifiziert nach Nguyen et al., 2013	16
Abbildung 8: Formel zur Berechnung der Signal-Stärke ΔF	17
Abbildung 9: Graphische Darstellung der Lokalisation der zu analysierenden Polymorphismen, modifiziert nach Martins et al., 2007.....	20
Abbildung 10: Programmeinstellung LFR-b für die Sequenzierung	31
Abbildung 11: Exemplarische Darstellung einer Analyse der CAG-Repeat Längenbestimmung	32
Abbildung 12: Kontrolle der HEK-Zellen 24 h nach Transfektion des EGFP Ataxin-3 unter dem Fluoreszenz-Mikroskop.....	35
Abbildung 13: Übersicht des Workflows der Verfahren, geordnet nach der Zielführung zum jeweiligen erhobenen Parameter	40
Abbildung 14: Testung verschiedener Antikörper-Mix Kombinationen.....	43
Abbildung 15: Vergleich der Messungen mittels MW1-D2 und 1C2-D2 in PBMCs.....	44
Abbildung 16: Intra-Platten-Vergleiche.....	46
Abbildung 17: Schematische farbliche Darstellung der Messwerte auf einer Platte, pipettiert bei RT (hier nur Antikörper MW1-D2).....	47
Abbildung 18: Schematische farbliche Darstellung der Messwerte auf einer Platte, pipettiert bei 4 °C (hier nur EGFP Ataxin-3 1:16).....	47
Abbildung 19: Inter-Platten-Vergleich	48
Abbildung 20: Verdünnungsreihe mit EGFP Ataxin-3	49
Abbildung 21: linearer Bereich der Verdünnungsreihe mit EGFP Ataxin-3.....	50
Abbildung 22: Versuche mit EGFP Ataxin-3 bei Inkubation der Platte bei Raumtemperatur	51
Abbildung 23: Verdünnungsreihe mit endogenen Ataxin-3	52
Abbildung 24: Etablierungsversuche mit endogenem Ataxin-3 für MW1-D2.....	54
Abbildung 25: Etablierungsversuche mit endogenem Ataxin-3 für 1C2-D2.....	55
Abbildung 26: Nachweis von exp. Ataxin-3 in diversen menschlichen Biomaterialien 57	
Abbildung 27: Exemplarische Darstellung eines Nachweisversuchs von Ataxin-3 in Plasma-Proben im Zeitverlauf (Ansatz mit Tween20 und Protease-Inhibitoren)	58
Abbildung 28: Versuch der Herstellung einer Kalibrations-Matrix für einen CSF-Assay	59
Abbildung 29: Verteilung der analysierten ESMI-Kohorte nach Alter, Geschlecht und Scores	63

Abbildung 30: Ataxin-3 Level in Korrelation zu Alter und Geschlecht aller analysierten Patienten-PBMCs	65
Abbildung 31: Vergleich der Ataxin-3 Level zwischen den verschiedenen Genotypen und Zentren	66
Abbildung 32: Ataxin-3 Level in Korrelation zu Erkrankungsbeginn und Erkrankungsdauer	68
Abbildung 33: Untersuchung linearer Zusammenhänge zwischen Ataxin-3 Protein-Level und Erkrankungsbeginn und Erkrankungsdauer	69
Abbildung 34: Korrelation zwischen SARA-Score und expandiertem Ataxin-3 Level .	70
Abbildung 35: Korrelation zwischen INAS-Score und expandiertem Ataxin-3 Level...	71
Abbildung 36: Korrelation zwischen dem Cross sectional disease progression (CSDP) Score und exp. Ataxin-3 Level	72
Abbildung 37: Korrelation zwischen der CAG-Repeat-Länge und den exp. Ataxin-3 Leveln	73
Abbildung 38: Untersuchung der Abhängigkeit der Messwerte von der Nüchtern-Zeit vor der Blutabnahme	74
Abbildung 39: Exemplarische Darstellung eines Agarose-Gels zur Post-PCR-Kontrolle	77
Abbildung 40: Korrelation zwischen CAG-Repeat-Länge und Patienten-Daten	78
Abbildung 41: Vergleich der Haplotypen im PARK2 Gen mit den klinischen Patienten-Daten	80
Abbildung 42: Vergleich des SNP A ⁶⁶⁹ /G ⁶⁶⁹ im ATXN3 Gen mit den klinischen Patienten-Daten	81
Abbildung 43: Vergleich der SNPs G ⁹⁸⁷ /C ⁹⁸⁷ und C ¹¹¹⁸ /A ¹¹¹⁸ im ATXN3 Gen mit den klinischen Daten.....	82
Abbildung 44: Korrelation der Polymorphismen im PARK2 Gen mit den exp. Ataxin-3 Protein-Leveln	84
Abbildung 45: Korrelation von SNP Kombinationen im PARK2 Gen mit den exp. Ataxin-3 Protein-Leveln.....	85
Abbildung 46: Korrelation des SNP A ⁶⁶⁹ /G ⁶⁶⁹ im ATXN3 Gen mit den exp. Ataxin-3 Protein-Leveln	85
Abbildung 47: Korrelation der SNPs G ⁹⁸⁷ /C ⁹⁸⁷ und C ¹¹¹⁸ /A ¹¹¹⁸ im ATXN3 Gen mit den exp. Ataxin-3 Protein-Leveln	86
Abbildung 48: Darstellung des HOOK-Effekts, modifiziert nach Schiettecatte, 2012..	91
Abbildung 49: Hypothese zum Zusammenhang von klinischen Parametern und Ataxin-3 Protein-Level.....	98
Abbildung 50: Hypothese zum Zusammenhang zwischen Erkrankungsschwere und Ataxin-3 Protein-Level.....	100

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der CAG-Repeat-Erkrankungen, modifiziert nach Adegbuyiro et al., 2017, Jones et al., 2017	2
Tabelle 2: Übersicht einer Auswahl potentieller „state biomarker“, modifiziert nach Lima und Raposo, 2018	13
Tabelle 3: Übersicht der gängigen klinischen Scores, modifiziert nach Saute and Jardim, 2018	13
Tabelle 4: Übersicht der zu analysierenden Polymorphismen	19
Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Geräte und Laborutensilien	23
Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Software	24
Tabelle 7: Übersicht der Verbrauchsmittel	24
Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Puffer und Lösungen	25
Tabelle 9: Übersicht der Verwendete Reagenzien	25
Tabelle 10: Übersicht der verwendeten Primer von Metabion (10 pmol je PCR)	26
Tabelle 11: Übersicht der Antikörper und der zugehörigen Proteine für TR-FRET Analysen	26
Tabelle 12: Übersicht der genutzten Hersteller-Kits	26
Tabelle 13: Übersicht Basis der Mastermixe	28
Tabelle 14: Übersicht der PCR-Zyklen und Temperaturen	29
Tabelle 15: Übersicht der Sequenzier-PCR-Ansätze	31
Tabelle 16: A) Cycler-Programm für Sequenzierung-PCR B) Ansatz Stopp-Mix.....	31
Tabelle 17: A) Basis für Mastermix B) Cycler-Programm	32
Tabelle 18: Vergleich zweier Methoden zur Gesamtproteinbestimmung	60
Tabelle 19: Zusammenfassung der Ergebnisse Teil A.....	61
Tabelle 20: Übersicht der Kohorte für die Ataxin-3 Bestimmung in PBMCs	62
Tabelle 21: Zusammenfassung der Ergebnisse Teil B.....	75
Tabelle 22: Übersicht der Kohorte für die Analyse der CAG-Repeat-Längen	76
Tabelle 23: Übersicht der Kohorte zur Bestimmung von SNPs	77
Tabelle 24: Anzahlen der analysierten Probanden bezüglich bestimmter SNPs	77
Tabelle 25: Zusammenfassung der Ergebnisse Teil C.....	87
Tabelle 26: Auswahl momentan erforschter Biomarker in neurodegenerativen Erkrankungen	95
Tabelle 27: Bewertung des aktuellen Standes des TR-FRET Assays für die Ataxin-3 Detektion	96

Abkürzungsverzeichnis

AAO	<i>Age at Onset</i> , Erkrankungsbeginn
ADCA	autosomal dominante zerebellare Ataxie
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
ASO	Antisense-Oligonukleotide
AVED	Ataxie mit Vitamin E Defizit
BCA	<i>Bicinchroinic Acid</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
bp	Basenpaare
CCSF	<i>Composite Cerebellar Functional Score</i>
CHIP	<i>C-terminus of HSC70-Interacting Protein</i>
CSDP	<i>Cross-sectional disease progression</i>
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
CPT	<i>Cell Preparation Tube</i>
Da	Dalton (atomare Masseneinheit)
DD	<i>Disease Duration</i> , Erkrankungsdauer
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagel's Medium</i> ®
DMSO	Dimethylsulfoxid, organisches Lösungsmittel
DNA	<i>Desoxy-Ribnuclein-Acid</i>
dNTPs	Desoxy-Nukleotidtriphosphate
DNS	Desoxy-Ribonukelin-Säure
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> ®
DRPLA	Dentatorubro-Pallidoluysische Atrophie
DUB	Deubiquitinierendes Enzym
E.coli	Escherichia coli Bakterium
EDTA	Ethylen-diamin-tetra-Essigsäure
EFNS/ENS	<i>European Federation of Neurological Societies/ European Neurological Society</i>
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Proteine</i> , überexprimiertes grün fluoreszierendes Protein
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
exp.	expandiert (hier: Polyglutamin-expandiert)
FCS	Fetales Kalb Serum
GSH-Px	Glutathionperoxidase
HD	<i>Huntington Disease</i> (Chorea Huntington)
HEK	<i>Human Embryonic Kidney (Cells)</i>

ICARS	<i>International Cooperative Ataxia Rating Scale</i>
INAS	<i>Inventory of Non-Ataxia Signs</i>
JPND	<i>Joint Programme - Neurodegenerative Disease Research</i>
kDa	kilo Dalton (atomare Masseneinheit)
LB-Medium	<i>Lysogeny broth</i> -Medium zur Anzucht von E.coli
MJD	<i>Machado-Joseph-Disease</i>
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
MS	Multiple Sklerose
mt	<i>mutant</i> (hier: Polyglutamin-expandiert)
MTA	Medizinisch-technische/r Assistent/in
NES	<i>Nuclear-Export-Signal</i>
NESSCA	<i>Neurological Examination Score for Spinocerebellar Ataxia</i>
NFL	Neurofilament
NLS	<i>Nuclear-Localisation-Signal</i>
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PolyQ	Polyglutamin, Polyglutamin-Erkrankungen
ppm	<i>parts per million</i>
PPT	<i>Plasma Preparation Tube</i>
PROMs	<i>patient-reported outcome measurements</i>
PTM	Post-Translationale Modifikationen
Q	Aminosäure Glutamin
rcf	<i>relative centrifugal force</i>
RNA	Ribonuklein-Säure
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RPMI	Zellkulturmedium
RT	Raumtemperatur 21 °C
RLS	<i>Restless-Leg-Syndrome</i>
SARA	<i>Scale of the Assessment and Rating of Ataxia</i>
SBMA	Spinobulbäre Muskelatrophie Typ Kennedy
SCA3	Spinozerebelläre Ataxie Typ 3
SCAFI	<i>SCA Functional Index</i>
SEQ	Sequenzierung
SLS	<i>Sample Loading Solution</i>
SMC	<i>Single-molecule counting</i>
SNP	<i>Single Nucleotid-Polymorphism</i>
SOD	Super-Oxid-Dismutase
SST	<i>Serum Separator Tube</i>
TAE	TRIS-Acetat-EDTA

Taq	Taq-Polymerase
tb	Terbiumkryptat
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TR-FRET	<i>Time-resolved fluorescence resonance energy transfer</i>
UIM	Ubiquitin-Interaktions-Motiv
UK	<i>United Kingdom</i>
US	<i>United States</i>
UV	Ultraviolett
VCP	<i>Valosin-containing Protein</i>
WT	Wildtyp

1 Einleitung

Die neurodegenerative Erkrankung Spinozerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3) ist auch unter der Bezeichnung Machado-Joseph-Erkrankung (MJD) geläufig und gehört zu den autosomal dominanten zerebellaren Ataxien (ADCA). Dabei stellt sie weltweit (vgl. *Abbildung 1*) eine der häufigsten Erkrankungen dieses Formenkreises, von welchem mittlerweile über 40 Subtypen bekannt sind, dar (Bird, 1993, Paulson, 2007, Rieß und Schöls, 1996, Whaley et al., 2011).

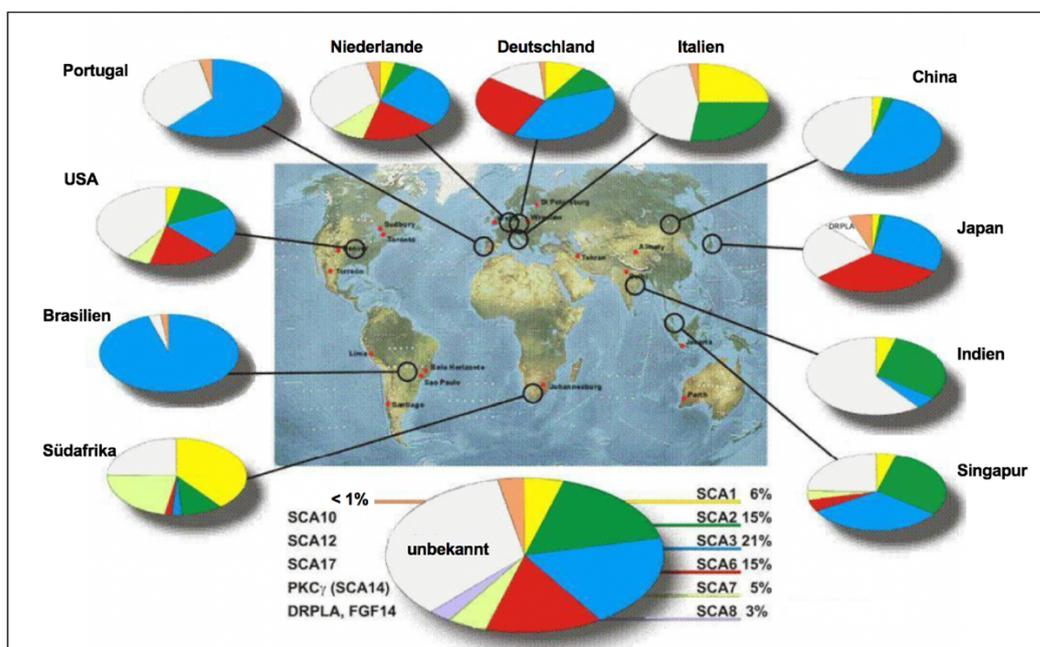


Abbildung 1: Übersicht der Verteilung der häufigsten Subtypen der erblichen Ataxien modifiziert nach Bird 1993

Die Spinozerebelläre Ataxie Typ 3 (blau) ist prozentual die häufigste Erkrankungsform aus dem Kreis der erblich bedingten Ataxien und zeigt in den europäischen Ländern Portugal, Deutschland und Niederlande, aber auch Brasilien, sowie im asiatischen Raum mit China, Japan und Singapur die häufigste Verteilung. Die bemerkenswerte Verbreitung der SCA3 besonders im Bezug zu Portugal und seiner ehemaligen Kolonie Brasilien demonstriert die Bedeutung der ethnischen Zugehörigkeiten und Verbreitungen im geschichtlichen Verlauf.

Die Krankheitsbezeichnung *Machado Joseph disease* ist betitelt nach den beiden ersten, von den portugiesischen Azoren stammenden, Familien Machado und Joseph, bei welchen in den 1970iger Jahren die Symptome erstmals beschrieben wurden (Nakano et al., 1972, Rosenberg et al., 1976, Woods und Schaumburg, 1972).

1.1 Polyglutamin-Erkrankungen und Pathomechanismen

Das Feld der Polyglutamin-Erkrankungen, beziehungsweise *CAG-Repeat*-Erkrankungen, erstreckt sich neben den Spinozerebellären Ataxien Typ 1, 2, 3, 6, 7 und 17 auf weitere neurodegenerative Erkrankungen, wie beispielsweise Chorea Huntington (HD), die Spinobulbäre Muskelatrophie Typ Kennedy (SBMA), oder die Dentatorubro-Pallidoluyische Atrophie (DRPLA).

Sie alle vereint, dass betroffene Patienten unter beeinträchtigenden neurologischen Symptomen mit verkürzter Lebenserwartung leiden und kausale, heiltherapeutische Maßnahmen zum jetzigen Zeitpunkt nicht existent sind (Jones et al., 2017). Allen Erkrankungsformen liegen vergleichbare Pathomechanismen zugrunde, doch die betroffenen Gene und daraus resultierenden Proteine, sowie die pathologische Polyglutamin-Länge unterscheiden sich (Adegbuyiro et al., 2017), (vgl. *Tabelle 1*). Durch diese Unterschiede zwischen den pathologisch veränderten Proteinen in Größe, intrazellulärer Lokalisation und biologischer Funktion ist die jeweilige Pathogenese der verschiedenen Erkrankungen im Detail einzigartig und resultiert in krankheitsspezifisch abweichenden Symptomen (Costa und Paulson, 2012).

Tabelle 1: Auflistung der CAG-Repeat-Erkrankungen, modifiziert nach Adegbuyiro et al., 2017, Jones et al., 2017

Erkrankung	Synonym	Prävalenz	Erbgang	Gen	Protein	Polyglutamin-Anzahl (pathologisch)**
HD	Veitstanz	~1/10.000*	Autosomal dominant	<i>HTT</i>	Huntingtin	36 - 100
HD-like 2			Autosomal dominant	<i>JPH3</i>		41 - 59
SBMA	Kennedy Erkrankung	~1/10.000	X-chromosomal	<i>AR</i>	Androgen Rezeptor	38 - 65
DRPLA	Haw River Syndrom		Autosomal dominant	<i>ATN1</i>	Atrophen-1	49 - 88
SCA1			Autosomal dominant	<i>ATXN1</i>	Ataxin-1	39 - 88
SCA2			Autosomal dominant	<i>ATXN2</i>	Ataxin-2	33 - 77
SCA3	Machado-Joseph-Erkrankung	~1/100.000*	Autosomal dominant	<i>ATXN3</i>	Ataxin-3	55 - 86
SCA6			Autosomal dominant	<i>CACNA1A</i>	CACNA1A	21 - 33
SCA7			Autosomal dominant	<i>ATXN7</i>	Ataxin-7	38 - 120
SCA12			Autosomal dominant	<i>ATXN12</i>	PPP2R2B	66 - 78
SCA17			Autosomal dominant	<i>TBP</i>	TATA-Box bindendes Protein	47 - 63

*variiert zwischen verschiedenen geographischen Regionen

**variiert je nach Literatur

HD: *huntingtin disease*, SBMA: Spinobulbäre Muskelatrophie Typ Kennedy, DRPLA: Dentatorubro-Pallidoluyische Atrophie, SCA: Spinozerebelläre Ataxie

Dennoch ist es für das generelle Verständnis der Polyglutamin-Erkrankungen, welche eine sehr seltene Erkrankungsgruppe abbilden, unerlässlich,

Rückschlüsse aus Forschungen an einer Erkrankungsform auf eine andere zu projizieren und dort erneut zu erproben.

Ein vereinendes Merkmal der Pathologie der Polyglutamin-Erkrankungen liegt in der Eigenschaft der jeweils fehlgebildeten Proteine, sich zu Aggregaten zu formieren (vgl. *Abbildung 2*). Dabei können verschiedene Aggregat-Spezies, wie fibrilläre oder ringförmige Aggregate, Oligomere verschiedener Größen, sowie amorphe Aggregate, je nach Konformation, auftreten (Adegbuyiro et al., 2017).

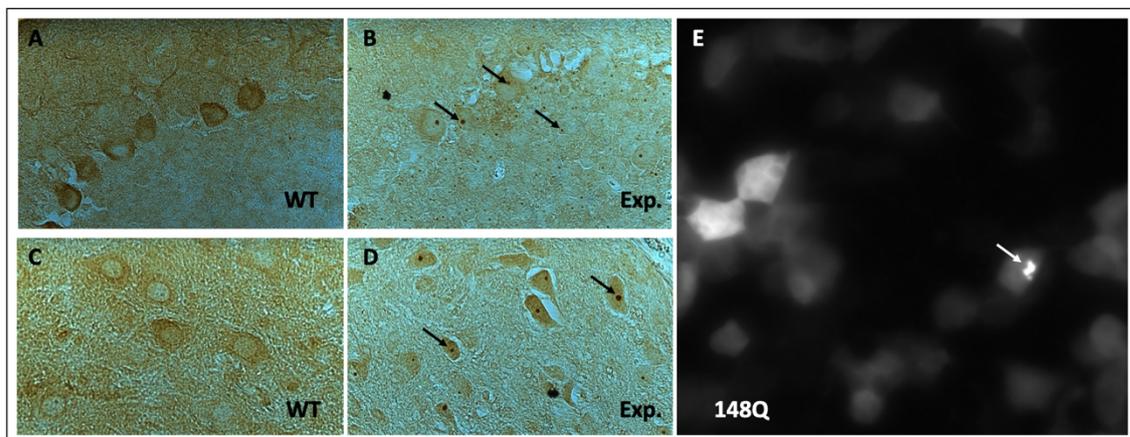


Abbildung 2: Mikroskopische Darstellungen von Ataxin-3 Aggregaten

A-D) Schnitte des Cerebellums und der Pons von Mäusen mit Ataxin-3 detektierendem Antikörper Färbung (braun), 100x Vergrößerung A) Purkinje-Zellen des Cerebellums einer gesunden Maus ohne erkennbare Aggregate, Purkinje-Zellschicht weitgehend intakt. B) Degenerierte Purkinje-Zellen und Stratum granulosum einer betroffenen Maus mit deutlichen Aggregaten in den Zellkernen (Pfeile). C) Motoneuronen der Pons der gesunden Maus ohne Aggregate. D) Motoneuronen der Pons der erkrankten Maus mit deutlichen Aggregaten. E) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von HEK-Zellen, transfiziert mit EGFP-Ataxin-3 mit expandiertem Ataxin-3 mit 148Q transfizierter HEK-Zellen (24 h), 40x Vergrößerung: 3 Zellen der Aufnahme zeigen eine Expression von Ataxin-3 nach erfolgreicher Transfektion, die Pfeil-markierte Zelle weist bereits ein Aggregat auf.

WT: Wildtyp, Exp.: expandierter Polyglutamin-Trakt, 148Q: 148 Glutamine. (Quelle: Mikroskopie mit Schnitten von Frau Dr. rer. nat. J. Hübener-Schmid)

Sie sind abhängig von deren Polyglutamin-Länge und Konzentration in einander überführbar und ergeben letztendlich die, der Polyglutamin-Erkrankung charakteristischen, intranukleären oder zytoplasmatischen Einschlüsse (Legleiter et al., 2010). Die genaue Bedeutung fehlgefalteter Proteine und Aggregate, welche, abgesehen von der Polyglutamin-Form, auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Parkinson oder der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) beteiligt sind, ist noch nicht entschlüsselt; ebenso wird über mögliche protektive Aggregatformen diskutiert (Miller et al.,

2011, Taylor et al., 2003). So konnte bisher noch kein Nachweis erbracht werden, dass durch Verhinderung der Aggregation die Krankheit im Mensch eliminiert werden könnte, auch wenn bei der Alzheimer-Erkrankung (keine Polyglutamin-Erkrankung) mit Amyloid- β bindenden Antikörpern (Aducanumab) neben der Reduzierung der Ablagerungen eine klinische Verbesserung bei Patienten im Frühstadium erreicht werden konnte (Harrison und Owen, 2016, Sevigny et al., 2016).

Ein weiterer Aspekt der Polyglutamin-Aggregate ist, sich über Prion-ähnliche Mechanismen zwischen Zellen zu verbreiten, wobei die genauen Prozesse der Endo- und Exozytose dieser Proteine noch nicht ausreichend bekannt sind, um die lokale Verteilung von Aggregaten in neuronalen Netzwerken zu erklären (Holmes und Diamond, 2012). Posttranslationale Modifikationen (PTM), wie Phosphorylierung oder Acetylierungen, konnten in Studien mit HD-Zellmodellen positiven Einfluss auf autophagozytär-lysosomale Prozesse nehmen und folglich toxische Akkumulationen reduzieren (Warby et al., 2009, Jeong et al., 2009). Nicht zuletzt durch die Interaktionsfähigkeit der Polyglutamin-reichen Aggregate mit Lipidmembranen ergeben sich weitere, simultane oder konsensuelle zytotoxische Veränderungen wie mitochondriale Dysfunktionen, gestörter axonaler Vesikeltransport, Inhibitionen vom Proteasom, sowie Sequestration von Proteinen bis hin zur transkriptionalen Dysregulation und DNA-Schädigungen (Adegbuyiro et al., 2017), (vgl. *Abbildung 3*). Auf molekulargenetischer Ebene kommt den körpereigenen DNA-Reparatur-Mechanismen bei Polyglutamin-Erkrankungen eine tragende Bedeutung zu, besonders in Hinsicht auf das Verständnis der Pathomechanismen und möglicher Interventionsmöglichkeiten. Polyglutamin tragende Proteine können an nukleäre DNA-Reparatur-Enzyme wie das *Valosin-containing Protein* (VCP) binden und inhibieren, was weitere DNA-Schädigungen induzieren könnte und bezüglich der Pathogenität einen *Circulus vitiosus* darstellen würde (Fujita et al., 2013). In ausdifferenzierten Zellen ohne weitere Teilung, wie es bei Neuronen der Fall ist, stehen zusätzlich Umwelt-Stressoren im Verdacht, durch DNA-Schäden und nachfolgende fehlerhafte Reparaturen eine *Repeat-Expansion* zu bedingen (Chatterjee et al., 2015).

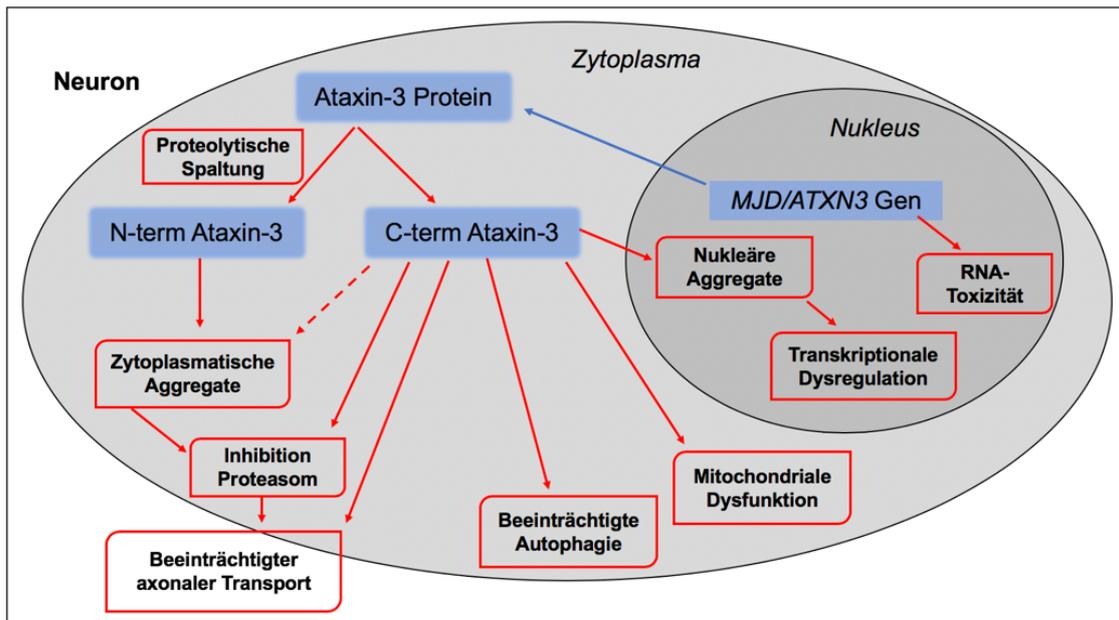


Abbildung 3: Eine schematische Darstellung der Verkettenungen möglicher Pathomechanismen, modifiziert nach Evers et al., 2014

Die proteolytische Spaltung des Ataxin-3 Proteins setzt die Kette verschiedener komplexer vermuteter Pathomechanismen in Gang. Das N-terminale Fragment bildet zytoplasmatische Aggregate, welche zur Inhibition des Proteasoms und einer Beeinträchtigung des axonalen Transports. Das C-terminale Fragment führt zusätzlich zu nukleären Aggregaten und Störungen bei der Transkription.

1.2 Spinozerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3)

Der autosomal dominant vererbten Erkrankung liegt eine Mutation im *MJD1/ATXN3* Gen auf Chromosom 14q32.1 zugrunde, welche sich durch eine abnorm verlängerte Sequenz des Trinukleotids CAG (*CAG-Repeat*) über die gängige Anzahl von 13-36 Triplets hinaus erstreckt und sich bei einer erkrankten Person zwischen 55-86 Basentriplets befindet (Adegbuyiro et al., 2017, Kawaguchi et al., 1994,). Die kleinsten detektierten pathologischen expandierten *Repeat* zeigten 45-51 CAG-Wiederholungen, wobei Patienten in diesem Bereich nicht immer eine Manifestation der Erkrankung aufweisen (Gu et al., 2004, Rieß et al., 2008). In diesem sogenannten Intermediär-Bereich ist somit keine genaue Vorhersage möglich, ob der Patient erkranken wird oder nicht. Aus der genannten Mutation resultierend, ergibt sich eine expandierte Polyglutamin-Sequenz am C-Terminus des translatierten Proteins Ataxin-3 (vgl. Kapitel 1.3. *Ataxin-3 Protein*), welches eine veränderte Funktion, Interaktion und die Bildung unlöslicher Aggregate bedingt (Costa und Paulson, 2012).

Das Leitsymptom der Erkrankung, die Ataxie (*griechisch* „das Fehlen von Ordnung“), sowie weitere klinische Charakteristika, welche vermehrt zwischen der 2. und 5. Lebensdekade primär manifest werden, zeigen eine hohe Variabilität und erstrecken sich über eine Vielzahl an Symptomen. So leiden die Patienten unter anderem an progressiven zerebellaren Störungen, einhergehend mit Gang- und Extremitäten-Ataxien, zerebellaren Augen-Motilität-Störungen, Dysarthrie, Dysphagie und Spastik (Coutinho und Andrade, 1978, Rieß und Schöls, 1996). Schlafstörungen und *Restless-Leg-Syndrome* (RLS) treten gehäuft auf, ebenso chronische Schmerzen bei 47% der Betroffenen (Franca et al., 2007, Schöls et al., 1998). Zusätzliche nicht-motorische Störungen wie Müdigkeit und Depression oder eine eingeschränkte Sprachkompetenz und reduzierte visuelle Gedächtnisfähigkeit werden beobachtet, wobei allerdings die Kriterien einer Demenz-Erkrankungen nicht erfüllt sind (D’Abreu et al., 2010, Franca et al., 2007, Kawai et al., 2004, Zawacki et al., 2002). Des Weiteren kann eine klinische Unterteilung der SCA3 Erkrankung in 4 Subtypen erfolgen, wobei Typ 1 den frühesten Beginn mit stärkster Progredienz, Typ 2 die häufigste Form und Typ 3 einen späteren Erkrankungsbeginn (4. bis 7. Lebensdekade) mit langsamerer Progredienz und vorherrschenden Polyneuropathien, Sensibilitätsstörungen und Muskelkrämpfen, darstellt (Rieß und Schöls, 1996, DeStefano et al., 1996). Typ 4 beschreibt eine Form der SCA3, bei welcher Parkinson-Symptome assoziiert sind (Paulson, 2007).

Wie bei anderen Polyglutamin-Erkrankungen, z.B. Chorea Huntington, korreliert die Länge des *CAG-Repeats* in umgekehrter Proportionalität mit dem Erkrankungsbeginn (auch *Age at Onset*, AAO) und in direkter Weise mit dem Schweregrad der Krankheitsausprägung (Durr et al., 1996). Dennoch kann nicht jede Variation des AAO aufgrund der *CAG-Repeat*-Länge erklärt werden, was auf das Vorhandensein anderer genetischer Modulationsmechanismen oder beeinflussender Umweltfaktoren in der Krankheit hinweist (DeStefano et al., 1996, Jones et al., 2017). Entsprechende Interaktions-Genloci wurden bereits in der Erkrankung Chorea Huntington erfolgreich identifiziert und deren Verständnis könnte zu vielversprechenden Angriffspunkten für pharmakologische Interventionen weiterführen (GeM-HD-Consortium, 2015). Bei SCA3 Patienten

von den Azoren konnten Varianten im Interleukin-6 und Apolipoprotein E Gen identifiziert werden, welche mit einem veränderten (verfrühten) AAO einhergehen (Raposo et al., 2017). Zu beachten ist zudem die Instabilität des *Repeats* bei der Vererbung. Besonders seitens der paternalen Vererbung kann es zu Veränderungen bzw. Verlängerungen in der nächsten Generation und somit zur sogenannten Antizipation kommen, was zu einem AAO vor der Pubertät und CAG-Längen von 75-84 *Repeats* führen kann (Donis et al., 2016, Igarashi et al., 1996). Das Phänomen der Antizipation zeigt sich, wenn DNA-Strangbrüche in den *CAG-Repeats* repariert werden und dies im Laufe der Zelllinie zu einer Verlängerung der Sequenz führt (Schmidt und Pearson, 2016).

Homozygote Erbträger des mutierten *MJD1/ATXN3* Gens sind sehr selten und häufig nur in Fall-Studien beschrieben (Lysenko et al., 2010). Eine größere Vergleichsstudie mit 14 homozygoten Patienten, aus verschiedenen Kohorten ergab einen signifikant früheren Erkrankungsbeginn mit stärkerer Progredienz der Erkrankung im Vergleich zu heterozygoten Erbträgern (Shang et al., 2018). Diese Beobachtung ist teils mit dem *dosage effect* (Dosis-Wirkungs-Beziehung) erklärbar, doch auch hier gilt es weiter, die genauen Pathomechanismen zu erforschen und möglicherweise so im Vergleich mit heterozygoten Patienten neue Erkenntnisse zu gewinnen.

Zur Diagnostik der SCA3 sollte gemäß dem *EFNS/ENS Consensus* immer ein besonderes Augenmerk auf die Familienanamnese des Patienten gelegt werden. Ebenso ist die Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) als Basisdiagnostik empfohlen (van de Warrenburg et al., 2014). Die betroffenen anatomischen Strukturen zeigen in der Bildgebung zuverlässig in den zerebellaren Hemisphären, der Vermis, im gesamten Hirnstamm, dem Mesencephalon, der Pons, der *Medulla oblongata*, der Halswirbelsäule, des Striatum und Thalamus signifikante Atrophien, wie eine Übersichtsarbeit mit 18 Studien von 1995 bis 2016 ergab (Klaes et al., 2016). Zusätzliche genetische *Screenings* für die gängigsten Formen der ADCA, SCA1, 2, 3, 6, 7, sowie DRPLA bei Asiaten, sind angeraten (van de Warrenburg et al., 2014). Eine kausale Therapie der Spinozerebellären Ataxie Typ 3 ist zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich, es existieren lediglich symptomatische therapeutische Interventionen auf

pharmakologischer, physiotherapeutischer oder logopädischer Ebene (Wang, 2017). Ausgenommen der Form der Ataxie mit Vitamin E Defizit (AVED), bei welcher eine hochdosierte lebenslange Vitamin E Gabe in frühen Stadien Erfolge zeigt, sind bisher keine eindeutigen Hinweise für die Wirksamkeit bestimmter Pharmaka vorliegend. Wirkstoffe wie Riluzol, Vareniclin oder Amantadin werden in der Literatur für symptomatische Therapien diskutiert, zeigten aber keine eindeutigen Ergebnisse (Botez et al., 1991, Gabsi et al., 2001, Ristori et al., 2010, Zesiewicz et al., 2012). Im Maus-Modell zeigte sich beispielsweise durch die Gabe von Riluzol eine Abnahme an löslichem Ataxin-3 Protein, aber keine Verbesserung der Symptome (Schmidt et al., 2016).

1.3 Ataxin-3 Protein

Ataxin-3 ist ein ubiquitär exprimiertes Protein von circa 41 kDa, welches einen stark konservierten N-terminalen Abschnitt mit der sogenannte Josephin-Domäne und einen je nach Spezies unstrukturierten C-terminalen Bereich mit der charakteristischen Polyglutamin-Sequenz beinhaltet (Masino et al., 2003), (vgl. *Abbildung 4A*). Bekannter Weise kann diese Polyglutamin-Sequenz im Zuge einer mutationsbedingten Expansion zur Protein-Aggregation, sowie Bildung neuronaler intranukleärer Einschlüsse führen, welche ein Hauptmerkmal der Polyglutamin-Erkrankungen darstellen (Zoghbi und Orr, 2000). Diese Aggregate lassen sich unter anderem mittels immunhistochemischer Färbung oder Fluoreszenzmarkierung mikroskopisch darstellen (vgl. *Abbildung 2*). Bisher wurden 20 funktionale Isoformen des Ataxin-3 Proteins identifiziert, welche sich häufig in ihrem C-terminalen Ende unterscheiden und durch verschiedene *Splice*-Varianten entstehen (Bettencourt et al., 2010). Die im Gehirn häufigste Form besteht aus 361 Aminosäuren (AS), bei einer angenommenen Polyglutamin-Länge von 13 AS (Evers et al., 2014).

Durch seine Funktion als deubiquitinierendes Enzym (DUB) übernimmt Ataxin-3 eine wichtige Position in der Protein-Degradierung durch Cysteinproteasen und greift in weitere Prozesse des Ubiquitin-Systems ein, wie beispielsweise die Qualitätskontrolle oder Membran-Fusionen von Proteinen (Mao et al., 2005).

Ataxin-3 bindet dabei durch seine Ubiquitin-Interaktions-Motive (UIM) an die Polyubiquitin-Kette eines Substrats und schneidet sie, beziehungsweise verhindert deren Elongation. Auf diese Weise interagiert Ataxin-3 mit der E3 Ubiquitin-Protein Ligase CHIP und begünstigt die Degradierung von Ubiquitin-markierten Substraten (Scaglione et al., 2011). Ein weiterer Interaktionspartner von Ataxin-3 ist in diesem Kontext das Protein Parkin, eine neuroprotektive E3-Ligase, welche durch vorhandenes expandiertes Ataxin-3 verstärkt abgebaut wird. Anhand dieses Modells könnte die mögliche Erklärung für zusätzliche Parkinson-Symptome bei SCA3 erkrankten Patienten abgeleitet werden (Durcan und Fon, 2013).

Ataxin-3 selbst wird durch Caspasen und Calpaine proteolytisch gespalten (*vgl. Abbildung 3*), wobei das entstehende C-terminale Fragment des expandierten Ataxin-3 sich als toxischer, als die ungespaltene (*full-length*) Variante erweist (Hübener et al., 2011). Während der Einfluss von Caspasen eher limitiert erscheint, steigt die Evidenz für den Einfluss von Calpainen in der Pathogenese der SCA3 Erkrankung (Evers et al., 2014). Dabei könnten die identifizierten Schnittstellen an den Aminosäuren D208 und S256 einen wichtigen Angriffspunkt für spätere Therapie-Strategien liefern (Weber et al., 2017). Die durch die Spaltung entstehenden N-terminalen Fragmente befinden sich aufgrund der enthaltenen Kern-Export-Signale (NES) vorwiegend im Zytoplasma, während C-terminale Fragmente aufgrund des Kern-Lokalisations-Signals (NLS) in den Nukleus gelangen (*vgl. Abbildung 4A, 4B*).

In seiner Rolle als pathogenes Protein in der SCA3 Erkrankung ist das expandierte Ataxin-3 Protein nicht nur in der Erforschung möglicher Pathomechanismen von Bedeutung. Auch als Angriffspunkt für Pharmaka und für die Entwicklung von Therapieansätzen sind Ataxin-3 und sein Gen *ATXN3* von großem Interesse. Neuere Versuche, Ataxin-3 Expressions-Level mittels Einsatz von Antisense-Oligonukleotiden (ASO) zu senken und somit ein mögliches Therapeutikum zu etablieren, zeigten in Mausmodellen erste vielversprechende Erfolge (Moore et al., 2017).

Die Frage, ob Ataxin-3 ein für die Homöostase essentielles Protein ist, ist noch nicht abschließend geklärt: Einige Studien in Zellmodellen ergaben, dass die

Abwesenheit von Ataxin-3 zu einer verstärkten Desorganisation im Zytoskelett und einem vermehrtem Zelltod führt (Rodrigues et al., 2010). Andererseits zeigten Versuche mit *knock-out* Mäusen, dass der Verlust an Ataxin-3 die Vitalität oder Fruchtbarkeit der Tiere nicht beeinflusste und die Reduktion von mutiertem Ataxin-3 die motorischen Krankheitssymptome milderte (Boy et al., 2009). Der Ansatzpunkt, die Bildung von Ataxin-3 Aggregaten durch den Einsatz von chemischen Chaperonen zu vermindern, zeigte im Zellkulturversuch Erfolge, ist in therapeutischen Dosierungen allerdings aufgrund der Toxizität der Substanzen nicht klinisch umsetzbar gewesen (Yoshida et al., 2002).

Im Zuge dieser Arbeit wird für die Bestimmung des Ataxin-3 Protein-Gehalts in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) die hoch-sensitive Methode des TR-FRET genutzt (vgl. 1.5. TR-FRET in der Proteinbestimmung). PBMCs zeigen im Verhältnis zu anderen humanen Biomaterialien, wie Plasma oder Cerebrospinalflüssigkeit, eine geschätzte höhere Expression an Ataxin-3 und erscheinen dadurch als Proben-Material besonders geeignet zu sein (vgl. Abbildung 4C).

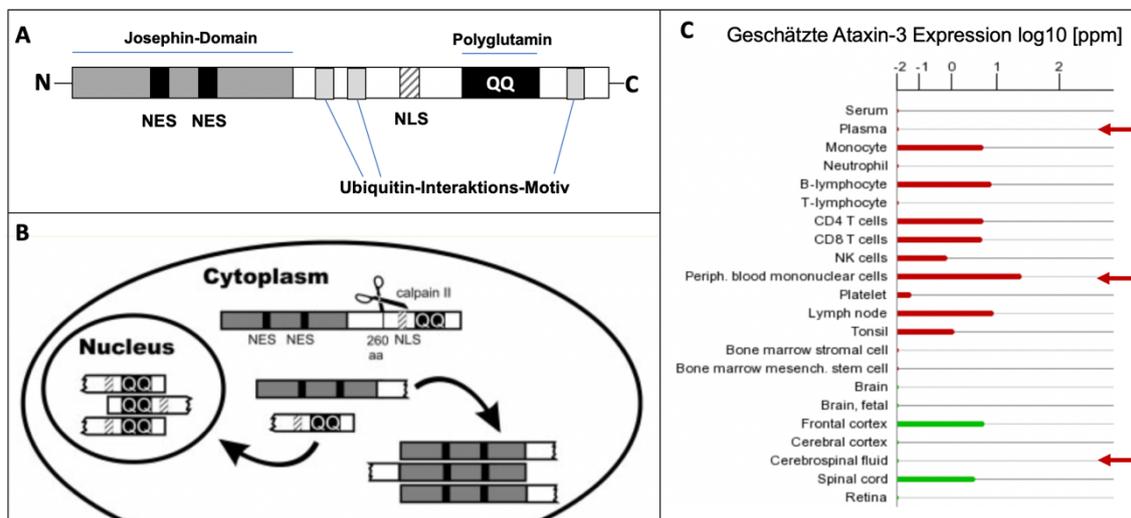


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Ataxin-3 Proteins und seine Verteilung

A) Die schematische Darstellung des Ataxin-3 Proteins zeigt zwei Kern-Export-Signale (NES) in der N-Terminal gelegenen Josephin-Domain, sowie ein Kern-Lokalisations-Signal (NLS) nahe der Polyglutamin-Sequenz. Zudem sind die drei Ubiquitin-Interaktions-Motive dargestellt. B) Zeigt die Folge der Proteinspaltung durch Calpain II, wodurch N-terminale Fragmente des Ataxin-3 sich im Cytoplasma anreichern und die Polyglutamin tragenden Fragmente in den Nucleus gelangen (Hübener et al., 2011). C) Die Übersicht zeigt das Vorkommen von Ataxin-3 in verschiedenen humanen Zelltypen. Die mit roten Pfeilen gekennzeichneten Gewebe (Plasma, PBMCs und CSF) werden im Rahmen dieser Arbeit untersucht. (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ATXN3>, Stand 01.08.2018)

Um Ataxin-3 als potenziellen Biomarker für pathologische Prozesse in der Erkrankung der Spinozerebellären Ataxie Typ 3 zu untersuchen, ist eine möglichst präzise und verlässliche Quantifizierung des krankheits-assoziierten Proteins unerlässlich. Neben kommerziell erhältlichen ELISA Kits für humanes Ataxin-3, oder der Methode der Massenspektrometrie, wird lösliches oder aggregiertes Ataxin-3 Protein bisher vorwiegend mittels der *Western Blot* Methode quantifiziert (Scarff et al., 2015, Vinatier et al., 2015).

1.4 Biomarker und relevante klinische Scores

Ein Biomarker ist definiert als ein objektiv erhobenes Merkmal, welches als Indikator für einen physiologischen oder pathologischen Prozess, sowie für die Evaluation eines (Krankheits-)Verlaufes, dient. Somit sind Biomarker in der Diagnostik, der Bewertung des momentanen Zustandes und in der Therapiebeurteilung unabdingbar (Group, 2001). Des Weiteren lassen sich Biomarker in zwei Untergruppen, den „*trait*“ und den „*state*“ Biomarker unterteilen: Die erste Gruppe ermöglicht Aussagen über die An-/Abwesenheit der Krankheit, während „*state biomarker*“ die Schwere der Erkrankung wiedergeben können (Lima und Raposo, 2018, Weir et al., 2011), (vgl. *Tabelle 2*).

Für die Spinozerebelläre Ataxie Typ 3 ist der vorrangige „*trait biomarker*“ die Länge des expandierten *CAG-Repeats*, wobei allerdings nur 50-70% der Variationen des AAO anhand dieses Markers erklärbar sind (Bettencourt und Lima, 2011). Somit ist die weitere Forschung auf dem Gebiet der modulierenden Faktoren in der SCA3 Erkrankung dringend erforderlich: Zum einen, um in der Zukunft eine genauere Vorhersage des Krankheitsbeginns für die Patienten treffen zu können, zum anderen, um in klinischen Studien eine Stratifizierung der Teilnehmer gemäß ihres genetischen Hintergrundes vorzunehmen und so die Aussagekraft des Tests zu erhöhen (Gusella und MacDonald, 2009).

Die gängigsten, zur klinischen Untersuchung genutzten Fragebögen und daraus resultierende *Scores* sind im Folgenden zusammengefasst (vgl. *Tabelle 3*). Einer der am häufigsten in der Diagnostik der SCA3 Erkrankung angewandte und

weltweit verbreitete Test stellt der *Scale of the Assessment and Rating of Ataxia* (SARA) dar. Hierbei werden unter anderem das Gangbild und Stabilität, die Motorik der oberen Extremitäten und auch die Sprache des Patienten analysiert (vgl. *Anhang 1*). Der *Inventory of Non-Ataxia Signs* (INAS) kontrolliert die Entwicklung der Nicht-Ataxie-Symptome, wie beispielsweise Spastik, Lähmungen oder Dysphagie (vgl. *Anhang 2*). Beide Scores, SARA und INAS, werden im Zuge dieser Arbeit für die klinische Bewertung der Schwere des Erkrankungsstadiums der SCA3 Patienten genutzt.

Jeder Score hat jedoch gewisse Vor- und Nachteile und sollte passend gemäß der jeweiligen Fragestellung gewählt werden. Auch kombinierte Scores, wie der *Cross-sectional (annual) disease progression Score* (CSDP), ein Quotient aus SARA und Erkrankungsdauer, können hilfreiche Parameter bei der Auswertung von Studien darstellen (Wilke et al., 2018).

Die verschiedenen neurologischen Scores zur Bewertung des Krankheitsstadiums eines Patienten weisen unbestreitbar einige Defizite auf. Ihre Erhebung unterliegt trotz klarer vergleichbarer Kriterien, subjektiven Einschätzungen und Erfahrungen des Behandlers. Minimale leichte Veränderungen in kurzen Zeiträumen sind schwer zu erkennen. Zugleich scheinen die individuelle Tagesform des Patienten und mögliche Lerneffekte einen potentiellen Bias darzustellen (L. Schöls, persönliche Mitteilung).

Diese Nachteile könnten durch objektiv messbare molekulare Biomarker ausgeglichen werden und somit die Sensitivität der Diagnostik und Verlaufskontrollen erhöhen (Lima und Raposo, 2018).

Neben objektivierbaren Markern, sind jedoch im Hinblick auf zukünftige Bewertung der Erfolge von Therapie-Studien auch subjektive Empfindungen der Patienten als „Marker“ nicht außen vor zulassen:

Eine Langzeitstudie über 8 Jahre zur Evaluierung und Vergleich von Patienten Angaben (*patient-reported outcome measures*, PROMs) und den klinischen Scores wie SARA und INAS zeigte gegensätzliche Ergebnisse und lässt erkennen das Fragen zu Lebensqualität, *Depression-Scales* und *Lifestyle-Fragebögen* eine sinnvolle Ergänzung sein können (Jacobi et al., 2018).

Tabelle 2: Übersicht einer Auswahl potentieller „state biomarker“, modifiziert nach Lima und Raposo, 2018

Mechanismus	Gen/Protein	Ergebnisse	Referenz
Autophagie	<i>BECN1</i>	1,4-fach höhere Level an <i>BECN1</i> -mRNA in SCA3 Patienten in Vergleich zu Kontrollen	(A)
Inflammation	Eotaxin	Konzentrationen von Eotaxin bei präsymptomatischen SCA3 Patienten signifikant erhöht im Vergleich zu manifesten Patienten und Kontrollen	(B)
Oxidativer Stress	Superoxid-Dismutase (SOD), Gluthation-Peroxidase (GSH-Px)	SOD Level von präsymptomatischen SCA3 Patienten höher im Vergleich zu manifesten Patienten; GSH-Px Aktivität signifikant niedriger im Vergleich zu Kontrollen und präsymptomatischen Patienten	(C)
Insulin-System	IGFBP3, IGF-1, IGFBP1	Niedrige Level von Insulin und IGFBP3, erhöhte Level an freien IGF-1 und IGFBP1 in SCA3 Patienten im Vergleich zu Kontrollen	(D)
Axonale Schädigung	Neurofilament (NFL)	Signifikant erhöhte Level im Serum bei SCA3 Patienten im Vergleich zu Kontrollen. Dieser Marker ist bereits in anderen Erkrankungen wie ALS, MS und HD etabliert.	(E)

Exemplarische Darstellung einiger Ergebnisse auf dem Feld der Biomarker Forschung in der SCA3-Erkrankung (A) (Kazachkova et al., 2017), (B) (da Silva Carvalho et al., 2016), (C) (de Assis et al., 2017), (D) (Saute et al., 2011), E) (Wilke et al., 2018)

Tabelle 3: Übersicht der gängigen klinischen Scores, modifiziert nach Saute and Jardim, 2018

Art des Scores	Name	Zahlenwerte	Bewertung
Semi-quantitative Ataxie Skala	SARA [1]	0-40	Verlässlich, weniger zeitaufwändig als ICARS, häufigste Verwendung. (Gang-Analyse und motorische Tests der oberen Extremitäten, Sprache, u.a.)
	ICARS [2]	0-100	Redundanz einiger Fragestellungen
Semi-quantitative Ataxie und Non-Ataxie Skala	NESSCA [3]	0-40	Non-Ataxie Befunde zeigen eine langsamere Progression im Vergleich zu Ataxie Befunden
Semi-quantitative Non-Ataxie Skala	INAS [4]	0-16	Keine Bewertung der Ataxie Befunde, welche aber das Leitsymptom darstellen, keine lineare Progression in längeren <i>follow ups</i> . Gute Ergänzung zur Beurteilung von Non-Ataxie Befunden (Reflexe, ophthalmologische Auffälligkeiten, Lähmungen, Spastik, Schluckbeschwerden, u.a.)
Quantitative Skala	CCSF, SCAFI		Geeignet zur verlässlichen Detektion kleiner Veränderungen in kurzen Zeiträumen

Weitere Informationen zu den in der Abbildung genannten Scores können den folgenden Quellen entnommen werden: [1] (Schmitz-Hubsch et al., 2006), [2] (Trouillas et al., 1997), [3] (Kielling et al., 2008), [4] (Schmitz-Hubsch et al., 2008)

1.5 TR-FRET in der Proteinbestimmung

Das Verfahren des *Time-resolved fluorescence resonance energy transfer* (TR-FRET) wird im deutschen Sprachgebrauch auch als Förster-Resonanz-Energietransfer bezeichnet und ist ein probates Mittel für Massendurchsatz-Quantifizierungen (Liang et al., 2014). Neben der Bestimmung von Proteinkonzentrationen wird der TR-FRET Immuno-Assay seit längerer Zeit für die Beobachtung von Protein-Interaktionen, insbesondere von Rezeptoren und Enzymen, genutzt (Hirata et al., 2004). Im Feld der Polyglutamin-Erkrankungen wird der TR-FRET Assay bereits zur Detektion der jeweiligen krankheitsassoziierten Proteine genutzt beziehungsweise entsprechende Protokolle sind in der Entwicklung. Beispielsweise für das Protein Huntingtin, in der Erkrankung Chorea Huntington, ist bereits ein bewährtes etabliertes Protokoll vorliegend. Damit gelang es in der Vergangenheit Polyglutamin-expandedes Huntingtin erfolgreich in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) nachzuweisen und im Bereich der potentiellen Biomarker zu etablieren (Weiss et al., 2012).

Das allgemeine Prinzip des TR-FRET-Verfahrens ist es, dass durch das Binden zweier fluoreszenz-markierter Antikörper (AK) am selben Proteinmolekül, bei ausreichend naher räumlicher Beziehung der Bindungsorte (5-9 nm), ein Energie-Transfer von dem sogenannten Donor auf den Akzeptor stattfindet (Cui et al., 2014). Dabei sind die Antikörper jeweils mit den Luminophoren Terbiumkryptat (tb) oder D2, einem organischen Konstrukt von ca. 1000 Da, versehen (<https://www.cisbio.com/drug-discovery/tr-fret-basics>) (vgl. *Abbildung 5*). Andere Fluorophore sind möglich, finden aber in unserer Methodik keine Anwendung.

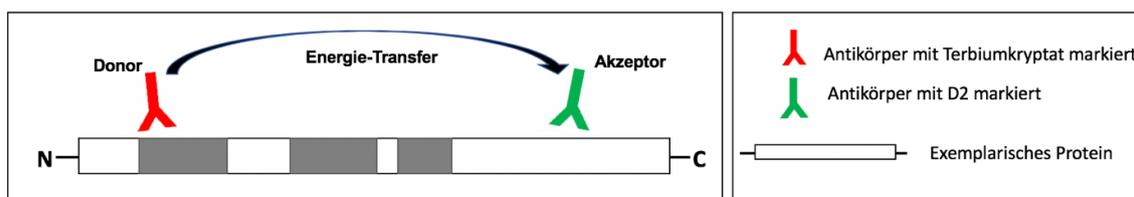


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Energie-Transfers beim Binden der Antikörper (AK)

Durch das Binden beider Antikörper am selben Molekül kann durch die räumliche Nähe der Energie-Transfer vom Donor (rot, tb-markiert) auf den Akzeptor (grün, D2-markiert) stattfinden.

Der initiale Lichtimpuls von $1 \mu\text{s}$ veranlasst den Donor zur Anregung und resultiert in einem Fluoreszenz-Signal mit einem Höhepunkt bei 620 nm und einer Dauer über mehrere $100 \mu\text{s}$. Verglichen damit ist die Hintergrund-Fluoreszenz mit $50 \mu\text{s}$ kürzer, wobei durch eine zeitverzögerte Messmethode von $50\text{-}150 \mu\text{s}$ unspezifische, kurzlebige Emissionen eliminiert werden können (Cui et al., 2014, Liang et al., 2014), (vgl. *Abbildung 6*). Die Akzeptor-Fluoreszenz wird nur messbar, wenn es zum Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer zwischen den beiden Antikörpern kommt und resultiert in einer Spitze im Bereich von 665 nm über mehrere $100 \mu\text{s}$ bestehend. Das Verhältnis der beiden Fluoreszenz-Intensitäten bei den jeweiligen Wellenlängen (620 nm , 665 nm) wird berechnet und bereinigt (vgl. *Abbildung 6*).

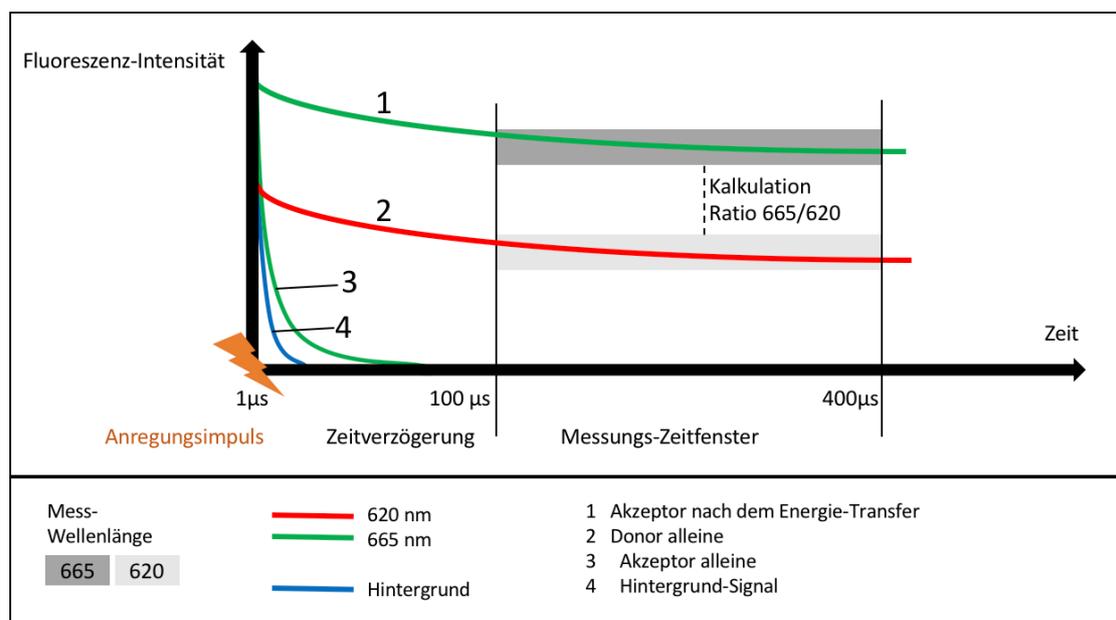


Abbildung 6: Schema des Energie-Transfers bei der Reaktion zwischen Donor und Akzeptor, modifiziert nach Cui et al., 2014

Durch das zeitverzögerte Messverfahren werden nur die Signale 1 (Akzeptor-Emission nach dem Energie-Transfer) und 2 (alleinige Donor-Emission) erfasst, wobei Hintergrund-Emissionen und kurzlebige Signale nicht mit in die Berechnung einfließen und folglich zu sensitiveren Messergebnissen beitragen. Die Ratio von Signal 1 und 2 wird ermittelt (Ratio 665/620) und zur weiteren Analyse genutzt.

Für die Messungen zur Bestimmung der mutierten Ataxin-3 Proteinmenge werden die bereits etablierten monoklonalen Antikörper Ataxin-3 Klon 1H9, welcher eine Primärsequenz von 20 Aminosäuren N-terminal des Polyglutamine

Traktes erkennt, sowie MW1, ein spezifischer Antikörper bei verlängerten, mutierten Polyglutamin-Sequenzen über 15Q, verwendet (Nguyen et al., 2013), (vgl. *Abbildung 7*). Der im Zuge dieser Arbeit neu für den TR-FRET etablierte, Polyglutamin-spezifische Antikörper 1C2 zeigt seine Affinität erst ab einer Expansionslänge von über 37 Polyglutaminen und weist somit für das pathologisch veränderte Protein eine größere Trennschärfe zum wildtypischen Protein auf (Trottier et al., 1995), (vgl. *Kapitel 2.4. Antikörper*).

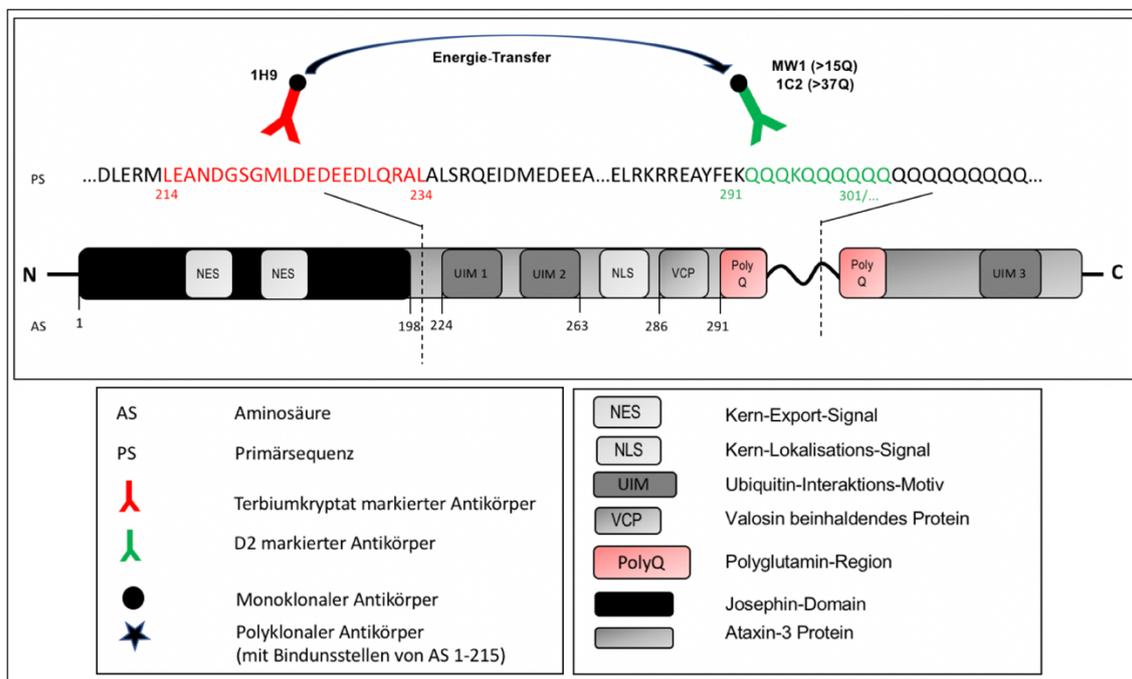


Abbildung 7: Schema des FRET am Proteinmolekül Ataxin-3, modifiziert nach Nguyen et al., 2013

Bindungsstellen der Antikörper MW1-D2 bzw. 1C2-D2 und 1H9-tb am expandierten Ataxin-3 Protein: Der Energie-Transfer erfolgt vom Donor (rot) auf den Akzeptor (grün) bei räumlicher Nähe durch Bindung am gleichen Molekül.

Die im Verfahren gemessene Signalstärke ΔF (vgl. *Abbildung 8*) kann allerdings durch zahlreiche Faktoren beeinflusst werden, weshalb eine strikte Einhaltung des Protokolls unter Beachtung verschiedenster Parameter (Zeit, Temperatur, pH-Wert, u.a.) unerlässlich ist. Frühere Beobachtungen an anderen Proteinen zeigten, dass das Verfahren bei pH-Werten von 4 bis 5 das stärkste proteinspezifische Signal ergibt (Harma et al., 2008). Auch thermische Einflüsse ergaben bei früheren Studien mit dem Huntingtin Protein bei kurzen

Polyglutamin-Formen (25Q) ein höheres Signal im Vergleich zu expandierten 72Q-Längen, welche bei 4°C ein deutliches Signal generierten (Cui et al., 2014). Spaltungen zwischen zwei Epitopen des Proteins, eine veränderte Affinität oder Exposition des Antikörpers zum Epitop, Proteinmodifikationen, Aggregationen, sowie Lichtausbleichungen nehmen ebenfalls Einfluss auf die Resultate des TR-FRET (Liang et al., 2014). Dennoch ist das Verfahren äußerst sensitiv und es werden keine Waschvorgänge benötigt. Testungen mit sehr kleinen Probenmengen von 5µl in einer 384-Well-Platte helfen, wertvolles Patientenmaterial zu sparen (Degorce et al., 2009).

$$\Delta F = \frac{\text{Ratio}_{\frac{665}{620}}(\text{Probe}) - \text{Ratio}_{\frac{665}{620}}(\text{Hintergrund})}{\text{Ratio}_{\frac{665}{620}}(\text{Hintergrund})} * 100$$

Abbildung 8: Formel zur Berechnung der Signal-Stärke ΔF

Neben dem Nachweis von Ataxin-3 in PBMCs mittels der TR-FRET Methode sind auch andere humane Biomaterialien, wie Plasma und Cerebrospinalflüssigkeit (CSF), für die Testung und Quantifizierung von pathologischen Proteinen von Interesse: Plasma ist als potenzielles Ausgangsmaterial für die Biomarker-Forschung sehr unproblematisch zu gewinnen. Die CSF-Entnahme hingegen ist aufwendiger und von Patienten weniger akzeptiert als die Blutabnahme. Allerdings ist CSF durch die räumliche Nähe zum Erkrankungsort bei dem Umspülen der Neuronen von besonderer Bedeutung und womöglich aussagekräftiger.

Alpha-Synuklein, welches in der Parkinson-Erkrankung eine tragende Rolle spielt, konnte bereits in CSF-Proben mittels TR-FRET erfolgreich quantifiziert werden (Bidinosti et al., 2012). Die Aufbereitung der CSF-Proben von der Entnahme bis zur Bestimmung von Hämoglobin-Verunreinigungen sollte dabei möglichst nach standardisierten Protokollen erfolgen (Mollenhauer et al., 2017, Teunissen et al., 2009). Ein weiterer hoch-sensitiver Immuno-Assay zur Protein Detektion neben der FR-FRET Methode ist das *single-molecule-counting* (SMC) (Loscher et al., 1998, Hoefig et al., 2018). Mit dem SMC-Verfahren gelang es, mutiertes Huntingtin-Protein von Konzentrationen im Femtomolar-Bereich in

CSF-Proben nachzuweisen, was zuvor mittels der TR-FRET Methode nur in PBMCs gelungen war (Wild et al., 2015).

1.6 Polymorphismen als modulierende Faktoren

Polymorphismen sind Sequenzvariationen, die zwischen verschiedenen Individuen auftreten und somit minimale Abweichungen in der Basenabfolge eines Gens bedingen. Bei Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) beschränkt sich die genetische Veränderung auf den Austausch einer einzigen Base an eine bestimmten Stelle des Genoms, kann aber je nach Lage einen entscheidenden Einfluss auf die Transkription nehmen, oder Veränderungen in der Proteinstruktur bedingen. Da der Korrelationsfaktor zwischen AAO und der *CAG-Repeat*-Länge nur bei 0,67 bis 0,87 liegt, kann nicht jede Variation des AAO auf diese Art erklärt werden (Rieß et al., 2008). Dies lässt die These zu, dass neben Umweltfaktoren und individuellen Gewohnheiten, sowie Lebensstil des Patienten, auch die weitere genetische Ausstattung, folglich auch SNPs, eine tragende Rolle spielen könnten. Neben der Erforschung von genetischen Modifikationen in der SCA3 Erkrankung, sind SNPs auch von Interesse bei der Ergründung des Ursprungs der Erkrankung und der Untersuchung von verschiedenen Haplotypen (Costa et al., 2002).

Im *ATXN3* Gen wurden bereits zahlreiche Polymorphismen untersucht, wovon im Zuge dieser Arbeit drei analysiert werden (vgl. *Abbildung 9, Tabelle 4*). Die SNPs $\underline{A}^{669}\text{TG}/\underline{G}^{669}\text{TG}$ (rs1048755), $\underline{C}^{987}\text{GG}/\underline{G}^{987}\text{GG}$ (rs12895357) sowie $\text{TAA}^{1118}/\text{TAC}^{1118}$ (rs7158733) wurden früh in einer japanischen Studie identifiziert und Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen festgestellt (Goto et al., 1997). Eine weitere Studie zur Untersuchung dieser drei SNPs in Bezug auf die Stabilität und Variation des *CAG-Repeats* ergab, dass eine höhere Frequenz von Allel A bei den SNPs $\underline{A}^{669}\text{TG}/\underline{G}^{669}\text{TG}$ und $\text{TAA}^{1118}/\text{TAC}^{1118}$ mit größeren *CAG*-Längen einhergeht. Zudem zeigten die Daten, dass SNP $\underline{C}^{987}\text{GG}/\underline{G}^{987}\text{GG}$ einen Effekt auf die Instabilität zwischen den Generationen aufweist (Maciel et al., 1999). Eine Studie zur Analyse der Haplotypen dieser drei Polymorphismen mit Beteiligung von 16 Nationen ergab, dass die Variante A-C-A (669-987-1118) bei

SCA3 Patienten mit 72 % deutlich vermehrt vorliegt, während sie bei gesunden Kontrollen kaum vorkommt. Regionale Unterschiede konnten auf den Azoren zwischen Patienten der Inseln Flores mit A-C-A und São Miguel mit G-G-C, der zweithäufigsten Variante, festgestellt werden (Gaspar et al., 2001). Zwei weitere, neuer identifizierte SNPs im *ATXN3* Gen, rs709930 und rs910369, zeigten bei chinesischen Patienten für Allel A, respektive T, einen verfrühten Erkrankungsbeginn von zwei bis vier Jahren (Long et al., 2015). Darüber hinaus wurden in mehreren anderen Genen, beispielsweise *FAN1* und *PMS2* SNPs detektiert, welche eine signifikante Assoziation mit dem AAO in Polyglutamin-Erkrankungen wie HD oder SCA3 aufwiesen (Bettencourt et al., 2016). Ebenso wurden für die Parkinson-Erkrankung mögliche relevante SNPs beschrieben: rs1352303, welcher den Erkrankungsbeginn bei Frauen zu verzögern scheint und rs9347683, welcher das Risiko für ältere Menschen zur erkranken, erhöhte (Chung et al., 2011, Chang et al., 2011). Da bei einigen SCA3 Patienten Parkinson-Symptome vorliegen und eine Interaktion zwischen Ataxin-3 und Parkin denkbar ist, werden drei SNPs im *PARK2* Gen, AGC⁶⁰¹/AAC⁶⁰¹(rs1801474), GTA¹²³⁹/CTA¹²³⁹ (rs1891582) und GAT¹²⁸¹/AAT¹²⁸¹ (rs1801334), analysiert (vgl. *Abbildung 9, Tabelle 4*). Sie befinden sich auf Exon 4, Exon 10 und Exon 11, weswegen in den späteren Ergebnisbeschreibungen teils diese Angabe als jeweilige Abkürzung für den SNP genutzt wird.

Tabelle 4: Übersicht der zu analysierenden Polymorphismen

Gen	Exon	Code	Basenveränderung	AS-Veränderung	Häufigkeit	Quelle
<i>ATXN3</i>	Exon 8	rs1048755	Stelle 669: A/G GTG ⇒ ATG	AS 212: V [Val] ⇒ M [Met]	T= 0,3251/1628	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs1048755
	Exon 10	rs12895357	Stelle 987*: C/G GGG ⇒ CGG	AS 318*: G [Gly] ⇒ R [Arg]	G=0,276/1382	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs12895357
	Exon 10	rs7158733	Stelle 1118*: A/C TAC ⇒ TAA	AS:361*: Y [Tyr] ⇒ Stop [Arg]	T=0,3389/1697	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?searchType=adhoc_search&type=rs&rs=rs7158733
<i>PARK2</i>	Exon 4	rs1801474	Stelle 601: A/G AGC ⇒ AAC	AS 167: S [Ser] ⇒ N [Asn]	T= 0,1174/588	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1801474
	Exon 10	rs1891582	Stelle 1239: C/G GTA ⇒ CTA	AS 380: V [Val] ⇒ L [Leu]	G= 0,1721/862	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1801582
	Exon 11	rs1801334	Stelle 1281: A/G GAT ⇒ AAT	AS 394: D [Asp] ⇒ N [Asn]	T=0,0134/67	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1801334

* Position abhängig von CAG-Repeat-Länge, hier angenommen für 13Q

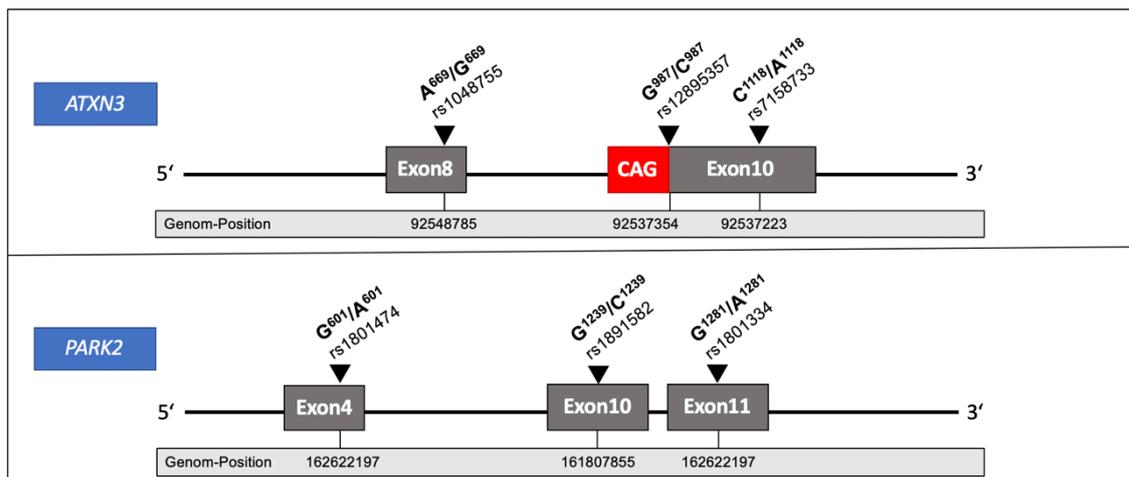


Abbildung 9: Graphische Darstellung der Lokalisation der zu analysierenden Polymorphismen, modifiziert nach Martins et al., 2007

SNP A⁶⁶⁹/G⁶⁶⁹ des ATXN3 Gens befindet sich auf Exon 8, G⁹⁸⁷/C⁹⁸⁷ und C¹¹¹⁸/A¹¹¹⁸ liegen auf Exon 10 hinter dem CAG-Repeat (*rot*). Im PARK2 Gen befinden sich die zu analysierenden SNPs (G⁶⁰¹/A⁶⁰¹, G¹²³⁹/C¹²³⁹, G¹²⁸¹/A¹²⁸¹) befinden sich auf Exon 4, 10 und 11.

1.7 European Spinocerebellar Ataxia Type 3/ Machado-Joseph Disease Initiative (ESMI-Projekt)

Das Projekt ESMI wird durch das *Joint Programme - Neurodegenerative Disease Research* (JPND) auf europäischer Ebene gefördert, sowie national durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung im Zeitraum von 2016 bis 2019 unter dem Förderkennzeichen 01ED1602B unterstützt und unterliegt der Leitung von Prof. Dr. Olaf Rieß und dem Koordinator Prof. Dr. Thomas Klockgether. Neben dem Standort Tübingen ist Bonn als weiteres deutsches Zentrum vertreten, während sich das Projekt auf internationaler Ebene über Portugal, Großbritannien und die Niederlande erstreckt. Kooperationen in weitere Länder wie die USA bestehen oder befinden sich in Planung. Zudem leisten zahlreiche assoziierte Partner-Zentren (z.B. Aachen, Essen, Frankfurt und Heidelberg) ihren Beitrag und können auf diese Weise die Zahl an teilnehmenden Patienten im Projekt weiter erhöhen. Besonders interessant ist diese Kooperation beispielsweise im Bezug auf den Zugang zu sehr seltenen homozygot betroffenen Mutationsträgern. Ziel des Projektes ist es, eine möglichst große Patientenkohorte zu akquirieren und ebenso Verwandte ersten Grades (Risikopatienten) miteinzubeziehen. Alle Daten sollen dabei nach

standardisierten Protokollen erhoben und in einer gemeinsamen Datenbank zusammengeführt werden, wobei die Befunderhebungen der Patienten mit Spinozerebellärer Ataxie Typ 3, Blutabnahmen in *PAXgene*, *Cell Preparation Tubes* (CPT), *Serum Separating Tubes* (SST), *Plasma Preparation Tubes* (PPT) und EDTA-Röhrchen, ggf. Liquorentnahmen, Ganganalysen, MRT-Bildgebungen und auch die Erfragung von Gewohnheiten, Lebensqualität oder Bewegungsaktivitäten, umfassen. Es wird angestrebt, neben einer Basisuntersuchung zwei weitere Nachuntersuchungen der Kohorte zu veranlassen, um im sogenannten *follow-up* zeitliche Entwicklungen evaluieren zu können. Darüber hinaus bietet das Projekt die Möglichkeit des internationalen Austausches zwischen Experten aus den Bereichen der Neurologie und Genetik, sowie zwischen Klinikern, Forschern und Patientenorganisationen auf dem Gebiet der Spinozerebellären Ataxie Typ 3. Relevante Informationen sind der breiten Öffentlichkeit unter www.dzne.de/forschung/studien/klinische-studien/esmi (Stand 17.05.2018, 12:57) verfügbar.

Diese Studie wurde durch die lokale Ethik-Kommission unter der Nummer 598/2011B01 genehmigt. Für die Blutabnahmen bei den EU-Partnern lagen lokale Ethikvoten vor. Alle Daten wurden anonymisiert bearbeitet und erlauben keine Rückschlüsse auf den Probanden. Ebenso wurden die Proben „blind“ in den Experimenten bearbeitet und erst nach der Auswertung in Kontrollen und Patienten entschlüsselt.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Momentan versuchen verschiedenste Studien mögliche biochemische, neurophysiologische oder bildgebende Marker, in der Spinozerebellären Ataxie Typ 3 zu evaluieren und zu etablieren (Saute und Jardim, 2018). Besonders im Hinblick auf anstehende klinische randomisierte Therapiestudien zur möglichen Behandlung der Spinozerebellären Ataxie Typ 3 und verwandten Formern, ist die Verfügbarkeit zuverlässiger Biomarker von großer Bedeutung. Nur so sind mögliche Therapieerfolge neuer Behandlungsmethoden zu bewerten und zu belegen. Eine weitere Anforderung an den potenziellen Biomarker ist eine

möglichst einfache Verfügbarkeit, ohne die Patienten unnötig zu belasten. So rücken besonders periphere Marker gewonnen aus venösem Blut in den Fokus. Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Etablierung und Erprobung der Messmethode von Polyglutamin-expandiertem Ataxin-3 (exp./ mt Ataxin-3) aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs), mittels des TR-FRET-Verfahrens.

Ebenso gilt es, das Potenzial dieser Ataxin-3 Protein-Level als mögliche Biomarker zu evaluieren, indem Korrelationen mit den klinischen Patienten-Daten durchgeführt und überprüft werden. Hierbei sollen Parameter wie Erkrankungsbeginn, Erkrankungsdauer, oder bekannte klinische Scores (SARA/ INAS) des jeweiligen Patienten mit dem gemessenen Ataxin-3 Leveln verglichen werden.

Darüber hinaus soll untersucht werden, ob der Assay auch in anderen Geweben wie Plasma, Cerebrospinalflüssigkeit, Fibroblasten, iPSCs oder Gehirnlisaten zur Ataxin-3 Quantifizierung genutzt werden kann.

Als Weiterführung früherer Versuche von Frau Dr. rer. nat. Jeannette Hübener-Schmid und Frau Kathrin Gonsior soll in dieser Arbeit der Antikörper 1C2-D2 für den TR-FRET Assay etabliert werden und der bereits bestehende Assay weiter modifiziert und validiert werden. Alle Messungen werden folglich mit beiden Antikörpern MW1-D2 und 1C2-D2 durchgeführt werden.

Auf der Suche nach weiteren modifizierenden Faktoren gilt es in dieser Arbeit auch den Einfluss einiger bekannter Einzelnukleotid-Polymorphismen zu untersuchen. Diese Versuche wurden größtenteils unterstützend von Frau Annika Lambert durchgeführt. In Zusammenarbeit mit Herrn Patrik Pelz wurden im Zuge dieser Arbeit für die vorliegende Kohorte alle Genotypen einheitlich mittels Fragment-Längenanalyse überprüft. Somit sollte sichergestellt werden, dass alle CAG-Repeat-Längen, die für Korrelationen genutzt werden, korrekt sind und Kontrollen sicher von Patienten unterschieden werden.

Abschließend gilt es zu bewerten, wo die Chancen und die Grenzen dieser Quantifizierungsmethode für expandiertes Ataxin-3 Protein liegen und ob Ataxin-3 somit als ein potenzieller Diagnostik-, Verlaufs- oder Therapiemarker in der SCA3 Erkrankung dienen könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Geräte, Software und Verbrauchsmittel

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Geräte und Laborutensilien

Gerät	Name	Hersteller
PCR-Cycler	G-Storm GS1	Alpha Metrix Biotech, Rödermark, D.
Drucker Gelbilder	Drucker P91D	Mitsubishi, Ratingen, D.
Gefrierschrank, -20°	-	Gram, Giesen, D.
Gefrierschrank, -80°	Hera Freeze™	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, DK
Gelelektrophorese Kammer	Model: 40-1214	peQlab, Erlangen, D.
Heizblock	HBT 130	HLC, Bovenden, D.
Kamera	-	Olympus, Hamburg, D.
Kühlschrank +4°C	-	Kirsch, Willstätt-Sand, D.
Laser (FRET)	TRF Light Unit 337 nm	PerkinElmer, Waltham, US.
Mikro Cuvette	µCuvette G1.0	Eppendorf, Hamburg, D.
Mikrowelle	-	SEVERIN, Sundern, D.
Zell-Zählkammer	Neubauer-Zählkammer, 0,1 mm Tiefe, 0,0025 mm ²	Marienfeld, Lauda-Königshofen, D.
Photometer groß	Ultrospec 3100 pro	Amersham Biosci., Buckinghamshire, UK.
Photometer klein	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, D.
Pipette 0,5-10	Research 10	Eppendorf, Hamburg, D.
Pipette 10-100	Research 100	Eppendorf, Hamburg, D.
Pipette 1000	Research 1000	Eppendorf, Hamburg, D.
Pipette Zellkultur	pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, D.
Plattenlesegerät (FRET)	Multimode Plate Reader EnVision	PerkinElmer, Waltham, US.
Plattenlesegerät (universal)	Multiplate Reader MWGt	BioTek Instruments, Winooski, US.
Präzisionswaage	Precisa	PESA-Waagen, Bisingen, D.
Sequenzier	CEQ 8000 Genetic Analysis System	Beckman Coulter, Brea, US.
Steril Bank Zellkultur	HeraSafe	Heraeus, Hanau, D.
Stromquelle Elektrophorese	Electrophoresis power supply Consort E835	Fisher Scientific, Schwerte, D.
UV-BOX	Transilluminator Bio View UV	Biostep, Jahnsdorf, D.
UV-Lichttisch	-	peQlab, Erlangen, D.
Vakuum Trockner	Concentrator 5301	Eppendorf, D.
Vortexer	VF2	Janke&Kunkel, Staufen, D.
Wärmemixer	Thermomixer kompakt	Eppendorf, Hamburg, D.
Wasserbad	-	GFL, Burgwedel, D.
Zentrifuge gekühlt	Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg, D.
Zentrifugen	Centrifuge 5804, 5810, 5417 C	Eppendorf, Hamburg, D.

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Software

Software	Name	Hersteller
Software Berechnungen und Abbildungen	Excel, Power Point	Microsoft, Redmond, US.
Software Gelbilder	Argus XI	Argus Sci., Tyngsborough, US.
Software Plattenlesegerät (BCA)	Gen5	BioTek, Winooski, US.
Software Plattenlesegerät (Bradford)	KC4 v3.4	BioTek, Winooski, US.
Software Sequenzer	GenomeLab System	SCIEX, Darmstadt, D.
Software Statistik	GraphPad 7	PRISM, San Diego, US.
Software Statistik	R	GNU <i>General public license</i>
Software TR-FRET	EnVision Manager	PerkinElmer, Waltham, US.

Tabelle 7: Übersicht der Verbrauchsmittel

Verbrauchsmaterial	Name	Hersteller
1,5 ml Reaktionsgefäß	<i>500 Reaction Tubes</i>	greiner bio-one, Frickenhausen, D.
1,5 ml Reaktionsgefäß UV	<i>Safe-Lock Tubes, amber</i>	Eppendorf, Hamburg, D.
15 ml Falcon	<i>CELLSTAR® Tubes</i>	greiner bio-one, Frickenhausen D.
2 ml Kryo-Röhrchen	<i>CRYO.S™</i>	greiner bio-one, Frickenhausen D.
2 ml Reaktionsgefäß	<i>Safe-Lock Tubes</i>	Eppendorf, Hamburg, D.
384-Well-Platte TR-FRET	<i>ProxiPlate™ - 384 TC Plus</i>	PerkinElmer, Waltham, US.
50 ml Falcon	<i>CELLSTAR® Tubes</i>	greiner bio-one, Frickenhausen, D.
6-Well-Platte	<i>Tissue Culture Plate, 6 Well</i>	Corning Inc., New York, US.
96-Well-Platte (Plate Reader)	<i>Mikroplate, 96-Well</i>	greiner bio-one, Frickenhausen, D.
96-Well-Platte (Sequenzer)	-	Beckman Coulter, Brea, US.
CPT-Röhrchen	<i>BD™ Vacutainer™ CPT</i>	Fisher Sci. , Schwerte, D.
Serologische Pipetten	<i>Serological Pipet FALCON®</i>	Corning Inc., New York, US.
H ₂ O	<i>Ampuwa®</i>	Fresenius Kabi, Bad Homburg, D.
Pipettenspitzen 10, 1000 µl	<i>Tip One®, Ultra Point Graduated Tip</i>	STARLAB, Hamburg, D.
Pipettenspitzen 1000, 100 und 10 µl (TR-FRET)	<i>epT.I.P.S.® Reloads</i>	Eppendorf, Hamburg, D.
Pipettenspitzen 200 µl	<i>Tip One®, Ultra Point Graduated Tip</i>	STARLAB, Hamburg, D.
Zell-Schaber	<i>Cell Scraper 1/Pack steril</i>	Corning Inc., New York, US.
Zellkulturflasche	<i>T175 Flasks</i>	Thermo Fisher, Roskilde, DK

2.2 Puffer und Lösungen

Tabelle 8: Übersicht der verwendeten Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Bestandteile
100 mM Na-EDTA	-
3 M Na-Acetat (pH 5,2)	-
6x Ladepuffer (DNA)	Orange G (10 mg/ml), 15% Ficoll
Detektionspuffer (TR-FRET)	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 400 mM NaF, 0,1% BSA, 0,05% <i>Tween20</i>
DPBS-Puffer	gibco® by life technologies
Lysis-Puffer	1% TritonX100, <i>Complete</i> (in DPBS)
RIPA-Puffer	Tris 50 mM, NaCl 150 mM, SDS 0,1%, SDC 0,5%, TritonX 1%, pH 7,5 + <i>Complete</i> + Phosphatase-Inhibitor <i>PhosphoStop</i>
TBE-Puffer 1x	Tris Base 89 mM, Borsäure 89 mM, EDTA-Na ₂ 2 mM
Zell-Medium	gibco® by life technologies
Zellkultur-Medium mit Zusatz	10% FCS, 1% Antibiotikum (in DMEM)

2.3 Chemikalien, Enzyme und Oligonukleotide (Primer)

Tabelle 9: Übersicht der Verwendete Reagenzien

Name	Hersteller
2-Propanol 100%	VMR Chemicals, Darmstadt, D.
5 M <i>Betaine Solution</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, US.
<i>Biocoll Separating Solution</i>	Biochrom GmbH
Bradford-Reagenz	Bio-Rad, München, D.
Complete Mini, EDTA-free	Roche Diagnostics, Mannheim, D.
DNA Size Standard-600	GenomeLab SCIEX, Darmstadt, D.
Ethanol 100%	VMR Chemicals, Darmstadt, D.
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, St. Louis, US.
PCR Grade Nucleotide Mix (dNTPs)	Roche Diagnostics, Mannheim, D.
pegGOLD DNA Ladder-Mix	peQlab, Erlangen, D.
Primer (vgl. Tabelle 10)	Metabion international AG, Planegg, D.
Pwo-DNA-Polymerase	peQlab, Erlangen, D.
<i>Q-Solution</i>	Qiagen, Hilden, D.
SeaKern® LE Agarose	Lonza, Basel, CH.
Taq DNA Polymerase	Qiagen, Hilden, D.
TritonX-100	Roth, Karlsruhe, D.
Tween20	Sigma-Aldrich, St. Louis, US.

Tabelle 10: Übersicht der verwendeten Primer von Metabion (10 pmol je PCR)

Gen	Primer Bezeichnung	Sequenz 5' - 3'	Größe PCR-Produkt
ATXN3	P290_MJD1VSR	TACTAGAGCTTATTTGCCAG	221 bp
	P291_mjd/§\$r	CAGAGCCCTCTGCAAATCCT	
	R478_MJD_Ex10-R-S	GGTACTGCTCCTTAATCCAGGG	405 bp
	R479_MJD52	CCAGTGACTACTTTGATTTCG	
PARK2	P239_Parkin_Ex4_F1	AAAGGCCCTGTCAAAGAGT	126 bp
	P240_Parkin_Ex4_R2	TCATTTTCCTGGCAGTCTCA	
	P241_Parkin_Ex10_F1	CTGCCGGGAATGTAAAGAAG	163 bp
	P242_Parkin_Ex10_R1	GGA ACTCTCCATGACCTCCA	
	P243_Parkin_Ex11_F2	CCGACGTACAGGGAACATAAA	215 bp
	P244_Parkin_Ex11_R1	CTGCTCAGCACAGACTCACC	
ATXN3	P248_SCA3_R	TGGCCTTTCACATGGATGTGAA	
	P247_PolyQ_F	CCAGTGACTACTTTGATTTCG	

2.4 Antikörper

Tabelle 11: Übersicht der Antikörper und der zugehörigen Proteine für TR-FRET Analysen

Antikörper-Bezeichnung	Kürzel	Protein	Primär-Sequenz	Bezugsquelle
Anti-Spinocerebellar Ataxia Type 3 Antibody, clone 1H9	1H9-tb	Ataxin-3 PolyQ exp.	EANDGSGMLD EDEEDLQRAL	Millipore MAB5360
MW1	MW1-D2	Ataxin-3 PolyQ exp.	QQQKQQQQQQ (>15Q)	Study Hybridoma Bank
Anti-Polyglutamine-Expansion Diseases Marker Antibody, clone 5TF1-1C2	1C2-D2	Ataxin-3 PolyQ exp.	QQQKQQQQQQ[...] (>37Q)	Millipore MAB1574

2.5 Hersteller Kits

Tabelle 12: Übersicht der genutzten Hersteller-Kits

Name	Hersteller
10x Reactionbuffer complete	Sigma-Aldrich, St. Louis, US.
FlexiGen DNA Kit	Qiagen, Hilden, D.
GenomeLab DTCS – Quick Start Kit	Beckman Coulter, Brea, US.
PCR Buffer, 10x	Roche Diagnostics, Mannheim, D.
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, DK.
Qiagen Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, D.

<i>Qiagen Purification Kit</i>	Qiagen, Hilden, D.
<i>QIAprep® Spin Miniprep Kit</i>	Qiagen, Hilden, D.
<i>Separation Buffer 30 ml</i>	Beckman Coulter, Brea, US.
SLS-Puffer	Beckman Coulter, Brea, US.

2.6 Herkunft der Blutproben und Patientenauswahl in ESMI

Die bearbeiteten Blutproben stammen von Patienten mit diagnostizierter Spinozerebellärer Ataxie Typ 3 oder von präsymptomatischen Mutationsträgern. Die Gruppe präsymptomatische Mutationsträger umfasst Patienten, bei denen das Krankheitsbild noch nicht klinisch manifest ist, die Mutation aber diagnostiziert wurde. Zudem wurden jeweils Kontrollprobanden akquiriert, deren Blut auf die gleiche Art und Weise aufbereitet wurde. Die Studie wurde durch die lokale Ethik-Kommission (Nr. 598/2011B01) genehmigt. Das bereits in der Einleitung beschriebene ESMI-Projekt sammelt die Blutproben in den jeweiligen Zentren (Tübingen, Bonn, London, Coimbra). Die verwendeten Proben aus Tübingen stammen von Patienten der *Ataxie-Ambulanz* unter der Leitung von Prof. Dr. Schöls. Das gemeinsame ESMI-Protokoll sieht vor, dass parallel zu der Untersuchung und Blutabnahme von SCA3 Patienten nach Möglichkeit immer ein Kontrollproband gewonnen wird. Dies kann ein gesunder Verwandter, Mitarbeiter oder eine Begleitperson sein. In der hier präsentierten Kohorte stammen die meisten Kontrollen aus den Zentren Tübingen und London.

2.7 Molekularbiologische Methoden

2.7.1 DNA Isolation

Die Gewinnung der DNA aus 1 ml EDTA-Blut der Patienten und Kontrollen erfolgte durch eine Ethanol-Fällung mittels des *FlexiGen DNA Kits*. Dabei wurden die Herstellerangaben wie folgt modifiziert: 1 ml Blutprobe wird bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut, gut durchmischt und in einem 15 ml Falcon mit 2,5 ml des im Kit enthaltenen FG1-Puffers versehen. Es erfolgt ein sofortiges 5-faches Invertieren des Röhrchens und anschließend eine Zentrifugation aller Proben für 10 min bei 3000 g. Der Überstand wird abgossen und das Pellet 2 min bei

Raumtemperatur (RT) getrocknet. Anschließend wird das Pellet in 0,5 ml FG2-Protease-Mix (nach Herstellerangabe vorbereitet) gelöst und die Probe für 10 min bei 65 °C im Wasserbad inkubiert, wobei ein Farbumschlag von klar zu grün erfolgt. Die Probe wird mit 0,5 ml 100% Isopropanol versehen und mehrmals langsam invertiert. Das ausgefallene weiße DNA-Pellet wird mit der Pipette aufgenommen, in einem vorbereiteten 1,5 ml *Tube* mit 0,5 ml 70% Ethanol gewaschen und anschließend in einem sauberen leeren *Tube* 5 min luftgetrocknet. Abschließend wird das Pellet in 100 µl FG3-Puffer des Kits gelöst und für 12 h bei 65 °C und 650 rpm im *Thermomixer* resuspendiert. Der DNA-Gehalt wird per µ-Cuvette photometrisch bestimmt und die Probe bei -20 °C gelagert. Diese ist das Ausgangsprodukt für die Polymorphismen Bestimmung und die CAG-Repeat Längenbestimmung.

2.7.2 PCR zur Analyse von bekannten Polymorphismen

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist ein thermozyklisches Verfahren, welches zur Vermehrung eines bestimmten DNA-Abschnittes genutzt werden kann (Mullis et al., 1992). Die DNA der Patienten wurde bei Konzentrationen unter 20 ng/µl unverdünnt in die entsprechende PCR eingesetzt. Zur Vervielfältigung der DNA-Abschnitte, welche die zu untersuchenden Polymorphismen beinhalten, wurden verschiedene PCR-Ansätze und Thermocycler-Programme genutzt (vgl. *Tabelle 13,14*). Die Effektivität der PCR wurde stets mittels einer Gelelektrophorese überprüft (vgl. 2.7.4 *Gelelektrophorese*).

Tabelle 13: Übersicht Basis der Mastermixe

Für die Detektion der Polymorphismen im *PARK2* Gen (rs1801474 , rs1891582 und rs1801334) wird der Ansatz in Spalte 2 genutzt. Ansatz „A⁶⁶⁹/G⁶⁶⁹“ wird für den SNP A⁶⁶⁹TG/G⁶⁶⁹TG (rs1048755) in Spalte 1 genutzt, während die beiden SNPs hinter dem PolyQ-Trakt „G⁹⁸⁷/C⁹⁸⁷“ C⁹⁸⁷GG/G⁹⁸⁷GG (rs12895357) und „C¹¹¹⁸/A¹¹¹⁸“ TAA¹¹¹⁸/TAC¹¹¹⁸ (rs7158733) mit dem Ansatz in Spalte 3 analysiert werden.

ATXN3: A⁶⁶⁹/G⁶⁶⁹	PARK2 Polymorphismen	ATXN3: G⁹⁸⁷/C⁹⁸⁷, C¹¹¹⁸/A¹¹¹⁸
14,3 µl H ₂ O	13,3 µl H ₂ O	23,7 µl H ₂ O
2 µl 10x Puffer	2 µl 10x Puffer	3 µl Puffer Complete
1 µl Primer 290	1 µl Primer F	0,7 µl Primer R478
1 µl Primer 291	1 µl Primer R	0,7 µl Primer R479
0,5 µl dNTPs	0,5 µl dNTPs	0,5 µl dNTPs
0,2 µl Taq (Qiagen)	0,2 µl Taq (Qiagen)	0,25 µl Pwo Taq
1 µl DNA	2 µl DNA	1,5 µl DNA

Tabelle 14: Übersicht der PCR-Zyklen und Temperaturen

ATXN3: A ⁶⁶⁹ /G ⁶⁶⁹			PARK2 Polymorphismen			ATXN3: G ⁹⁸⁷ /C ⁹⁸⁷ , C ¹¹¹⁸ /A ¹¹¹⁸		
94°C	5min		95°C			94°C		
94°C	1min	x30	95°C	30sec	touch down	94°C	30sec	touch down
56°C	1min		65-55°C	30sec		65-55°C	30sec	
72°C	1min		72°C	30sec	68°C	45sec		
72°C	5min		95°C	30sec	94°C	30sec		
			55°C	30sec	55°C	30sec		
10°C	∞		72°C	30sec	68°C	45sec		
			72°C	7min	68°C	5min		
			10°	∞	10°C	∞		

2.7.3 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist ein Standardverfahren zur Auftrennung verschiedener Substanzen wie DNA oder RNA mittels einer angelegten elektrischen Spannung in einem Trennmedium, wie beispielsweise das hier verwendete Agarosegel. Auf diese Art können die Effizienz der PCR sowie die Länge des entstandenen Produktes überprüft werden. Für derartige Kontrollgele wird jeweils ein 1% Agarosegel mit TBE-Puffer angefertigt und mit 5 µl Ethidiumbromid versehen. Es werden jeweils 5 µl DNA-Probe und 5 µl 6x Ladepuffer pro Kammer geladen, sowie einmalig je Gel der Marker pegGOLD DNA Ladder-Mix (vgl. Tabelle 9). Für die PCR-Produkte aus dem Reaktionsansatz für Polymorphismen hinter dem PolyQ-Trakt, wird das gesamte PCR-Produkt mit jeweils 10 µl 6x Ladepuffer versetzt und komplett auf das Gel geladen. Die angelegte Spannung beträgt im großen Gel bei 120 V, im kleinen Gel 90 V.

2.7.4 PCR Aufreinigung

Bei erfolgreicher Amplifizierung der PCR-Produkte von SNP „A⁶⁶⁹/G⁶⁶⁹“, sowie den drei Polymorphismen im *PARK2* Gen, wird die jeweilige PCR-Probe mittels dem *Qiagen PCR Purification Kit* gemäß der Herstellerangaben aufgereinigt. Das gereinigte PCR-Produkt wird mittels Elektrophorese erneut überprüft (vgl. 2.7.4

Gelelektrophorese). Bei den PCR-Produkten für die Polymorphismen im *ATXN3* Gen hinter dem *CAG-Repeat* wird eine Auftrennung der beiden Allele (WT und expandiert) im Gel erzielt und die Banden müssen aus dem Gel extrahiert werden. Das Ausschneiden der Banden aus dem Gel erfolgt auf einem UV-Lichttisch. Die Gelschnitte werden mittels Präzisionswaage gewogen und anschließend erfolgt die Extraktion der DNA aus dem Gel unter Verwendung des *Qiagen Gel Extraction Kit* und Beachtung des Herstellerprotokolls. Nach erfolgter Aufreinigung wird ebenfalls ein Kontrollgel angefertigt und die Ausbeute quantifiziert. Die Proben werden anschließend bei -20 °C gelagert, bis sie zur Sequenzierung genutzt werden.

2.7.5 Sequenzierung

Für die Bestimmung der Basenabfolge der DNA-Sequenz wird das etablierte Verfahren des Kettenabbruchs nach Sanger genutzt (Sanger und Coulson, 1975). Zunächst wird dabei das Verfahren der PCR genutzt, um im Sequenzierungsansatz die fluoreszenz-markierten DNA-Abschnitte für die Sequenzierung herzustellen. Der schematische Ablauf ist anhand eines Schaubildes illustriert (*vgl. Anhang 3*). Eine Besonderheit besteht darin, dass nur ein Primer benötigt wird. Es wird das *GenomeLab DTCS – Quick Start Kit* genutzt und der Reaktionsansatz für jeweils jeden der verschiedenen DNA-Abschnitte anders gewählt (*vgl. Tabelle 15*). In der Regel zeigte der Rückwärts-Primer gute Ergebnisse, bei dem Ansatz „G⁶⁰¹/A⁶⁰¹“ hingegen nutzt man beide Primer, weswegen hierfür zwei verschiedene Ansätze je Probe gewählt werden. Die DNA wird je nach Stärke der Kontrollbande im vorherigen Kontrollgel im Verhältnis 5:6, 8:3 oder 11:0 mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 11 µl gebracht. Ansonsten gelten Zyklen-Anzahl und Temperaturen für alle Ansätze gleichermaßen (*vgl. Tabelle 16A*) und das Produkt wird bis zur Sequenzierung bei 4 °C lichtgeschützt gelagert. Das Produkt der Sequenzier-PCR wird mittels eines Stopp-Mixes (*vgl. Tabelle 16B*) fixiert und anschließend in mehreren Zentrifugationsschritten gewaschen und vorbereitet. Zu 10 µl Probe werden in UV-geschützten Reaktionsgefäßen 15,5 µl des Stopp-Mixes und 60 µl eisgekühlter Ethanol 100%

gegeben. Der erste Zentrifugationsschritt erfolgte bei maximaler Rotation für 30 min bei 4°C. Der Durchfluss wird entsorgt und das Pellet mit 190 µl Ethanol 70% gewaschen. Erneute Zentrifugation erfolgt für 20 min. Der Vorgang wird mit 90 µl Ethanol 70% wiederholt und erneut für 15 min zentrifugiert. Es schließt sich eine Trocken-Zentrifugation im Vakuum-Trockner (*SpeedVac*) für 12 min bei 30 °C an. Das Pellet wird in 42 µl SLS-Puffer resuspendiert und für über eine Stunde bei RT inkubiert. Je Probe werden 40 µl der Resuspension auf die Sequenzer-Platte geladen, mit Mineral Öl benetzt und anschließend mit dem Programm LFR-b (vgl. *Abbildung 10*) sequenziert. Die Auswertung erfolgt mittels der GenomeLab System Software (vgl. *Tabelle 6*).

Tabelle 15: Übersicht der Sequenzier-PCR-Ansätze

ATXN3: A ⁶⁶⁹ /G ⁶⁶⁹	ATXN3: G ⁹⁸⁷ /C ⁹⁸⁷ , C ¹¹¹⁸ /A ¹¹¹⁸	PARK2: G ⁶⁰¹ /A ⁶⁰¹	PARK2: G ¹²³⁹ /C ¹²³⁹	PARK2: G ¹²⁸¹ /A ¹²⁸¹
3µl Quickstart	4µl Quickstart	3µl Quickstart	3µl Quickstart	3µl Quickstart
3µl Betain	4µl Q-Solution	3µl Betain	3µl Betain	3µl Betain
1,2µl Primer F (P291)	1µl Primer R (R478)	1,2µl Primer F/R (P239/P240)	1,2µl Primer R (P242)	1,2µl Primer R (P244)

Tabelle 16: A) Cycler-Programm für Sequenzierung-PCR B) Ansatz Stopp-Mix

Sequenzierungs-PCR			Stopp-Mix	
98°C	3min	nur DNA	1,1 µl	Glycogen
96°C	20sec	x31	2,2 µl	3M Na-Acetat pH 5,2
58°C	25sec		2,2 µl	100mM Na-EDTA
60°C	4min		10µl	H ₂ O
10°C	∞			

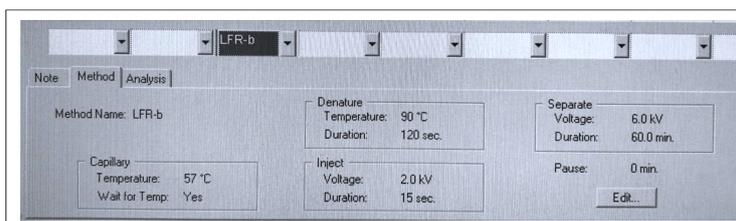


Abbildung 10: Programmeinstellung LFR-b für die Sequenzierung

2.7.6 Einheitliche Bestimmung der CAG-Repeat-Längen mittels PCR und Fragment-Längenanalyse

Zur Bestimmung der CAG-Repeat-Längen der Patienten und Kontrollen wird DNA, welche bereits durch die Zentren oder in Eigenarbeit aus EDTA-Blut

extrahiert wurde, genutzt (vgl. 2.7.1 DNA Isolation). Die PCR mit fluoreszenzmarkiertem Vorwärts-Primer (P247) und Rückwärts-Primer (P248) (vgl. Tabelle 10) wird unter lichtarmen Bedingungen, gemäß der in Tabelle 17 verzeichneten Daten, durchgeführt. Das PCR-Produkt wird zunächst auf ein Verhältnis von 1:200 verdünnt und dann je Probe mit 34,5 µl SLS Puffer und 0,5 µl Marker DNA Size Standard-600 versetzt auf die Platte gegeben. Die Auswertung zur Bestimmung der Länge des CAG-Konstrukts erfolgt mittels der GenomeLab System (vgl. Abbildung 11).

Tabelle 17: A) Basis für Mastermix B) Cycler-Programm

PCR Ansatz Fragmentanalyse	Fragmentanalyse PCR		
11,4 µl H2O			
2 µl 10x Puffer	94°C	5min	
4 µl Q-Solution			
0,4 µl dNTPs	94°C	60sec	x30
2 µl P248	60°C	60sec	
2 µl P247	72°C	120sec	
2 µl taq	72°C	10min	
0,2 µl taq			
2 µl DNA	10°C	0	

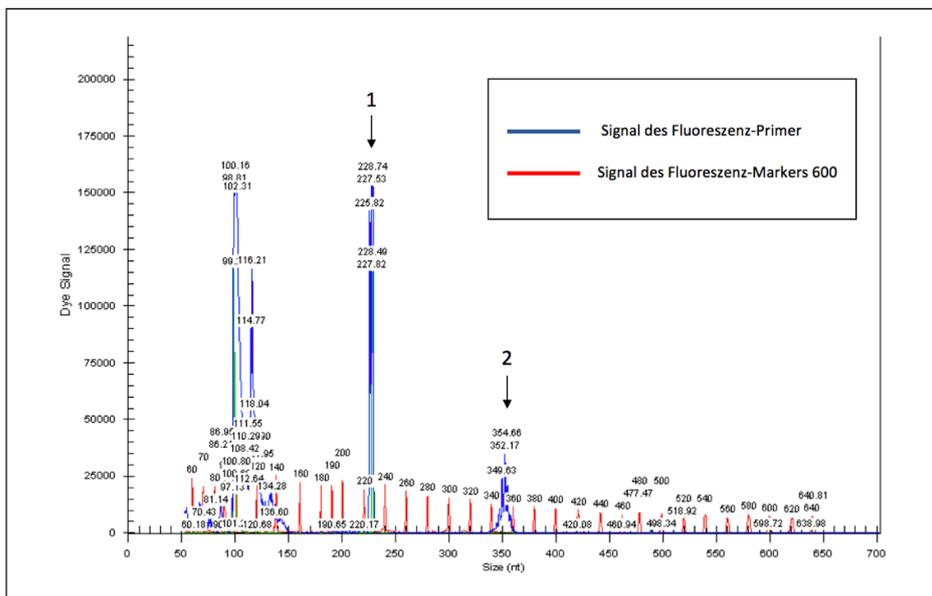


Abbildung 11: Exemplarische Darstellung einer Analyse der CAG-Repeat Längenbestimmung

Entscheidend sind die mit Pfeilen gekennzeichneten Peaks 1 + 2: Peak 1 entstammt dem wildtypischen Allel, welches zuverlässiger repliziert wird, resultierend in einem hohen schmalen Peak. Peak 2 entstammt dem expandierten Allel: Aufgrund der, durch den exp. PolyQ-Trakt erschwerten, Elongation der PCR, entstehen Produkte leicht variierender Längen, wodurch der Peak eine breitere Auffächerung aufweist. Zur Berechnung der CAG-Repeat-Länge wird der jeweils maximale Ausschlag betrachtet und von der entsprechenden Produktlänge (hier 228,74 und 354,66) 159 Basen subtrahiert. Das Ergebnis wird durch 3 gemäß des Basentriplettes geteilt. Somit ergibt sich hier eine CAG-Anzahl von 23 (WT) und 65 (exp. Allel).

2.8 Zellbiologische Methoden

Alle Arbeiten mit zellbiologischem Material wurden im Zellkulturlabor unter den dort geltenden Sicherheits- und Hygienemaßnahmen ausgeführt.

2.8.1 Blutabnahme

Die Blutabnahme erfolgte nach den in ESMI geltenden Richtlinien des gemeinsamen Protokolls in den jeweiligen Zentren. Für die Proteinanalyse werden dem Standort Tübingen jeweils pro Patient oder Kontrolle ein CPT-Röhrchen zur Verfügung gestellt. Das Blut wird hierfür allerdings im jeweiligen Zentrum zuvor schon nach einem gemeinsamen Protokoll bearbeitet und die PBMCs extrahiert. Der genaue Ablauf ist in Abschnitt 2.8.2 *Extraktion der PBMCs aus Blutproben*, dargestellt. Die Blutabnahme erfolgt nach standardisiertem Verfahren durch Venenpunktion, wobei die Patienten nach Möglichkeit nüchtern sind. Das Blut sollte innerhalb von zwei Stunden nach Abnahme aufbereitet werden. Abweichungen im Ablauf werden vermerkt. Für die DNA-Gewinnung für eine Fragmentlängenanalyse wird 1 ml EDTA-Blut bereitgestellt. Die zugehörige Aufbereitung ist im Kapitel 2.7.1. *DNA Isolation* beschrieben.

2.8.2 Extraktion der PBMCs aus Blutproben

Gemäß dem ESMI Protokoll wird die CPT-Blutprobe bei RT 30 min bei 1700 rcf (*relative centrifugal force*) ohne Bremse zentrifugiert. Es bildet sich im Röhrchen ein Gradient mit mehreren Schichten, wobei von oben betrachtet Plasma, PBMCs, Gel-Barriere und am Boden des Röhrchens separiert die Erythrozyten, vorliegen. Das Plasma wird zunächst abgenommen und separat weggefroren. Die PBMCs werden mit einer sterilen Pasteur-Pipette in ein 15 ml Falcon überführt, mit 15 ml DPBS gewaschen und bei RT 15 min bei 300 rcf mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und das Pellet in 3 ml DPBS resuspendiert. Es erfolgt ein zweiter Waschschrift mit 15 ml DPBS und Zentrifugation bei RT 15 min bei 300 rcf und Abnahme des Überstandes. Abschließend wird das Pellet entweder direkt im 15 ml Falcon bei -80 °C

eingefroren (nur Proben aus London) oder es wird in 1 ml DPBS resuspendiert, in Kryo-Röhrchen wie zuvor zentrifugiert, der Überstand abgenommen und trocken bei -80 °C eingefroren. Die Proben werden so gesammelt und anschließend auf Trockeneis nach Tübingen gesendet.

2.8.3 Lyse der PBMCs und Proteingewinnung

Die PBMC Proben werden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, in 1 ml DPBS gelöst und in ein 15 ml Falcon überführt. Das Kryo-Röhrchen wird nochmals mit 1 ml DPBS nachgespült und ebenfalls in den Falcon überführt, um die Materialverluste möglichst zu minimieren. Die Proben werden dann bei RT für 5 min bei 300 rcf zentrifugiert und der Überstand über dem Pellet abgesaugt. Ein erneuter Waschschrift mit 1 ml DPBS und Zentrifugation schließt sich an. Der Überstand wird erneut verworfen und das Pellet auf Eis gelagert. Je nach Größe des gewonnenen PBMC-Pellets werden 50 µl (klein), 75 µl (mittel), 100 µl (groß), oder 150 µl (groß, schwer löslich) des Lysis-Puffer (vgl. *Tabelle 8*) hinzugegeben. Nach anschließender 30-minütiger Inkubation auf Eis mit gelegentlichem vortexen wird das Lysat in Kryo-Röhrchen bei -80 °C weggefroren, nach dem die Gesamtproteinbestimmung und Vorverdünnung (vgl. *Kapitel 2.9 Proteinbiochemische Methoden*) erfolgt sind. Die Original Lysate wurden nach Möglichkeit nicht häufiger als ein Mal aufgetaut.

2.8.4 Transfektion von HEK-Zellen zur Gewinnung von Ataxin-3

Der verwendete Vektor pEGFP-N1 mit 4738 bp, kodierend für jeweils 15Q, 70Q und 148Q, wurde mittels *Escherichia coli* DH5α vervielfältigt und nach 18 Stunden Inkubation bei 37 °C in LB-Medium aus den Bakterienzellen unter Verwendung des *QIAprep® Spin Miniprep Kit* gemäß Herstellerangaben isoliert. Anschließend wurde der DNA-Gehalt photometrisch quantifiziert. Die HEK-Zellen wurden mit einer *Neubauer* Zählkammer ausgezählt und jeweils 600.000 Zellen pro *Well* auf eine Inkubationsplatte (6-*Well* Platte) aufgebracht und mit Zell-Medium (vgl. *Tabelle 8*) versehen. Nach 24-stündiger Inkubation der Zellen wurde anhand des zellspezifischen *Qiagen Transfection Protocols* der

Transfektions-Ansatz hergestellt: 1,2 µg Plasmid-DNA in 100 µl OptiMEM, sowie 4,5 µl *Attractene Reagent*. Davon werden 104,5 µl mit 1,9 ml Zell-Medium auf die Zellkultur aufgetropft. Nach 24 h erfolgt eine erste Sichtkontrolle der Kolonie unter dem Fluoreszenz-Mikroskop, wobei erfolgreich transfizierte Zellen aufgrund des EGFP-Vektors eine grüne Fluoreszenz aufweisen. Der Vergleich mit der Hellfeldmikroskopie zeigt die Differenz zwischen allen vorhandenen HEK-Zellen und dem transfizierten Anteil (vgl. *Abbildung 12*). Nach 48 Stunden können die Zellen mechanisch mittels Zellschaber vom Plattenboden gelöst und mitsamt dem Zell-Medium abgenommen werden. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation (300 rpm, 5 min) mit resultierendem Pellet am Falcon-Grund, welches mit 5 ml DPBS gewaschen, erneut zentrifugiert und auf Eis gelagert wird.

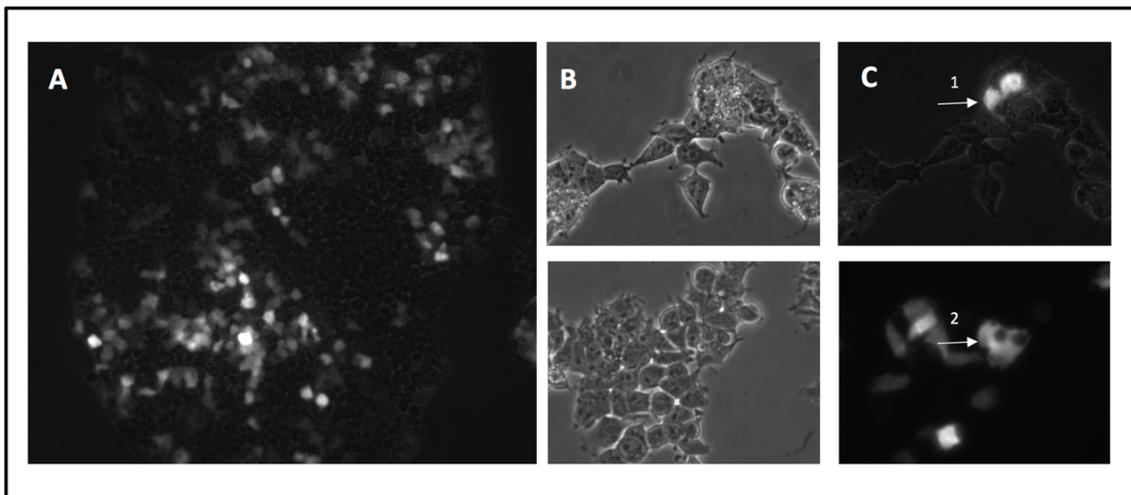


Abbildung 12: Kontrolle der HEK-Zellen 24 h nach Transfektion des EGFP Ataxin-3 unter dem Fluoreszenz-Mikroskop

A) HEK-Zellkolonie in 10x Vergrößerung mit 70Q transfiziert unter Fluoreszenz-Betrachtung: Anhand der grün (in der Abbildung weiß) fluoreszierenden Bereiche wird erkenntlich, welche Zellen das Plasmid aufgenommen haben und das Protein exprimieren. B) HEK-Zellen transfiziert mit 148Q in 40x Vergrößerung mit charakteristischen Zellausläufern in Hellfeld-Betrachtung zur Darstellung aller Zellen in diesem Sichtbereich. C) Entsprechender Bereich zu B, in Fluoreszenz-Betrachtung: Die Verteilung der Fluoreszenz, entsprechend der Verteilung des EGFP-Ataxin-3, kann sich auf die gesamte Zelle (Pfeil 1), nur das Zytoplasma (Pfeil 2) oder nur den Zellkern (nicht in der Abbildung) erstrecken.

Die Lysierung der Zellen erfolgte unter Verwendung von maximal 200 µl Lysis-Puffer (vgl. *Tabelle 8*) je Pellet unter Beachtung dessen verhältnismäßiger Größe. Nach 30-minütiger Inkubation unter wiederholtem vortexen kann das Lysat mit der Bradford-Proteinbestimmung quantifiziert werden und im TR-FRET als Positiv-Kontrolle, sowie für Etablierungs-Versuche, verwendet werden.

2.9 Proteinbiochemische Methoden

2.9.1 Gesamtproteinbestimmung mittels Bradford-Test

Dieses photometrische Verfahren zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen ist auch unter der Bezeichnung *Coomassie-Assay* geläufig, da es auf einer Reaktion mit dem Farbstoff Coomassie-Brillant Blau G-250 beruht (Bradford, 1976). Auf einer 96-Well-Platte wird immer zunächst eine Eichreihe mit bovinem Serumalbumin (BSA) in den Konzentrationen 0, 1, 2, 5, 10, 15 und 20 µg aufgetragen und mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 100 µl gebracht. Von jeder PBMC-Probe werden 5 µl zu 95 µl H₂O gegeben. Jedes Well wird mit 100 µl Bradford-Reagenz (vgl. Tabelle 9) versehen und anschließend wird im Platenlesegerät (vgl. Tabelle 5) die Extinktion in der Software KC4 v3.4 (vgl. Tabelle 6) gemessen. Die Gesamtproteinmenge der Probe wird mittels der linearen Eichgerade in Excel über die Funktion $y = m * x + t$ (m : Steigung, t : y-Achsen-Abschnitt) und der gemessene Extinktion ermittelt. Die Konzentration in µg/µl wird unter Einbeziehung des Gesamtvolumens der Probe und der jeweiligen Vorverdünnung wie folgt berechnet: $\frac{\text{Proteinmenge} * \text{Endvolumen}}{\text{eingetztes Volumen}} / 1000$.

2.9.2 Gesamtproteinbestimmung mittels BCA-Test

Zur weiteren Modifizierung und Etablierung des hier genutzten Verfahrens zur Ataxin-3 Quantifizierung wurden auch Versuche unternommen, die Gesamtproteinmenge mittels des BCA-Tests (Bicinchoninsäure) zu bestimmen (Smith et al., 1985). Hierfür wird das *BCA Protein Assay Kit* (vgl. Tabelle 11) mit dem BSA-Standard aus Kapitel 2.9.1. genutzt. Das Herstellerprotokoll wurde wie folgt modifiziert: Zunächst wird eine Eichreihe analog zu der im Bradford verwendeten BSA-Konzentrationen 0, 1, 2, 5, 10, 15, 20, und 25 µg hergestellt, auf einer 96-Well-Platte pipettiert und mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 25 µl gebracht (BSA Ausgangskonzentration daher nur 0,225 µg/µl). Von den Proben werden 1-5 µl aufgetragen und mit H₂O auf ebenfalls 25 µl aufgefüllt. Sowohl Eichreihe als auch Proben werden im Duplikat pipettiert. Anschließend werden

200 µl BCA-Reagenz (50:1 Gemisch aus Reagenz A und Reagenz B, gemäß Herstellangabe) in jedes befüllte *Well* hinzugegeben und die Platte wird für 30 min bei 37 °C auf dem Heizblock lichtgeschützt inkubiert. Die Messung erfolgt im Plattenlesegerät (vgl. *Tabelle 5*) mit der Software Gen5 (vgl. *Tabelle 6*). Die Auswertung erfolgte mittels einer Excel-Datei, wie in *Kapitel 2.9.1* beschrieben.

2.9.3 Vorverdünnung und Lagerung der Proteine

Die gewonnenen Lysate der PBMCs werden je nach der Größe der zuvor bestimmten Gesamtproteinkonzentration mit dem Lysis-Puffer (vgl. *Tabelle 8*) vorverdünnt. Bei einer Konzentration des puren Lysates unter 2 µg/µl wird die Probe im Verhältnis 1:4, bei höheren Konzentrationen im Verhältnis 1:8 verdünnt. Proben, welche kein Messergebnis über dem Hintergrund im TR-FRET-Verfahren lieferten, wurden pur oder in einer noch höheren Verdünnung eingesetzt. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80 °C und Auftau-Einfrier-Zyklen der puren Original-Proben in Kryo-Röhrchen wurden weitestgehend vermieden.

2.10 Förster-Resonanz-Energietransfer (TR-FRET)

Das TR-FRET-Verfahren, welches bereits in der Einleitung unter 1.5. *TR-FRET in der Proteinbestimmung*, erläutert wird, wird im Zuge dieser Arbeit zur Quantifizierung des vorhandenen Ataxin-3 Gehalts in PBMC-Lysaten genutzt.

2.10.1 TR-FRET in der Ataxin-3 Messung

Nach dem langsamen Auftauen der PBMC-Lysate auf Eis, sowie gründlichem vortexen, werden 5 µl Probe im Duplikat auf eine 384-*Well*-Platte aufgetragen. Neben der zu analysierenden Proben, wird auf jeder Platte der Lysis-Puffer ohne Protein als Hintergrund, (Negativ-Kontrolle) à 5 µl in 2 bis 4 *Wells* pipettiert. Zudem wird aus dem in Kapitel 2.8.4. gewonnenen überexprimiertem Ataxin-3 70Q (EGFP Ataxin-3 in HEK-Zell Lysat) eine 1:20 verdünnte Positiv-Kontrolle hergestellt, welche ebenfalls bei jeder Messung mit analysiert wird.

Der AK-Mix aus Donor und Akzeptor (vgl. *Tabelle 12*) wird für jedes Experiment neu hergestellt: Für den ersten Ansatz wird auf 1 µl Detektionspuffer (vgl. *Tabelle 8*) jeweils 0,0046 µl (0,5 ng aus 108 ng/µl Stock) AK 1H9-tb und 0,0142 µl (3 ng aus 211 ng/µl Stock) AK MW1-D2 zugegeben, wie es bereits von Kathrin Gonsior in ihrer medizinischen Doktorarbeit etabliert wurde. Der im Zuge dieser Arbeit etablierte AK-Mix mit dem Antikörper 1C2, beinhaltet auf 1 µl Detektionspuffer 0,0093 µl (1 ng aus 108 ng/µl) AK 1H9-tb und 0,0076 µl (3 ng aus 393 ng/µl Stock) AK 1C2-D2. Je nach Anzahl der zu messenden Proben, werden 50-120 µl AK-Mix hergestellt und in jedes belegte *Well* wird 1 µl dazu pipettiert. Nach einer erfolgten Kontrollmessung (0 h) im Plattenlesegerät *Multimode Plate Reader EnVision*, wird die Platte mit Alufolie umwickelt, lichtgeschützt bei 4 °C für 24 h inkubiert. Die eigentliche Messung zur Ataxin-3 Bestimmung erfolgt nach dieser Inkubationszeit. Falls bei Experimenten zur Etablierung die Zeiten oder Temperatur der Inkubation verändert wurde, ist dies an den entsprechenden Stellen gekennzeichnet.

2.10.2 Kalkulation der gemessenen Signalwerte

Die gewonnenen Roh-Daten des TR-FRET werden in eine Excel-Datei konvertiert und der Quotient aus den beiden Signalen (für 665 nm und 620 nm) gebildet: $Ratio_{\frac{665}{620}} = \frac{Signal\ Channel\ 2\ (665)}{Signal\ Channel\ 1\ (620)}$. Diesem Signal-Wert wird dann mit folgender Formel (vgl. *Abbildung 8*) vom Hintergrund bereinigt:

$$\Delta F = \frac{Ratio_{\frac{665}{620}}(Probe) - Ratio_{\frac{665}{620}}(Hintergrund)}{Ratio_{\frac{665}{620}}(Hintergrund)} * 100$$

Es ergibt sich die Signalstärke ΔF über dem Hintergrund in %. Dieser Wert wird für die genauere Quantifizierung des Ataxin-3 Gehalts noch auf den bestimmten Gesamtproteingehalt (vgl. *Kapitel 2.9.1 Gesamtproteinbestimmung mittels Bradford-Test*) korrigiert, um ΔF_c zu erhalten. Somit wird berücksichtigt, dass jedes Pellet unterschiedlich groß ist und die gewonnene Proteinmenge zwischen den Proben variiert: $\Delta F_c = \frac{\Delta F}{Gesamtproteingehalt\ (Bradford)\left[\frac{\mu g}{\mu l}\right]}$.

2.10.3 Statistische Auswertung und graphische Darstellung der Daten

Zur Auswertung der Daten und der graphischen Darstellung wird das Programm GraphPad PRISM (vgl. Tabelle 6) genutzt. Da keine Normalverteilung im Datensatz vorliegt, wird der nicht parametrische Mann-Whitney-Test genutzt, um die erstellten Untergruppen untereinander zu vergleichen. Zudem wird die lineare Regression genutzt, um lineare Zusammenhänge zu untersuchen. Die multivariate Regressionen mit 3 Variablen wird mittels dem Programm R durchgeführt.

Statistische Signifikanz wird mittels des p -Wertes dargestellt und mit der folgenden Einteilung anhand von Sternchen im Graph angezeigt: $p= 0,05$ bis $0,01$ (*), $p= 0,01$ bis $0,001$ (**), $p= 0,001$ bis $0,0001$ (***) und $p < 0,0001$ (****). Zur graphischen Darstellung verwendete Box-Blot Diagramme zeigen den Mittelwert sowie das 95%-Perzentil an. In den Punkt-Wert-Darstellungen sind lineare Regressionsgeraden oder die Verteilung des Mittelwerts und der Standardabweichung eingezeichnet. Statistisch signifikante lineare Zusammenhänge ($p > 0,05$) werden mit einer grünen Gerade gekennzeichnet, während nicht signifikante Zusammenhänge mit rot markiert sind.

3 Ergebnisse

3.1 Verfahren der Datenerhebung und Fragestellungen

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse in drei Teilen präsentiert: Teil A präsentiert die Ergebnisse der Etablierungs- und Vorversuche. Hier verwendete Materialien und Methoden werden direkt beim jeweiligen Versuchsergebnis angeführt. Teil B zeigt die analysierten Zusammenhänge der Ataxin-3 Proteinmessungen in PBMCs korreliert zu den klinischen Daten der Probanden, während in Teil C die Ergebnisse der Messungen mit den analysierten CAG-Repeat-Längen und Polymorphismen korreliert werden. Da die Kohorten in Teil B und C sich jeweils leicht unterscheiden, ist zu Beginn des jeweiligen Unterkapitels die zu Grunde liegende Kohorte dargestellt. Grund hierfür ist, dass uns nicht von jedem Probanden alle Biomaterialien zur Verfügung gestellt werden konnten, bzw. einige Analysen fehlgeschlagen sind. Der labortechnische Arbeitsablauf zur Datenerhebung von Teil B und C ist im folgenden Schaubild zusammengefasst und verweist an gegebener Stelle auf den Methodenteil (vgl. *Abbildung 13*).

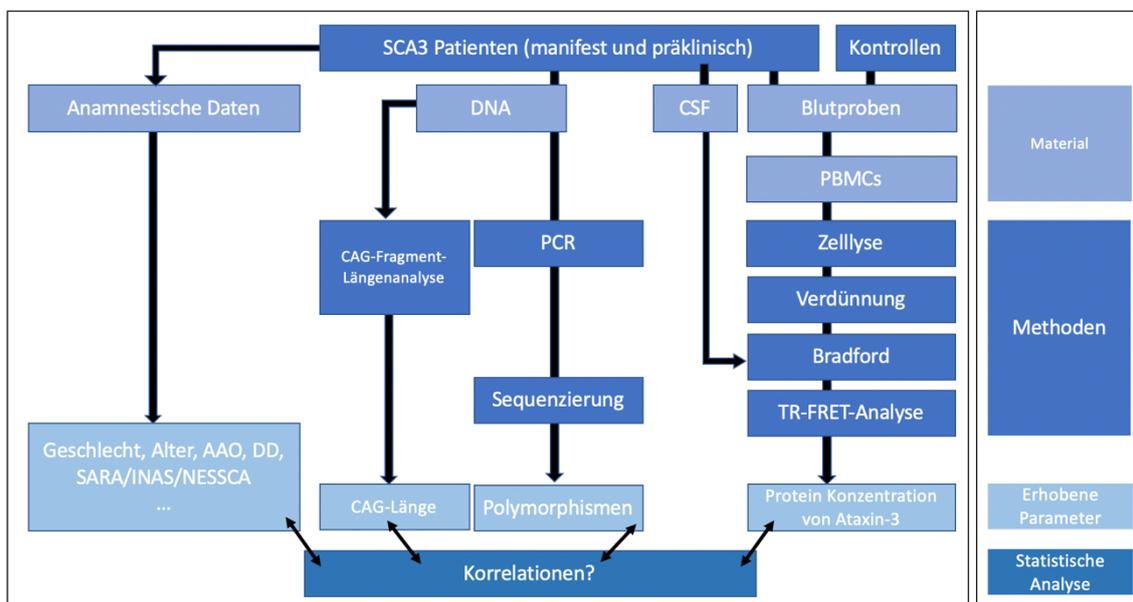


Abbildung 13: Übersicht des Workflows der Verfahren, geordnet nach der Zielführung zum jeweiligen erhobenen Parameter

Fragestellungen, welche im Zuge dieser Arbeit in den folgenden Kapiteln 3.2, 3.3 und 3.4 (entsprechend **Ergebnisse Teil A, B** und **C** untersucht werden sollen, sind:

- Ist die Detektion des expandierten Ataxin-3 Proteins mittels des TR-FRET Assay mit dem Polyglutamin-spezifischen Antikörper 1C2-D2 möglich? (**A**)
- Wie unterscheiden sich die Proteinmessungen mittels des MW1-D2 bzw. 1C2-D2 Antikörpers in den Messungen gleicher Patienten-Proben? (**A, B**)
- Wie reproduzierbar sind die Messungen mittels des etablierten TR-FRET Assays? (**A**)
- Sind Modifikationen des TR-FRET Assays (z.B. Temperatur, veränderte Inkubationszeiten etc.) sinnvoll? (**A**)
- Welches Verfahren sollte zur Gesamtproteinbestimmung der PBMC-Proben genutzt werden? (**A**)
- Kann der TR-FRET Assay auch in anderen biologischen Geweben (Fibroblasten, induzierte pluripotente Stammzellen, Plasma, Cerebrospinalflüssigkeit etc.) angewendet werden? (**A**)
- Bestehen Korrelationen zwischen der gemessenen Ataxin-3 Proteinmenge in PBMCs und klinischen Parametern? (**B**)
- Kann Ataxin-3 somit als Biomarker in der SCA3 Erkrankung fungieren? Bei welchen Fragestellungen könnte es vielversprechend sein? (**B**)
- Nehmen bekannte Polymorphismen oder die *CAG-Repeat*-Länge im *ATXN3* Gen Einfluss auf die Ataxin-3 Protein Messungen? (**C**)
- Welche weiteren Experimente und Studien wären ergänzend sinnvoll?

3.2 Teil A: Etablierung der TR-FRET Messung für expandiertes Ataxin-3

3.2.1 Etablierung des Antikörpers 1C2-D2 als Messparameter für Polyglutamin-expandiertes Ataxin-3 Protein

Bisherige Messungen des expandierten Ataxin-3 Proteins mittels des TR-FRET Assays wurden mit den Antikörpern MW1-D2 und 1H9-tb durchgeführt. MW1-D2 bindet an Polyglutamin-Bereiche mit mehr als 15 Glutaminen (Q). Somit werden nicht ausschließlich das pathologische Ataxin-3 Protein, sondern auch Anteile des nicht-expandierten Proteins detektiert. Um die Detektion auf möglichst nur das expandierte Ataxin-3 Protein zu beschränken, sollte versucht werden, mittels des 1C2-D2 Antikörpers, welcher erst ab 37Q spezifisch bindet, den bestehenden TR-FRET Assay zu modifizieren.

Zur Etablierung der geeigneten Antikörper Konzentrationen von 1H9-tb und 1C2-D2 wurde in HEK239T-Zellen überexprimiertes Ataxin-3 mit 15Q (*Abbildung 14A*), 70Q (*Abbildung 14B*) und 148Q (*Abbildung 14C*) getestet. Es wurden jeweils neun Kombinationen verschiedener Konzentrationen an 1C2-D2 (10; 3; 1 ng) und 1H9-tb (0,3; 0,5; 1 ng) Antikörper zugesetzt und in Duplikaten gemessen. Diese Angaben der verschiedenen möglichen Konzentrationen von Donor und Akzeptor zueinander sind bereits aus früheren TR-FRET Etablierungen für Protein-Messungen in der SCA3 Erkrankung, Morbus Parkinson und Chorea Huntington bekannt (Bidinosti et al., 2012, Nguyen et al., 2013, Weiss et al., 2012). Erste Messungen ergaben, dass der ΔF -Wert für das überexprimierte Ataxin-3 mit 70Q insgesamt am höchsten war. Die drei Kombinationen, aus verschiedenen untersuchten 1H9-tb und 1C2-D2 Konzentrationen, die das deutlichste Signal in der Messung der Ataxin-3 70Q-Probe lieferten, sind zusammenfassend im Säulendiagramm D dargestellt. Hier wird ersichtlich, dass die mit Sternchen (*) gekennzeichnete Kombination von 1 ng/Well 1H9-tb und 3 ng/ μ l 1C2-D2 sowohl das Ataxin-3 Protein mit 70Q als auch das mit 148Q sicher detektierte (ΔF über 100). Zudem stellt diese Kombination die beste Abstufung zu Kontrollen mit 15Q (ΔF unter 50) dar. Folglich wird diese Kombination in allen folgenden Experimenten und Messungen verwendet werden.

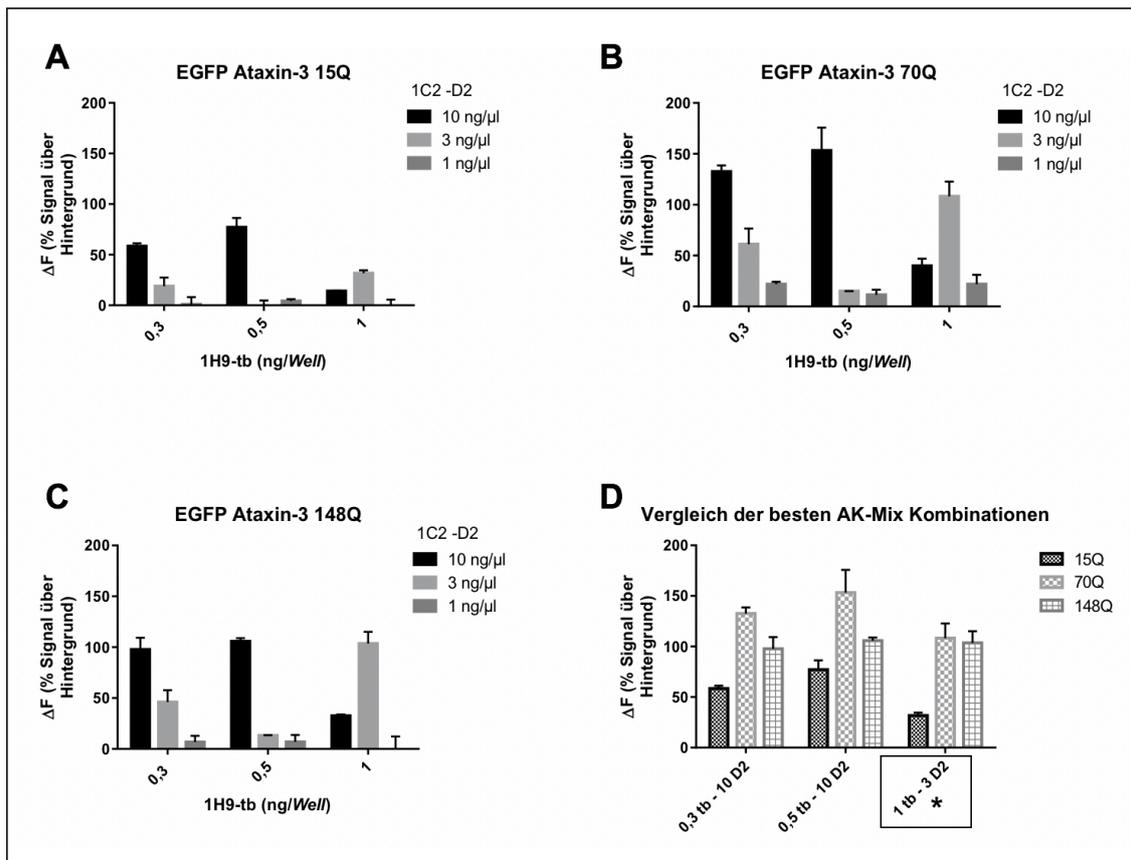


Abbildung 14: Testung verschiedener Antikörper-Mix Kombinationen

Säulendiagramme zeigen die gemessenen ΔF -Werte für die verschiedenen eingesetzten Konzentrationen an 1C2-D2 und 1H9-tb Antikörper. Die Standardabweichung zeigt den Unterschied des gemessenen Duplikats. Bei Diagramm A) und C) sind für jeweils Proben mit Ataxin-3 von 15Q und 148Q die Messwerte mit ΔF -Werten von maximal 100 kleiner, als bei B) Ataxin-3 70Q mit ΔF -Werten von bis zu 150. D) zeigt die Zusammenstellung der vielversprechenden AK-Mix Kombinationen, welche für Ataxin-3 70Q das höchste Signal ergeben haben. Die mit (*) markierte Kombination zeigt die beste Unterscheidung zur 15Q Kontrolle bei gleichwertiger Detektion von 70 und 148Q. AK= Antikörper, EGFP= *enhanced green fluorescent protein*

In einem weiteren Experiment wurde der Unterschied zwischen der Detektion mittels MW1-D2 und 1C2-D2 jeweils in Kombination mit 1H9-tb überprüft (vgl. *Abbildung 15*). Da der Antikörper 1C2 erst ab einer Anzahl von 37Q spezifisch bindet, ist eine deutlich höhere Trennschärfe bei der Detektion von nicht-expandiertem Ataxin-3 Protein und dem pathologischen Ataxin-3 Protein zu erwarten. Die Nutzung dieses Antikörpers ermöglicht wahrscheinlich somit eine (beinahe) ausschließliche und dadurch präzisere Bestimmung der expandierten Ataxin-3 Protein-Level. Zudem sollte mit diesem Experiment validiert werden, dass auch in den humanen Biomaterialien, in welchen kein überexprimiertes

Ataxin-3, sondern nur endogene Protein-Level vorliegen, die ermittelten Antikörper Konzentrationen wirksam sind.

Es wurden PBMC-Lysate von früheren Patienten und Kontroll-Proben aus dem *NeurOmics* Projekt (ehemals bearbeitet von Kathrin Gonsior) verwendet. Jeweils 5 Patienten und 5 Kontrollen wurden auf der selben Platte analysiert. Das Verhältnis des gemessenen Polyglutamin-expandierten Ataxin-3 Proteins stimmte bei beiden verwendeten Antikörpern (MW1 vgl. *Abbildung 15A*, 1C2 vgl. *Abbildung 15B*) für die jeweilige gemessene Probe überein: Patienten-Probe 5 zeigte bei beiden Antikörper-Gemischen den höchsten Messwert, Probe 3 den geringsten. Bei den Kontrollen zeigte sich, dass mit dem MW1-D2 Antikörper Kontrollen mit ΔFc -Werten von bis zu 40 deutlich stärker erkannt werden, als bei Messungen mit dem 1C2-D2 Antikörper (ΔFc unter 10). Der Versuch wurde auch mit anderen Antikörper-Kombinationen (0,3 bzw. 0,5 ng 1H9-tb mit 10 ng 1C2-D2) für den 1C2-D2 durchgeführt (Graphen nicht abgebildet), aber es konnte keine bessere Trennung zwischen Kontrollen und Patienten erreicht werden, als der bereits etablierten Konzentration von 3 ng 1C2-D2 und 1 ng 1H9-tb. In allen Folgeversuchen und Messungen wird somit die Konzentration von 3 ng 1C2-D2 und 1 ng 1H9-tb verwendet.

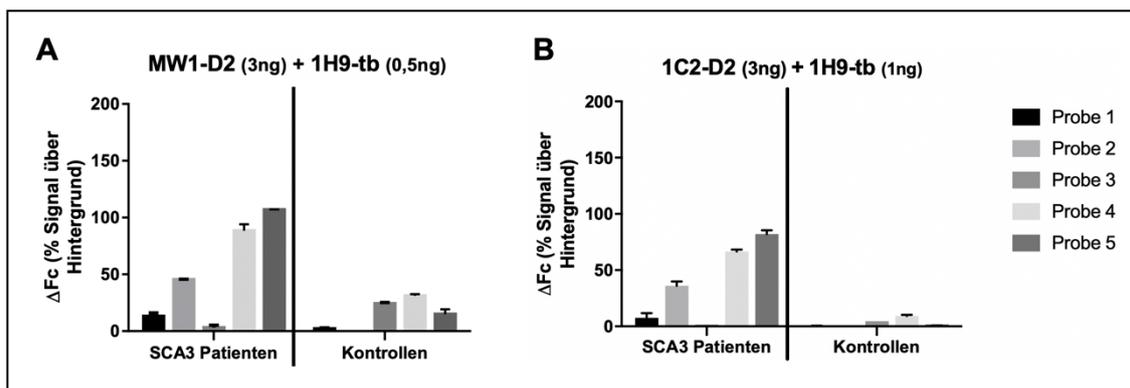


Abbildung 15: Vergleich der Messungen mittels MW1-D2 und 1C2-D2 in PBMCs

A) Gegenüberstellung der mittels TR-FRET Assay analysierten Ataxin-3 Protein-Messwerte für 5 Patienten und 5 Kontroll-Proben aus dem *NeurOmics* Projekt. Die Patienten-Proben 1 und 3 zeigen eine geringe Detektion von expandiertem Ataxin-3, während hingegen bei den Kontrolle 3, 4 und 5 deutlich positive Signal gemessen werden. Eine eindeutige Trennung zwischen SCA3 Patient und gesundem Proband ist hier nicht durchweg möglich. B) 1C2-D2 zeigt im Vergleich zur Messung mit MW1-D2 kaum positive Signalwerte für Kontrollen und weist somit eine klarere Abtrennung der Patienten zu Kontrollen auf, da vorwiegend nur Ataxin-3 mit mehr als 37Q erkannt wird. Die Patienten-Proben zeigen bei beiden Antikörpern ein breites Spektrum an gemessenen Proteinmengen, welche durch verschiedene klinische Parameter oder Probenqualität erklärbar sein könnte.

3.2.2 Überprüfung der Reproduzierbarkeit des TR-FRET Assays

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der TR-FRET Messungen wurde in Experimenten mit überexprimiertem Ataxin-3 (148Q) getestet, wie sich die Variation der Werte gemessen auf einer Platte (Intra-Test) und zwischen Messungen auf verschiedenen Platten (Inter-Test) darstellt. Hierfür wurde die gleiche Ausgangsprobe zunächst 1:4 (viel Ausgangsmaterial) und 1:16 (wenig Ausgangsmaterial) vorverdünnt und diese Stocklösungen für alle Intra- und Inter-Platten-Tests genutzt.

Im Intra-Vergleich wurde dieselbe Ausgangsprobe (1:4 und 1:16 Ataxin-3 148Q) in verschiedene *Wells* auf der ganzen Platte verteilt aufgetragen und anschließend gemessen (vgl. *Abbildung 16A* MW1-D2 und 1C2-D2 *Abbildung 16B*). Der ermittelte Variationskoeffizient der Rohsignalwerte liegt bei beiden Antikörpern MW1-D2 und 1C2-D2 zwischen 5 und 7%. Allerdings zeigte eine genauere Untersuchung der Verteilung der Messwerte an, dass es beim Pipettieren von einer großen Probenmenge bei Raumtemperatur zu einem Platten-Verteilungs-Effekt kommt. Dies bedeutet, dass entlang der Pipettier-Richtung von *Well A1* (oben links) bis zu *Well P24* (unten rechts) die Signalwerte ein klares Gefälle anzeigen (dargestellt mit Farbverlauf in der *Abbildung 17*). Da in diesem Experiment 82 *Wells* pipettiert wurden, dauerte der Pipettier-Vorgang der Antikörper-Zugabe ca. 10 min. Auf diese Weise unterschied sich auch die jeweilige Inkubationszeit bei Raumtemperatur der Probe mit dem Antikörper von *Well* zu *Well*. Resultierend daraus zeigten Proben, die zuerst mit dem Antikörper versetzt wurden (*Well A1*), höhere Rohsignalwerte als Proben, bei welchen der Antikörper später auf die Platte pipettiert wurden (*Well P24*).

Bei einer erneuten Analyse, bei welcher die Platte bei 4 °C pipettiert wurde, was auch der späteren Inkubationstemperatur des Assays entspricht, sind keine Platten-Verteilungs-Effekte erkennbar (vgl. *Abbildung 18*). Die Ergebnisse zeigen, dass bei einer längeren Pipettier-Dauer des Antikörpers (also bei größerer Probenanzahl), eine Zugabe des Antikörpers bei 4 °C erfolgen sollte. Der Variationskoeffizient in diesem Experiment zwischen 5-6 % und somit im gleichen Bereich, wie bei dem Pipettieren bei Raumtemperatur (vgl. *Abbildung 16C*).

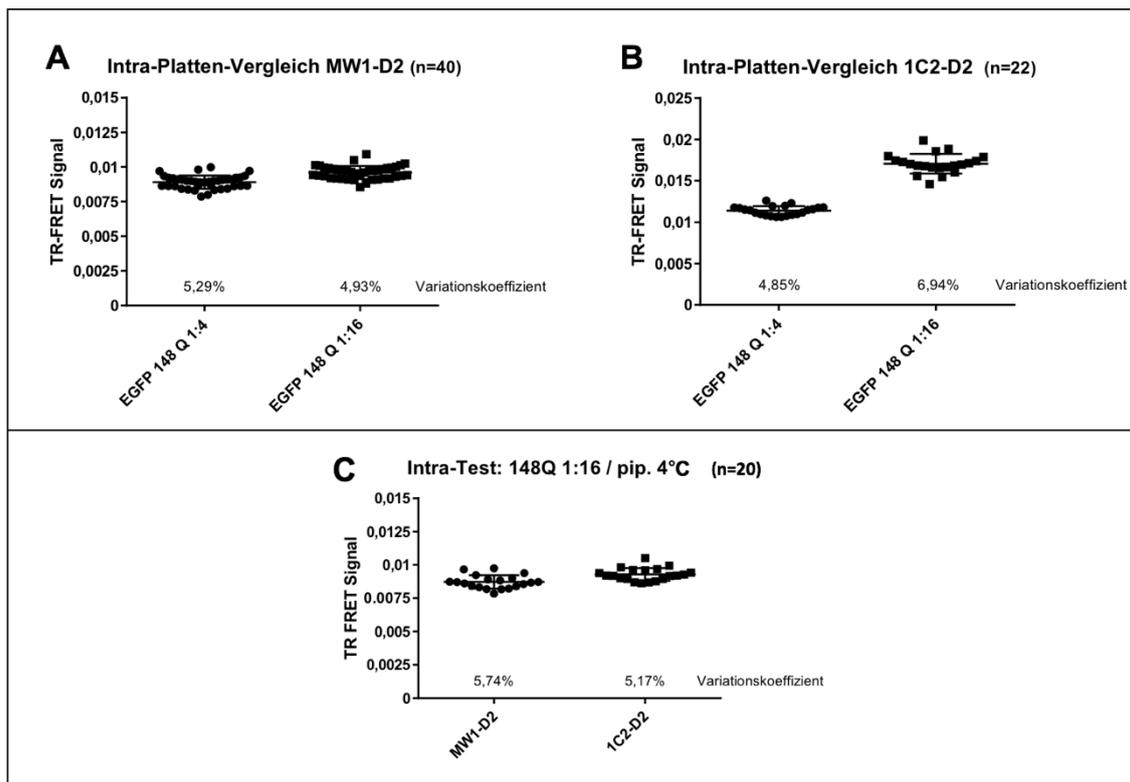


Abbildung 16: Intra-Platten-Vergleiche

A) zeigt die Ergebnisse eines Tests mit MW1-D2 mit 40 belegten *Wells* (jeweils 20 Duplikate für jede Verdünnung) auf einer Platte bei Raumtemperatur (RT) pipettiert. Der Variationskoeffizient liegt gerundet bei 5%. B) Mit jeweils 11 Duplikaten je Verdünnung wird auch beim Versuch mit dem 1C2-D2 ein Variationskoeffizient von unter 7% ermittelt. C) Mit 20 Proben (1:16 148Q) wird in einem weiteren Versuch geprüft, ob ein pipettieren bei 4 °C Einfluss nimmt. Auch hier befindet sich für beide Antikörper MW1-D2 und 1C2-D2 der Variationskoeffizient auf einer Platte zwischen 5 und 6%.

Der Pipettierfehler, des geübten Experimentators und der verwendeten Pipetten zwischen zwei Duplikaten wurde bei jeder einzelnen Proben-Messung ausgehend von den Rohsignalwerten ermittelt. Dabei wird der Quotient aus dem Rohsignalwert des Duplikats A und des Duplikats B einer Probe ermittelt und dann in Prozent berechnet. Bei den ersten Etablierungsversuchen zeigte sich, dass bei ca. 90% der Messungen eine Abweichung im Duplikat von 0-10% vorlag. Dieser Bereich wurde dann als Richtwert für die Messungen der PBMC-Lysate und weiteren Experimenten zur Validierung des Assays genutzt. Somit gilt für alle in den PBMC-Analysen eingegangenen Messwerte (*vgl. Kapitel 3.3*), dass nie über 10% Abweichung innerhalb eines Duplikates vorliegen durfte. Alle Messungen, bei denen die Ergebnisse für das Duplikat der Probe über 10% von einander abwichen, wurden wiederholt.

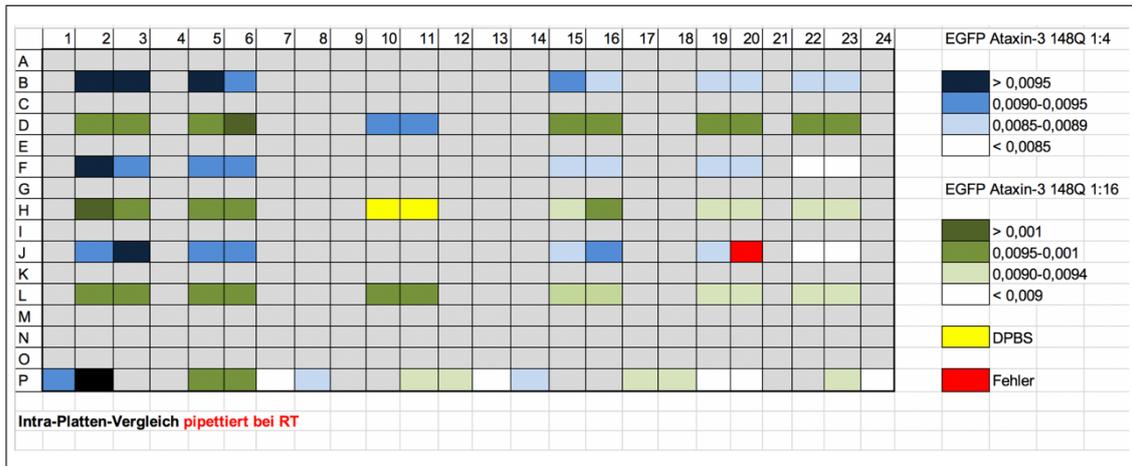


Abbildung 17: Schematische farbliche Darstellung der Messwerte auf einer Platte, pipettiert bei RT (hier nur Antikörper MW1-D2)

Dargestellt ist exemplarisch eine 384 Well-Platte, die für den Intra-Platten-Test mit Ataxin-3 148Q 1:4 (blau) und 1:16 (grün) verdünnt beladen wurde. Die blaue und grüne Farb-Skala zeigt jeweils absteigend die Rohsignalwerte an. Ein dunkler Farbton zeigt einen hohen Signalwert, ein heller Farbton bis weiß zeigt einen niedrigen Signalwert für die Messung der gleichen Ausgangsprobe an. Es zeigte sich ein Gefälle der Messwerte in diagonaler Richtung von links oben Well A1 nach rechts unten Well P24, entsprechend der Pipettier-Richtung. EGFP= *enhanced green fluorescent protein*, DPBS (gelb)= *Puffer als Hintergrund*

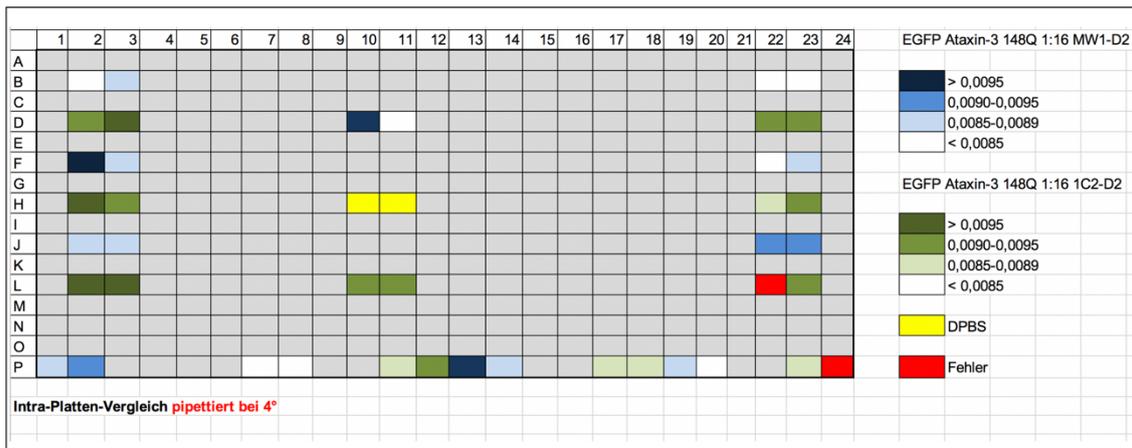


Abbildung 18: Schematische farbliche Darstellung der Messwerte auf einer Platte, pipettiert bei 4 °C (hier nur EGFP Ataxin-3 1:16)

Dargestellt ist exemplarisch eine 384 Well-Platte, die für die Wiederholung des Intra-Platten-Tests bei 4 °C pipettiert wurde. Die Belegung zeigt hier die Ergebnisse der MW1-D2 Messung (blau) und der 1C2-D2 Messung (grün). Es wurde exemplarisch nur EGFP Ataxin-3 1:16 verwendet. Die blaue und grüne Farb-Skala zeigt jeweils absteigend die Rohsignalwerte an. Ein dunkler Farbton zeigt einen hohen Signalwert, ein heller Farbton bis weiß zeigt einen niedrigen Signalwert für die Messung der gleichen Ausgangsprobe an. Es zeigte sich kein Gefälle der Messwerte in diagonaler Richtung von links oben Well A1 nach rechts unten Well P24, entsprechend der Pipettier-Richtung. EGFP= *enhanced green fluorescent protein*, DPBS (gelb)= *Puffer als Hintergrund*

Zum Vergleich der Reproduzierbarkeit einer Proben-Messung auf einer anderen Platte, wurde im Inter-Platten-Vergleich dieselbe Ausgangsprobe auf insgesamt 8 verschiedenen Platten gemessen. Die Messungen erfolgten zu unterschiedlichen Tageszeiten, Außentemperaturen und mit jeweils weiteren anderen Proben auf den Platten. Es wurden jedoch nach Möglichkeit immer die gleichen *Well*-Positionen auf den Platten belegt. Die Ergebnisse zeigten für Messungen mit dem Antikörper MW1-D2 einen Variationskoeffizient von 8-11% und für 1C2-D2 von 13-14% (vgl. *Abbildung 19A/B*).

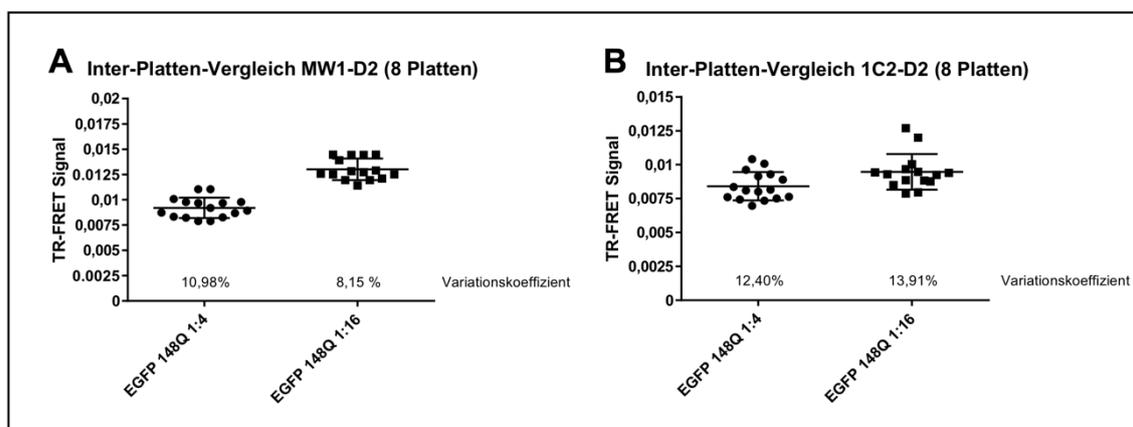


Abbildung 19: Inter-Platten-Vergleich

Dieselbe Probe EGFP Ataxin-3 148Q wird im Duplikat auf 8 verschiedenen Platten (n=16 je Verdünnung) gemessen und der Variationskoeffizient bestimmt. Hierbei zeigt A) für MW1-D2 Werte von 8-11% Abweichung und B) für 1C2-D2 bis zu 14 % Abweichungen vom Mittelwert. Für die 1:16 Verdünnung gab es ein deutliches Ausreißer-Duplikat, was in die Berechnung mit einbezogen wurde.

3.2.3 Detektionsbereich des Assays für verschiedene Konzentrationen des überexprimiertem EGFP Ataxin-3

Zur Validierung des Detektionsbereiches der verschiedenen TR-FRET Assays (MW1 versus 1C2) zur Ataxin-3 Protein-Detektion wurde anhand von Verdünnungsreihen, ausgehend von in HEK239T-Zellen überexprimiertem EGFP Ataxin-3 15Q und 70Q, getestet, in welchem Konzentrations-Bereich ein linearer Zusammenhang zwischen Signal und Proteinkonzentration besteht. Zudem wurden die Detektionsgrenzen im jeweils untersten noch detektierbaren Bereich und im obersten Bereich, wo ein linearer Zusammenhang zwischen

eingesetzter Gesamtproteinmenge und Antikörperbindung bestand, ermittelt. Es zeigte sich, dass bei einer Konzentration von unter 0,001 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ kein positives Signal über dem Hintergrund mehr messbar war, während die obere Detektionsgrenze bei 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ lag (vgl. *Abbildung 20A/B*). Jedes Experiment wurde im Duplikat durchgeführt, bei 4 °C für 24 h inkubiert und anschließend gemessen (Versuch I. und II.) Der vermutete lineare Bereich wurde in einer zweiten Versuchsreihe bestätigt und lag für beide Antikörper, MW1-D2 und 1C2-D2, bei Ataxin-3 Konzentrationen von 0,001 bis 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (vgl. *Abbildung 20C/D*).

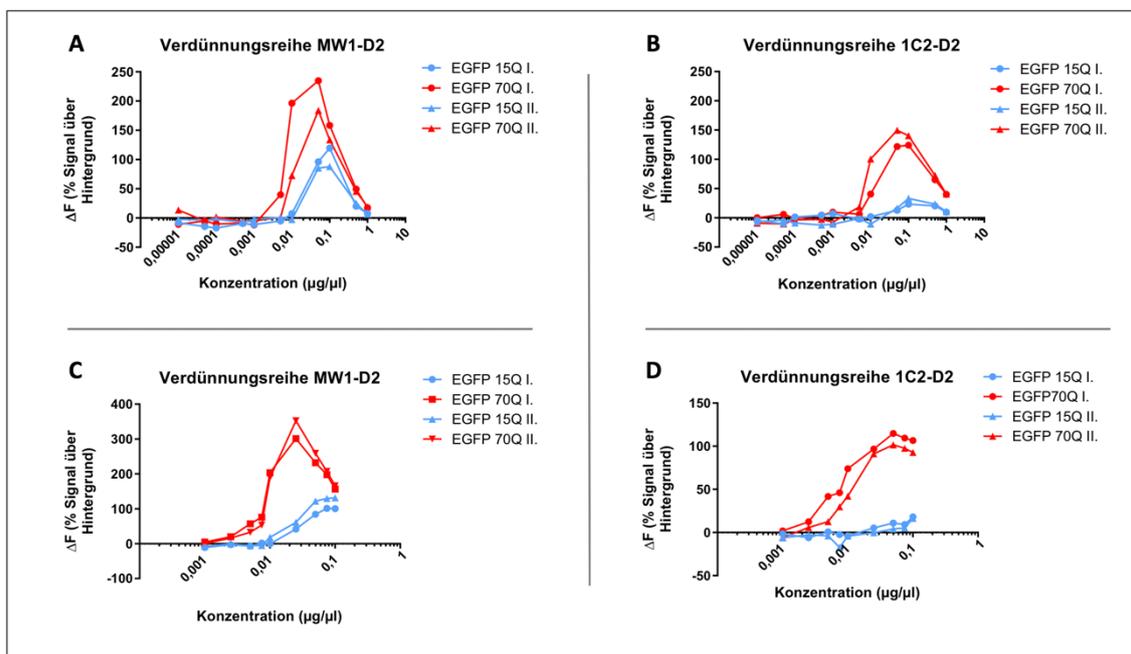


Abbildung 20: Verdünnungsreihe mit EGFP Ataxin-3

A), B) Die Verdünnungsreihe von EGFP Ataxin-3 70Q (rot) und 15Q (blau) zeigte für beide Antikörper (MW1-D2 und 1C2-D2) eine maximale Signalstärke bei einer Konzentration von 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Der Versuch wurde auf einer 2. Platte (II.) wiederholt. C), D) Mit einer 2. Verdünnungsreihe mit Konzentrationen um den vermuteten linearen Bereich wurde der Versuch ebenfalls im Duplikat wiederholt. Es zeichnete sich für beide Antikörper ein linearer Detektionsbereich zwischen 0,001 und 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ EGFP Ataxin-3 ab.

Das Bestimmtheitsmaß R der linearen Regression lag im Konzentrationsbereich von 0,001 bis 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Gesamtprotein für den MW1-D2 Antikörper mit $R \sim 0,9$ und für 1C2-D2 mit R zwischen 0,8 und 1 (vgl. *Abbildung 21*).

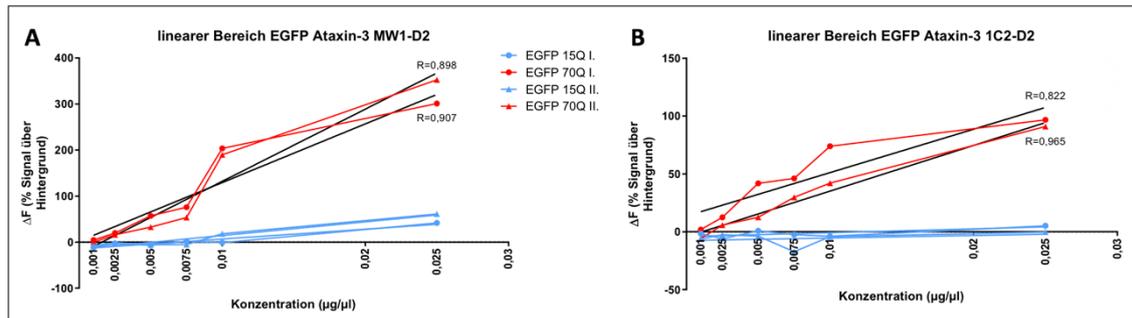


Abbildung 21: linearer Bereich der Verdünnungsreihe mit EGFP Ataxin-3

A) zeigt die Analyse des Bestimmtheitsmaßes im Detektionsbereich für MW1-D2. Die Untersuchung auf Linearität ergab ein Bestimmtheitsmaß R von gerundet 0,9. B) Analoge Darstellung für den Antikörper 1C2-D2 mit Bestimmtheitsmaß R zwischen 0,8 und 1.

Da sich in der Literatur und bei bereits vorhandenen TR-FRET Assays auch Empfehlungen zur Inkubation bei Raumtemperatur finden, sollte dieser Ansatz ebenfalls untersucht werden. Versuche zur TR-FRET Messung von Huntingtin (Weiss et al., 2012) und gewerbliche Assays für Alpha-Synuclein (*Total Human α -Synuclein Kit 500 tests* von Cisbio) arbeiten erfolgreich mit einer Inkubation bei Raumtemperatur (22 °C). Zudem zeigte das Experiment des Intra-Platten-Tests (vgl. Kapitel 3.2.2), dass längere Inkubationszeiten des Antikörpers auf der Platte bei Raumtemperatur höhere ΔF -Werte lieferten.

So wurde in einem weiteren Experiment die Inkubation bei Raumtemperatur untersucht und die betreffende Platte zu mehreren Inkubations-Zeitpunkten (nach 0, 2, 4, 6, 20, 22 und 24 h) gemessen. Im Gegensatz zu unserem regulären Assay, wird in den Versuchen mit Inkubation bei Raumtemperatur die doppelte Menge an Probenvolumen, d.h. 10 μl und die doppelte Menge Antikörper-Mix (2 μl) eingesetzt. Zudem wurde die Platte mittels einer Klebefolie luftdicht verschlossen, um ein Verlust des geringen Reaktionsvolumens durch Abdampfen zu verhindern. Die Untersuchungen für EGFP Ataxin-3 15Q und 70Q mittels des Antikörpers MW1-D2 zeigten, dass mit einer Inkubation bei Raumtemperatur zu keinem Zeitpunkt ein spezifisches Signal über dem Hintergrund-Signal detektiert werden konnte (vgl. Abbildung A/C). Gezeigt sind jeweils exemplarisch die Messungen zu den Zeitpunkten nach 4 und 24 Stunden Inkubation. Bei Protein-Messungen mittels dem Antikörper 1C2-D2 zeigte sich

hingegen ein deutliches Signal proportional zur eingesetzten Ataxin-3 Proteinmenge für EGFP Ataxin-3 70Q (vgl. Abbildung B/D).

Das nicht-expandede Ataxin-3 Protein mit 15Q wurde hingegen auch bei Inkubation bei Raumtemperatur nicht detektiert, wie die spezifische Bindung des 1C2 Antikörpers ab 37Q erwarten lässt (vgl. Abbildung B/D).

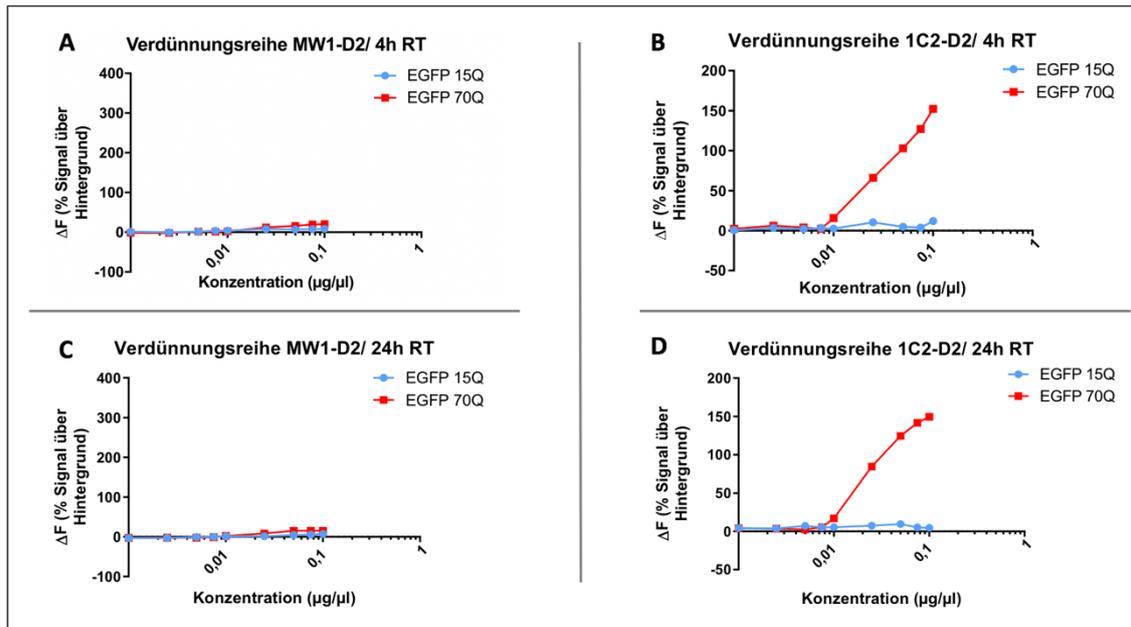


Abbildung 22: Versuche mit EGFP Ataxin-3 bei Inkubation der Platte bei Raumtemperatur

A), C) Keine Detektion von EGFP Ataxin-3 15Q und 70Q für MW1-D2 bei Inkubation bei Raumtemperatur (RT) nach 4 oder 24 h. B), D) der lineare Detektionsbereich ist mit dem 1C2-D2 Antikörper bei Inkubation bei RT für EGFP Ataxin-3 70Q detektiert. Es zeigte sich eine deutliche Unterscheidung von ΔF für Ataxin-3 15Q im Vergleich zum pathologischen 70Q bereits nach 4 h Inkubation mit dem 1C2-D2/1H9-tb Antikörper-Mix. Nach 4 h Inkubationszeit änderten sich die Messwerte nicht mehr signifikant.

3.2.4 Detektionsbereich des Assays für verschiedene Konzentrationen von endogenem Ataxin-3 aus iPSC-Homogenaten

Zur Bestätigung der Ergebnisse aus Kapitel 3.2.3 wurde anstelle des von HEK293T-Zellen überexprimiertem Ataxin-3 eine weitere Versuchsreihe mit endogenem Ataxin-3 aus Homogenaten von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSCs) gewonnen aus Fibroblasten von SCA3 Patienten (hier Probe mit 76Q im expandierten Allel verwendet) und gesunder Kontrollen, bereitgestellt von Herrn Dr. rer. nat. Weber (Weber et al., 2017), durchgeführt.

Die iPSC-Proben wurden in dem Labor von Herrn Prof. Dr. med. Schöls generiert und charakterisiert. Hintergrund dieser Analyse ist die Überlegung, dass in den später zu messenden PBMC-Lysaten aus der ESMI-Kohorte auch kein überexprimiertes Ataxin-3, sondern endogenes Ataxin-3 Protein in dementsprechend kleinen Mengen vorliegt und der Assay dafür sensitiv genug eingestellt sein muss. Es wurde analog zum Versuch für den Detektionsbereich des EGFP Ataxin-3 eine Verdünnungsreihe mit den iPSC-Proben von 0,00001 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ bis 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ hergestellt. Die Messung erfolgte mit den etablierten TR-FRET Assays MW1-D2 und 1C2-D2. Der gesamte Versuch wurde an einem weiteren Versuchstag auf gesonderten Platten wiederholt (markiert mit I. und II.). Die Auswertung der Messung des endogenen Ataxin-3 in den iPSCs ergab für Proteinkonzentrationen von unter 0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ kein deutlich positives Mess-Signal, ΔF schwankte zwischen negativen Werten und maximal 20 für MW1-D2 und 10 für 1C2-D2 und stieg erst ab 0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Gesamtproteinmenge an (vgl. *Abbildung 23A/B*).

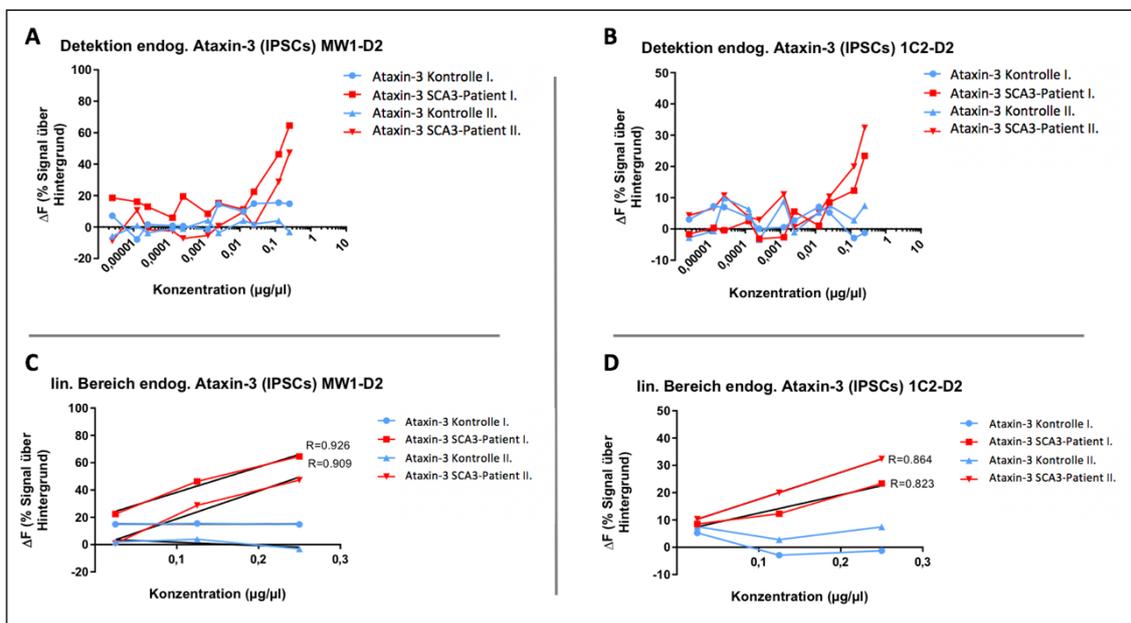


Abbildung 23: Verdünnungsreihe mit endogenen Ataxin-3

A), B) Mit einer großen Verdünnungsreihe von 0,00001 bis 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ wurde der Detektionsbereich untersucht, welcher in vorherigen Experimenten mit überexprimiertem Ataxin-3 validiert wurde. Dabei zeigte sich, dass erst ab 0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eine Unterscheidung zwischen nicht-expandiertem Ataxin-3 (blau) der Kontrolle und expandiertem Ataxin-3 76Q (rot) des SCA3 Patienten deutlich wird. C), D) Der Detektionsbereich von 0,01 bis 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, zeigt R-Werte für MW1-D2 von maximal 0,926 und für 1C2-D2 R=0,864.

Die nähere Analyse im Bereich der Konzentrationen zwischen 0,01 und 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ der Gesamtproteinmenge der endogenen Ataxin-3 lässt eine lineare Korrelation von Protein-Gehalt und Signal ΔF vermuten. Das Bestimmtheitsmaß R lag gerundet für die TR-FRET Assays mit den Antikörpern MW1-D2 bzw. 1C2-D2 zwischen 0,8 und 0,9 (vgl. *Abbildung 23C/D*). Allerdings lagen in diesem Versuch nur 3 Messpunkte in dem vermuteten linearen Bereich, weshalb eine weitere Verdünnungsreihe mit kleineren Zwischenschritten für die Testung beider Antikörper notwendig wurde.

Diese Versuche mit der neuen Verdünnungsreihe der IPSC-Homogenate für expandierte Ataxin-3 (76Q) von SCA3 Patienten, sowie für nicht-expandiertes Ataxin-3 der Kontrollprobanden im gewählten Konzentrationsbereich von 0,01 bis 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ mit 4 Zwischenschritten zeigte in vier Wiederholungen vergleichbare Ergebnisse, zwei davon sind exemplarisch in *Abbildung 24A* für MW1-D2, bzw. in *Abbildung 25A* für 1C2-D2 dargestellt. Es ergab sich für beide Antikörper eine deutliche Unterscheidung der Messwerte zwischen expandiertem Ataxin-3 76Q der Patienten-Probe mit deutlich positiven ΔF -Werten und dem nicht-expandierten Ataxin-3, welches erwartungsgemäß negative oder sehr kleine Signalwerte lieferte. Das Bestimmtheitsmaß R in den dargestellten Versuchen lag gerundet für MW1-D2 bei 0,86 und 0,91 und für 1C2-D2 bei 0,74 und 0,95 (vgl. *Abbildung 24A*, *Abbildung 25A*). Die Inkubation der beladenen Platte bei Raumtemperatur, anstelle der sonst üblichen 4 °C, zeigte nur für die Detektion mittels Antikörper 1C2-D2, spezifische Signalwerte für die expandierte Ataxin-3 Patienten-Probe 76Q. Wie bereits bei den Versuchen mit EGFP Ataxin-3 (*Kapitel 3.2.3*) war auch in diesen Experimenten eine Detektion von Ataxin-3 mittels 1C2-D2 nach Inkubation bei 22 °C nur möglich, wenn das doppelte Volumen an Probe (10 μl) und Antikörper-Mix (2 μl) eingesetzt wurde (vgl. *Abbildung 25B*). Bei dem TR-FRET Assay mit Verwendung des MW1-D2 Antikörpers ergaben Messungen nach der Inkubation bei Raumtemperatur keine deutlich positiven Signale über dem Hintergrund (vgl. *Abbildung 24B*).

Der Vergleich der Verdünnungsreihe der IPSC-Homogenate mit PBMC-Lysaten aus der ESMI-Kohorte analysiert auf einer Platte soll nun Aufschluss geben, in wie fern die später zu messenden PBMC-Lysate sich ebenfalls mit ihren

Messwerten in dem ermittelten linearen Detektionsbereich einordnen lassen. Es wurden die bekannten Verdünnungsreihen (von 0,01 bis 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) der IPSC-Homogenate für nicht-expandiertes (Kontrolle) und expandiertes Ataxin-3 (SCA3 Patient) zusammen mit jeweils 5 Kontrollen- und 5 Patienten-Proben aus der ESMI-Kohorte gemessen. Bei beiden Antikörpern, MW1-D2 und 1C2-D2, zeigte sich, dass die ΔF -Werte für endogenes expandiertes Ataxin-3 der PBMC-Lysate der Patienten im Detektionsbereich der Werte der IPSC-Verdünnungsreihe lagen (vgl. *Abbildung 24C, Abbildung 25C*). Diese Beobachtung bestätigte somit die Verlässlichkeit des Assays für die Anwendung bei der Ataxin-3 Messung in PBMCs. Läge keine lineare Beziehung zwischen Signalwert und Protein-Gehalt einer Probe vor, wäre eine spätere Quantifizierung nicht möglich. Die Diskriminierung zwischen Patienten-Proben und Kontroll-Proben war erwartungsgemäß bei der Detektion mittels 1C2-D2 (>37Q) deutlicher ausgeprägt, als bei der Verwendung des MW1-D2 (>15Q) Antikörpers.

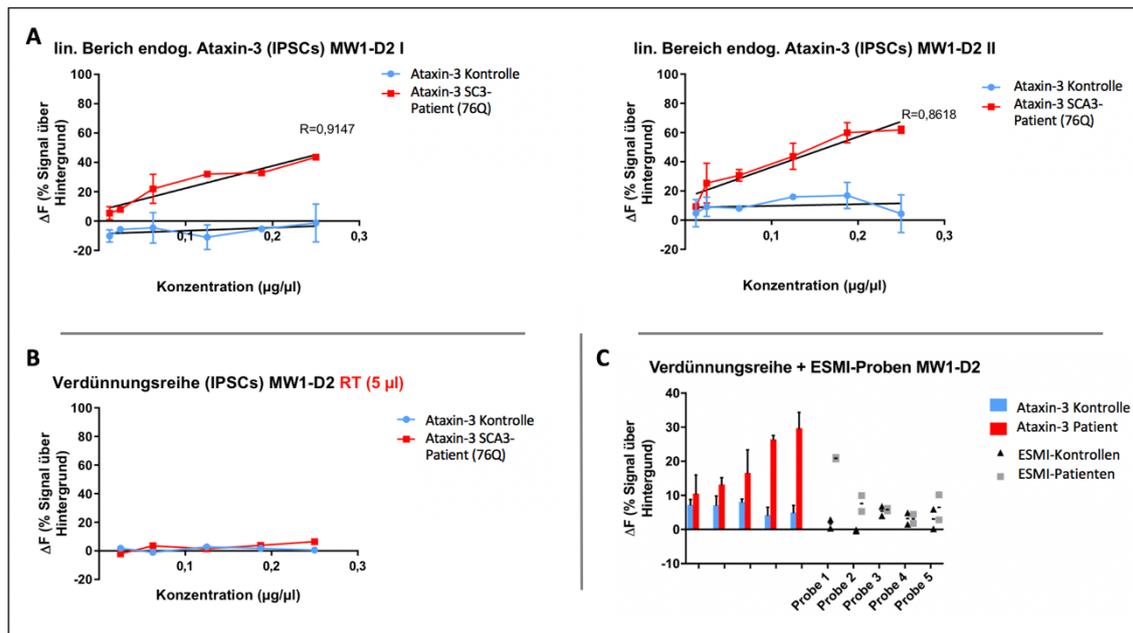


Abbildung 24: Etablierungsversuche mit endogenem Ataxin-3 für MW1-D2

A) Die exemplarische Darstellung der Untersuchung mit MW1-D2 (Versuch I und II) um endogen-exprimiertes Ataxin-3 zu messen, zeigte eine deutliche Diskriminierung zwischen der Kontroll-Probe und der Patienten-Probe mit 76Q. Der lineare Zusammenhang zwischen ΔF und der Proteinkonzentration war zwischen 0,01 und 0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ erkennbar. B) Versuche mit einer Inkubation bei RT, anstelle der üblichen 4 $^{\circ}\text{C}$, ergaben weder für 5 μl , noch für 10 μl (Graph nicht abgebildet) Probenvolumen ein deutlich positives Signal. C) Die Verdünnungsreihe auf einer Platte zusammen mit jeweils 5 Kontrollen- und 5 Patienten-Proben (PBMCs) aus der ESMI-Kohorte zeigte, dass die ΔF -Werte der zu untersuchenden Proben alle im Bereich der linearen Detektion lagen.

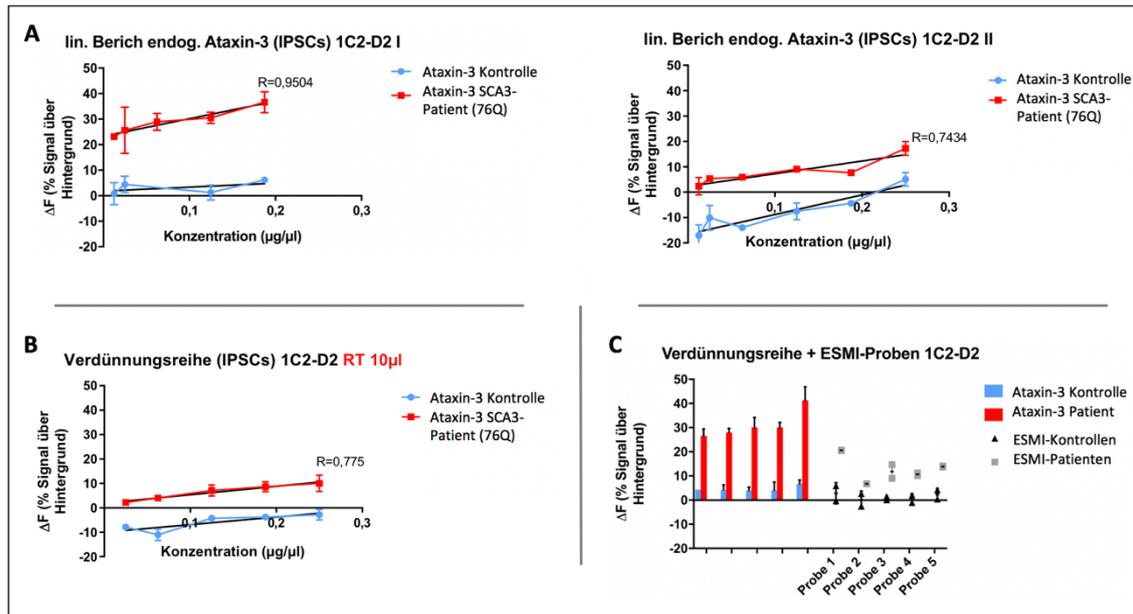


Abbildung 25: Etablierungsversuche mit endogenem Ataxin-3 für 1C2-D2

A) Die exemplarische Darstellung der Untersuchung mit 1C2-D2 (Versuch I und II) mit endogenem Ataxin-3 zeigte ebenfalls eine deutliche Diskriminierung zwischen der Kontroll- und der Patientenprobe mit 76Q. Die absoluten Werte für ΔF variierten allerdings zwischen den Versuchen auf verschiedenen Platten (I und II). B) Die Inkubation der Proben bei RT gelang für die Detektion mit 1C2-D2 auch mit endogenem Ataxin-3, allerdings erneut nur dann, wenn das doppelte Volumen an Antikörper und Probe je *Well* eingesetzt wurde. Bei 5 μ l Probe mit 1 μ l Antikörper-Mix, wie sonst üblich, zeigten sich nur negative Werte (Graph nicht abgebildet). C) Die Verdünnungsreihe auf einer Platte zusammen mit jeweils 5 Kontrollen- und 5 Patientenproben (PBMCs) aus der ESMI-Kohorte zeigten, dass die ΔF Werte der zu untersuchenden Proben alle im Bereich der linearen Detektion lagen. Zusätzlich war eine klare Unterscheidung zwischen expandiertem Ataxin-3 Protein-Gehalt in den Patienten- und dem nicht-expandierten Ataxin-3 der Kontrollproben erkennbar.

3.2.5 Messung von expandiertem Ataxin-3 Protein in verschiedenen humanen Biomaterialien

Die folgenden Ergebnisse zeigen die Resultate der Versuche, Polyglutamin-expandiertes Ataxin-3 auch in weiteren menschlichen Biomaterialien mittels des etablierten TR-FRET Assays nachzuweisen. Neben den bereits für Etablierungsversuche eingesetzten IPSCs, welche reprogrammiert von humanen SCA3 Patienten-Fibroblasten und Kontroll-Fibroblasten stammen, sollen nun auch die entsprechenden Fibroblasten und Lysate von *post mortem* SCA3-Patienten und Kontrollen analysiert werden. Die Cerebellum-Proben verstorbener Patienten und Kontrollen wurden unserem Institut von Frau Prof. Aronica (Universität Amsterdam, Niederlande) bereitgestellt. Es wurden Lysate

von Fibroblasten und iPSCs von jeweils 3 SCA3 Patienten und 3 Kontrollen, sowie Gehirnllysate (Cerebellum-Proben) in RIPA-Puffer von 6 SCA3 Patienten und 3 Kontrollen analysiert. Zu Beginn wurde der Gesamtproteingehalt der Ausgangsproben mittels der Proteinbestimmung nach Bradford bestimmt, wobei sich für die Fibroblasten und iPSCs Konzentrationen von 1 bis 6 µg/µl ergaben. Diese Proben wurden ohne weitere Verdünnung in den TR-FRET Assay eingesetzt. Da in den Gehirnllysaten anteilig vom Gesamtprotein mehr Ataxin-3 zu erwarten war, und die Ausgangsproben ebenfalls Gesamtproteinkonzentrationen von 3 bis 6 µg/µl aufwiesen, wurden diese Proben mit RIPA-Puffer vorverdünnt und in Konzentrationen von 0,3-0,6 µg/µl im TR-FRET Assay gemessen.

Abbildung 26 zeigt, dass in Fibroblasten, iPSCs und Gehirnllysaten der Nachweis von expandiertem Ataxin-3 Protein mittels der TR-FRET Assays MW1 und 1C2 möglich war. Es ergeben sich Unterschiede in den absoluten Signalstärken zwischen den beiden Antikörpern MW1-D2 (A) und 1C2-D2 (B). In den Fibroblasten gelang die Detektion des expandierten Ataxin-3 mit beiden Antikörpern und es zeigte sich eine deutliche Diskriminierung zwischen den Patienten- und Kontroll-Proben. Für die iPSC-Lysate ergab sich das gleiche Ergebnis bei der Messung mit dem MW1-D2 Antikörper, während beim 1C2-D2 Antikörper die Detektion der Patientenproben in diesem Experiment nicht gelang. Andere Versuche mit iPSCs (*vgl. Kapitel 3.2.4*) zeigten aber, dass die Messung des expandierten Ataxin-3 auch mittels 1C2-D2 bei diesen Proben möglich war.

Bei der Messung des Ataxin-3 Proteins in den Gehirnllysaten zeigte die Detektion mittels 1C2-D2, dass Kontrollen von Patienten-Proben unterschieden werden konnten, was bei MW1-D2 nicht der Fall war. Auch Experimente mit geringerer Verdünnung der Gehirnllysate (1:8 oder 1:4) zeigten ähnliche Ergebnisse, wie bereits für die 1:10 Verdünnung dargestellt (Graphen nicht abgebildet).

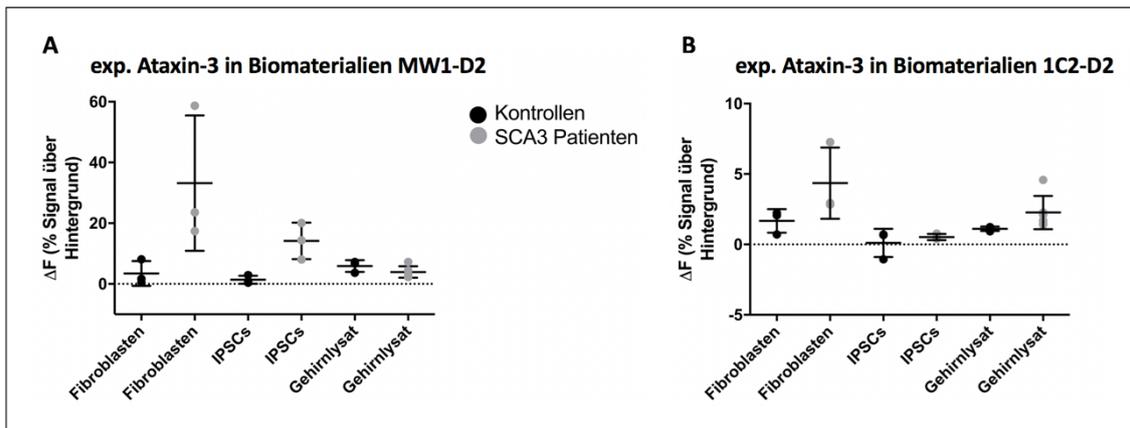


Abbildung 26: Nachweis von exp. Ataxin-3 in diversen menschlichen Biomaterialien

A) Der Nachweis von exp. Ataxin-3 mittels MW1-D2 Antikörper gelang sowohl in Lysaten von Fibroblasten als auch in IPSCs und lieferte deutlich höhere ΔF -Werte für die Patienten-Proben im Vergleich zu den Kontrollen. Bei den Gehirnlysaten sind alle Messwerte der 6 Patienten *post mortem* Cerebellum-Proben nahe der Nachweiglienze und erlauben keine Unterscheidung zwischen Patienten und Kontrollen. B) Trotz kleinerer absoluter Werte für ΔF gelingt auch mit 1C2-D2 die Detektion in Fibroblasten und in Gehirnlysaten. In IPSCs war in diesem Versuch die Ataxin-3 Messung mittels 1C2-D2 nicht möglich, bei den früheren Versuchen mit endogenem Ataxin-3 aus IPSCs in Verdünnungsreihen (vgl. *Abbildung 25*) gelang hingegen die Detektion zuverlässig.

Plasma-Proben sind als ein leicht zu gewinnendes Biomaterial für die Biomarkerforschung interessant und könnten im TR-FRET Assay eingesetzt werden, da keine roten Blutbestandteile, welche eine störende Eigenfluoreszenz bedingen, enthalten sind.

Die Plasma-Proben (4 SCA3 Patienten und 4 Kontrollen) wurden mit 10% Tween20 und Protease Inhibitoren (Complete ohne EDTA) versetzt oder unbehandelt im TR-FRET Assays eingesetzt. Die Ataxin-3 Quantifizierung mittels des TR-FRET Assay in Plasma-Proben zeigte in allen bisherigen Versuchen keinen Erfolg. Sowohl pur als auch mittels Tween20-Protease-Inhibitor-Mix, mit verschiedenen Inkubationszeiten oder Temperaturen, konnte bisher kein deutliches Signal über der Nachweiglienze ermittelt werden. Eines der Ergebnisse ist exemplarisch in *Abbildung 27* dargestellt. Die ermittelten ΔF -Werte lagen zwischen 0 und 0,3; anstatt bei einem ΔF -Wert von mindestens 5-10, wie es in PBMC-Proben der Fall ist. Teilweise ergeben sich sogar negative Werte und es gelang keine Unterscheidung zwischen Kontrollen und Patienten, weder bei dem Einsatz des MW1-D2 (A) noch bei 1C2-D2 (B).

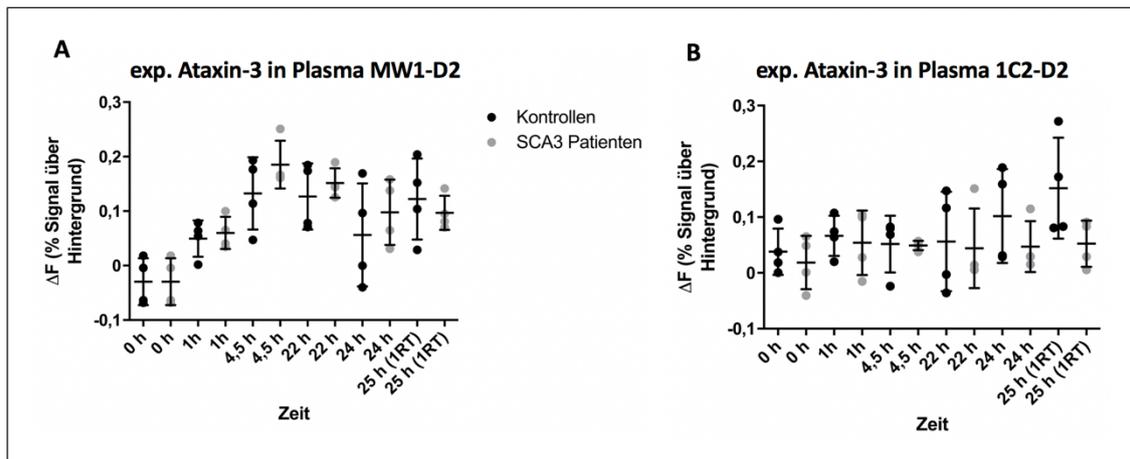


Abbildung 27: Exemplarische Darstellung eines Nachweisversuchs von Ataxin-3 in Plasma-Proben im Zeitverlauf (Ansatz mit Tween20 und Protease-Inhibitoren)

A) Die Ataxin-3 Messung von Plasma-Proben von jeweils 4 SCA3 Patienten und Kontrollen erfolgt nach 0, 1, 4, 5 h, sowie nach 22, 24, und 25 h (davon 1 h bei RT) Inkubation. Für MW1-D2 kann dabei ein minimaler Anstieg im Signal erkannt werden, der in einem Höhepunkt von $\Delta F = 0,3$ nach 4,5 h gipfelt. Eine klare Diskriminierung zwischen Kontroll- und Patienten-Probe war nicht möglich. B) Die Detektion des expandierten Ataxin-3 mittels 1C2-D2 gelang nicht, das Signal stieg nach längerer Inkubation leicht an, ergab aber höhere ΔF -Werte für Kontroll-Proben als für Patienten-Proben. Normalerweise werden ΔF -Werte von mindestens 5-10 als klares Signal über dem Hintergrund erreicht.

Ein weiteres, für die Biomarkerforschung in der SCA3 interessantes Biomaterial ist die Cerebrospinalflüssigkeit (CSF). Da Messungen von α -Synuclein Protein in CSF-Proben mittels TR-FRET bereits beschrieben sind (Bidinosti et al., 2012), wurde der in *Bidinosti et al.* verwendete Ansatz genutzt, um einen ähnlichen Assay für Ataxin-3 zu etablieren. Hierfür sollte zunächst eine Kalibrations-Matrix generiert werden, in welcher aus einer Kontroll-CSF Probe das humane Ataxin-3 Protein mittels eines Beat-Systems herausgezogen werden sollte, um so eine CSF-Probe zu erhalten, welche frei von Ataxin-3 Protein ist. Versetzt wurde die Probe mit IGEPAL, 1% TritonX100 und Protease-Inhibitoren. Die Kalibrations-Matrix sollte anschließend als Hintergrund-Signal verwendet werden und alle Messungen von CSF von Patienten und Kontrollen darauf normalisiert werden. Versuche zur Herstellung einer solchen Kalibration-Matrix wurden größtenteils durch den Doktoranden Patrik Pelz durchgeführt. Die Kontroll-Messungen zur Überprüfung, ob die Herstellung der Kalibrations-Matrix erfolgreich war, sind in *Abbildung 28* dargestellt. Nur bei der Inkubation mit den Antikörpern bis 22 h zeigten sich für die Kalibrations-Matrix ohne Ataxin-3 prozentual niedrigere Werte

im Vergleich zu der nativen CSF-Probe und höhere Werte für das entzogene Ataxin-3 (Positiv-Probe). Allerdings gelang es an dieser Stelle noch nicht, eine funktionierende Kalibrations-Matrix als Negativ-Probe zu generieren. Somit erfolgten im Zuge dieser Arbeit keine weiteren Versuche mittels CSF-Proben.

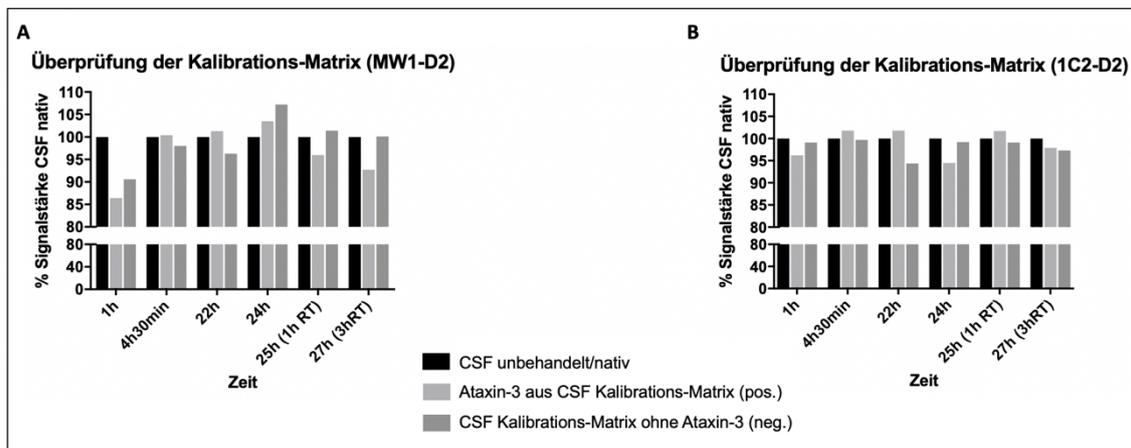


Abbildung 28: Versuch der Herstellung einer Kalibrations-Matrix für einen CSF-Assay

Es zeigten sich bei beiden Assays (A, B) keine relevanten Signal-Unterschiede zwischen der Kalibrations-Matrix (frei von Ataxin-3 Protein), der unbehandelten CSF-Probe (mit Ataxin-3) und dem Ansatz, der das aus der CSF-Kalibrations-Matrix entzogene Ataxin-3 enthalten sollte. Gemessen wurde in verschiedenen Zeitabständen und am Ende des Versuchs auch mit einer Inkubation bei RT. Der Ansatz der Kalibrations-Matrix ohne Ataxin-3 zeigte bei Inkubation bis 22 h wie erwartet geringere Signalwerte im Vergleich zur CSF-Nativ Probe und das der Kalibrations-Matrix entzogene Ataxin-3 Protein (Positiv-Probe) zeigte bis zu diesem Zeitpunkt die höchsten Signalwerte. Allerdings sind die prozentualen Unterschiede mit 1 bis 4 % von Signal der Nativ-Probe sehr gering.

3.2.6 Vergleich der Methoden zur Gesamtproteinbestimmung

Nach der Lyse der PBMC-Proben wird zunächst obligat eine Gesamtproteinbestimmung der puren und somit unverdünnten Probe durchgeführt. Bisher wurde auch in dieser Arbeit immer die Proteinbestimmungsmethode nach Bradford genutzt. Da in anderen Studien mit TR-FRET Messungen auch der BCA-Assay für die Gesamtproteinbestimmung zum Einsatz kam (Bidinosti et al., 2012), wäre für zukünftige Experimente auch dieses Verfahren denkbar. Um zu überprüfen, welches der beiden Protein-Quantifizierungs-Verfahren sich auch für die Bestimmung der 1:4 Verdünnung des PBMC-Lysates, welches im TR-FRET eingesetzt wurde, eignet, wurde ein Vergleich der beiden Assays durchgeführt. Die Proteinkonzentration der puren PBMC-Probe wurde zunächst immer mit dem Bradford-Assay durchgeführt. Daraus wurde die theoretische Konzentration der 1:4 Verdünnung berechnet.

3.2.7 Zusammenfassung Ergebnisse Teil A (Etablierung und Validierung)

Die Ergebnisse der Etablierungs- und Validierungsversuche für den TR-FRET Assay zur Messung des expandierten Ataxin-3 Proteins in PBMC-Lysaten sind im Folgenden in *Tabelle 19* zusammengefasst. Diese Erkenntnisse bilden die Grundlage für die Messungen der Patienten-Proben in dem Ergebnis-Teil B.

Tabelle 19: Zusammenfassung der Ergebnisse Teil A

Versuch/Fragestellung	Ergebnis mit MW1-D2 Assay	Ergebnis mit 1C2-D2 Assay
Etablierung 1C2-D2 und 1H9-tb für den TR-FRET Assay	geringere Trennschärfe zwischen Kontroll- und SCA3-Patienten Proben	Ermittelte Konzentrationen für den Assay: 1C2-D2 3ng und 1H9-tb 1 ng. Bessere Trennschärfe zwischen Kontroll- und SCA3-Patienten Proben
Reproduzierbarkeit des Assays? (Variationskoeffizient in %)	Intra-Platten-Vergleich: 4,9-5,3% Inter-Platten-Vergleich: 8,2-11% Pipettierfehler: < 10% bei großer Proben-Anzahl den Antikörper bei 4° pipettieren um Platteneffekte zu vermeiden.	Intra-Platten-Vergleich: 4,9-6,9% Inter-Platten-Vergleich: 12,4-13,1% Pipettierfehler: < 10% bei großer Proben-Anzahl den Antikörper bei 4° pipettieren um Platteneffekte zu vermeiden.
Etablierungsversuche mit EGFP (überexprimiertem) Ataxin-3	Linearer Detektionsbereich: 0,001- 0,1 µg/µl Bestimmtheitsmaß R= 0,898-n0,907 Funktion bei Inkubation bei RT: nein	Linearer Detektionsbereich: 0,001- 0,1 µg/µl Bestimmtheitsmaß R= 0,822- 0,965 Funktion bei Inkubation bei RT: ja, wenn doppelte Volumina eingesetzt wurde (10 µl Probe, 2 µl Antikörper)
Etablierungsversuche mit endogenem Ataxin-3 (IPSCs aus Fibroblasten)	Linearer Detektionsbereich: 0,01- 0,25 µg/µl Bestimmtheitsmaß R= 0,8618- 0,9147 Funktion bei Inkubation bei RT: nein	Linearer Detektionsbereich: 0,01- 0,25 µg/µl Bestimmtheitsmaß R= 0,7434- 0,9504 Funktion bei Inkubation bei RT: ja, wenn doppelte Volumina eingesetzt wurden (10 µl Probe, 2 µl Antikörper)
PBMC-Proben aus ESMI-Kohorte im Vgl. zu den iPSC-Homogenaten	Messwerte der PBMCs im Detektionsbereich: ja	Messwerte der PBMCs im Detektionsbereich: ja
Ist die Detektion von Ataxin-3 in diversen Biomaterialien mittels TR-FRET Assay möglich?	Fibroblasten: ja IPSCs: ja Gehirnlysate: fraglich Plasma: nein CSF: nein	Fibroblasten: ja IPSCs: ja Gehirnlysate: ja Plasma: nein CSF: nein
Welches Verfahren eignet sich zu Gesamtprotein-Bestimmung der PBMCs?	Der BCA-Assay scheint im Vergleich zum Bradford-Assay für die Messung in der 1:4 verdünnten PBMC-Probe etwas spezifischer zu sein.	

3.3 Teil B: Ergebnisse der expandierten Ataxin-3 Messung in PBMCs

3.3.1 Übersicht der analysierten ESMI-Kohorte für PBMCs

Für den Forschungszeitraum dieser Arbeit gelang es, von insgesamt 117 Probanden von vier verschiedenen Zentren (Tübingen, Bonn, London, Coimbra) Probenmaterial zu erhalten. Zusätzlich konnte ein homozygoter Patient aus dem assoziierten Partner-Zentrum Heidelberg mit in die Kohorte eingeschlossen werden, dieser wird im Folgenden allerdings immer gesondert aufgeführt und in Graphen mit einem Punkt gekennzeichnet dargestellt. Von den nun 118 Proben waren für 8 Teilnehmer keine PBMCs verfügbar, 4 PBMC-Proben ergaben kein oder ein zu kleines Pellet vor dem Homogenisieren, bei 2 Probanden war die Genotypisierung der Polyglutamin-Längen nicht eindeutig und bei 6 Patienten waren die klinischen Angaben unvollständig. Somit ergab sich für diesen Teil der Untersuchung eine Kohorte von 98 Probanden, welche in *Tabelle 20* genauer dargestellt sind. Es konnten so 29 gesunde Kontrollen, 8 präsymptomatische Mutationsträger und 60 manifest erkrankte SCA3 Patienten analysiert werden. Eine statistische Analyse der verschiedenen Gruppen zeigte, dass die Kontrollen im Mittel 10 Jahre jünger waren als die Patienten ($p= 0,0003$, *Abbildung 29A*).

Tabelle 20: Übersicht der Kohorte für die Ataxin-3 Bestimmung in PBMCs

	Kontrollen (n=29)	Präsymptomatisch (n=8)	SCA3 Patienten (n=60)	Homozygoter Patient (n=1)
	Mittelwert (Standardabweichung)	Mittelwert (Standardabweichung)	Mittelwert (Standardabweichung)	
Alter (Jahre)	42 (12.3)	31 (5.8)	52 (10.1)	46
Geschlecht	♂ 17 ♀ 12	♂ 2 ♀ 6	♂ 26 ♀ 34	♂
CAG-Repeats (norm. / exp.)	24 (3.6) / -	20 (6.6) / 70 (1.4)	22 (5.1) / 69 (4)	60/66
Erkrankungsbeginn (AAO in Jahren)	-	-	40 (10.1)	30
Erkrankungsdauer (DD in Jahren)	-	-	12 (7)	16
SARA-Score (Ataxic Scale)	0.5 (0.6)	1 (0.8)	16 (8.4)	23
INAS-Score (Non-Ataxic Scale)	1 (0.8)	2 (1.6)	6 (2.5)	8

AAO= age at onset, DD= disease duration

Leider konnte keine nach Alter und Geschlecht ausgeglichene Kontroll-Kohorte mit den bisher eingegangenen Proben gebildet werden. Die präsymptomatischen Mutationsträger sind erwartungsgemäß statistisch signifikant jünger als die manifest erkrankten Patienten ($p > 0,0001$) und ebenfalls im Mittel 10 Jahre jünger als die Kontroll-Gruppe ($p = 0,0108$). Zudem sind anteilig mehr weibliche Patienten und mehr männliche Kontrollen in der Kohorte eingeschleust (vgl. *Abbildung 29B*). Während der SARA-Score bei präsymptomatischen Mutationsträgern und Kontrollen eine signifikante Abweichung zeigte ($p = 0,0072$) ergab sich beim INAS-Score kein relevanter Unterschied (vgl. *Abbildung 29C/D*).

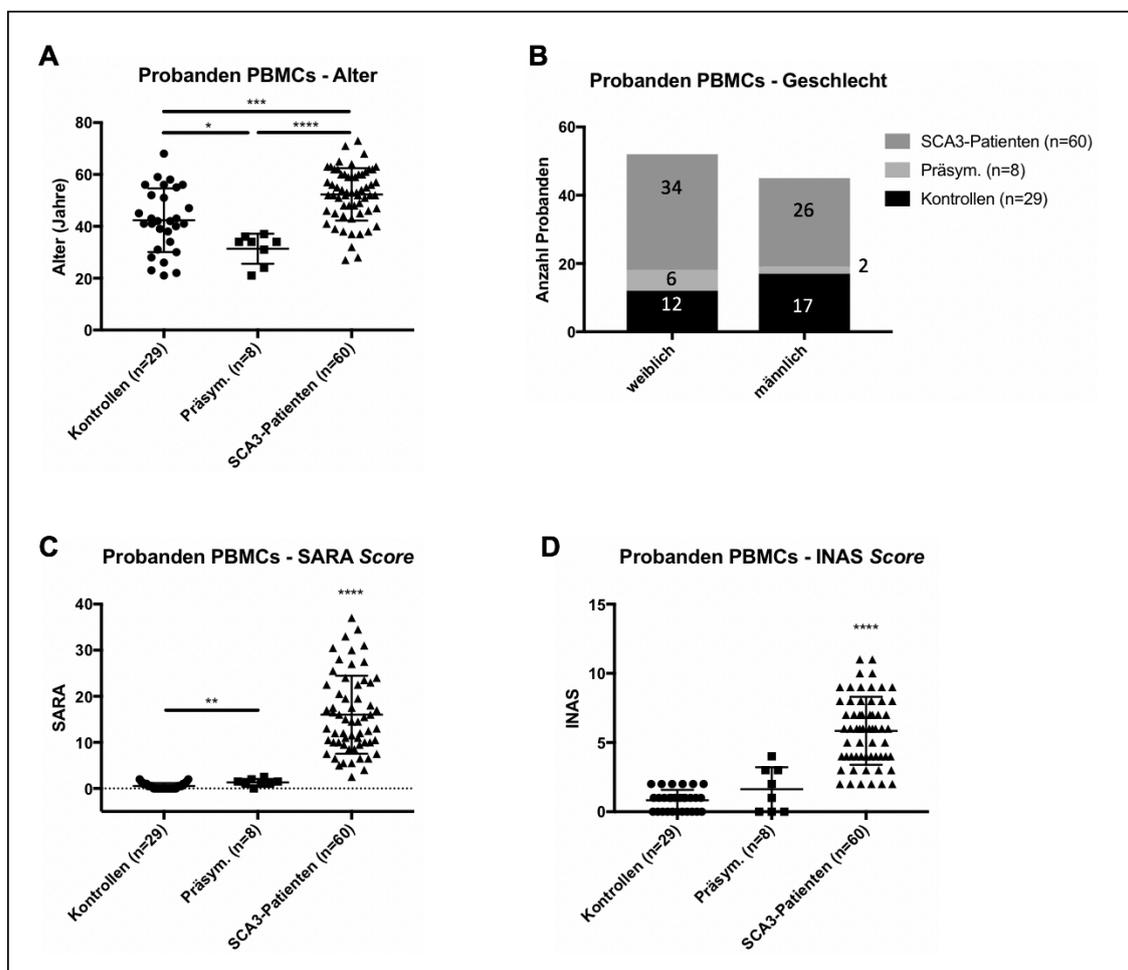


Abbildung 29: Verteilung der analysierten ESMI-Kohorte nach Alter, Geschlecht und Scores

A) Die Kontrollen waren im Mittel 10 Jahre jünger ($p = 0,0003$) als die Patienten. Die präsym. Mutationsträger waren erwartungsgemäß alle unter 40 Jahre alt und somit signifikant jünger als die Kontroll-Gruppe ($p = 0,0108$) und als die Patienten-Gruppe ($p < 0,0001$). B) In der Gruppe der weiblichen Probanden gab es mit 65% SCA3 Patienten und 6 präsym. Mutationsträgern etwas mehr Betroffene, als bei den männlichen Probanden mit nur 57% Patienten und 2 präsym. Mutationsträgern. C) Kontrollen wiesen gegenüber präsym. Mutationsträger bezüglich ihres SARA-Scores statistisch signifikant kleinere Werte auf ($p = 0,0072$). D) Bezüglich des INAS-Scores zeigten sich keine statistisch relevanten Unterschiede zwischen gesunden Kontrollen und präsym. Mutationsträgern, wohingegen die Patienten erwartungsgemäß einen wesentlich höheren Score erreichten ($p < 0,0001$).

3.3.2 Korrelation expandiertes Ataxin-3 mit Alter, Geschlecht, AAO, DD

Um sicher zu stellen, dass keine verzerrenden Effekte wie das Alter der Probanden, deren Geschlecht oder das jeweilige Zentrum, in welchem die Probe initial bearbeitet wurden, einen Einfluss haben, wurde überprüft, ob diese Parameter mit den erhobenen expandierten Ataxin-3 Protein-Leveln, analysiert sowohl mit dem MW1-D2 Assay, als auch dem 1C2-D2 Assay, korrelierten. Es zeigte sich, dass weder bei der Korrelation mit dem Alter der Patienten, noch mit dem Geschlecht, statistisch signifikante Zusammenhänge vorlagen (vgl. *Abbildung 30A/B*). Im Folgenden werden statistisch signifikante Ergebnisse linearer Korrelationen mit einer grünen Linie, nicht signifikante Zusammenhänge mit einer roten Geraden gekennzeichnet. Bei genauerer Betrachtung der Auswertung bezüglich der Messwerte und dem Geschlecht der Patienten zeigte sich bei MW1-D2 ein p -Wert von 0,0511, was nicht signifikant war, aber dennoch die Tendenz anzeigte, dass bei männlichen Patienten etwas mehr Ataxin-3 gemessen wurde. Bei dem 1C2-D2 Assay wurde dieser Effekt nicht ersichtlich, der p -Wert von 0,5887 lässt erkennen, dass Männer und Frauen sehr ausgeglichene Messwerte zeigten. Das nicht expandierte Allel ist allerdings sowohl bei den Frauen der Kohorte, als auch bei den Männern mit durchschnittlich 21 CAG-Repeats gleich lang, womit der Unterschied von MW1-D2 (<15Q) und 1C2-D2 (>37Q) nicht erklärt werden kann.

Statistische Vergleiche der gewonnenen Messwerte aus den jeweiligen Zentren, in welchem die Probe initial bearbeitet wurde, zeigten mit Ausnahme eines Falles keine relevanten Abweichungen von einander (vgl. *Abbildung 31A*). Hierbei handelte es sich um die Analyse mittels des 1C2-D2 Antikörpers, bei welchem die Messwerte der Proben, bereitgestellt von *Zentrum 2*, eine breite Streuung aufwiesen und damit statistisch signifikant von den anderen Messwerten von Proben der anderen 3 Zentren abwichen. Dieser Effekt zeigte sich nicht bei der Analyse mit dem MW1-D2 Antikörper; hier waren die Durchschnittswerte der Messungen aller Proben verschiedener Zentren im vergleichbaren Bereichen von ΔFc -Werten zwischen 50 und 100. Da jedes Zentrum im Verhältnis unterschiedlich viele Patienten- und Kontroll-Proben zu Verfügung gestellt hat,

wurden auch in dieser Auswertung nur die Ataxin-3 Level der Patienten berücksichtigt.

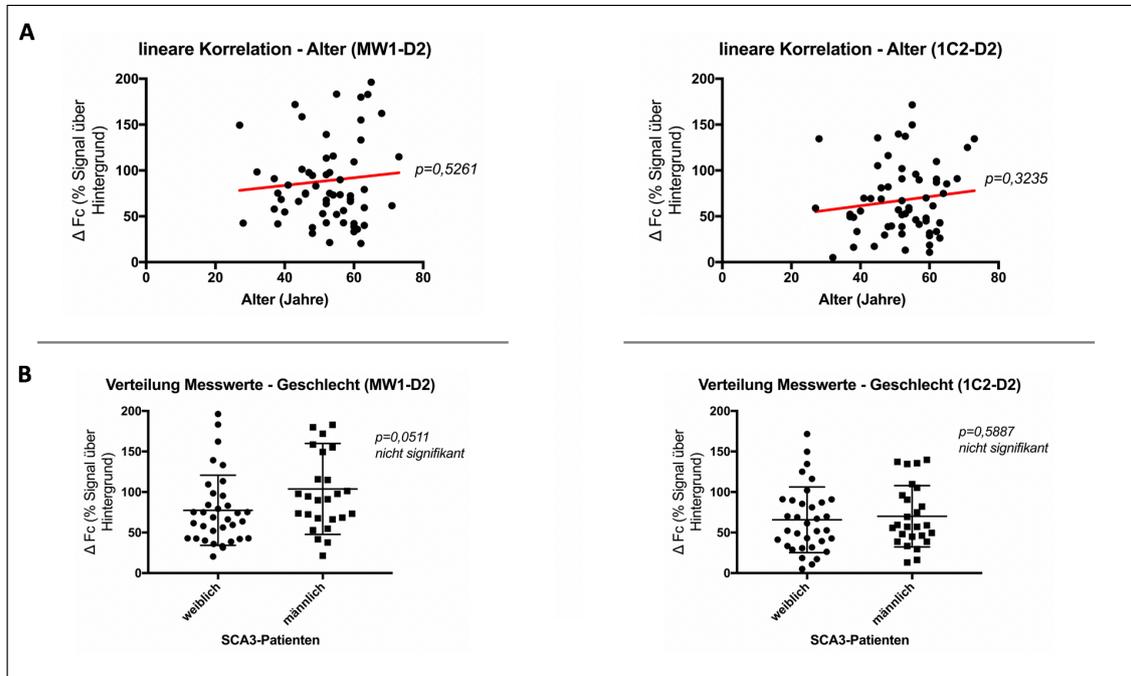


Abbildung 30: Ataxin-3 Level in Korrelation zu Alter und Geschlecht aller analysierten Patienten-PBMCs

A) Es bestand kein signifikanter linearer Zusammenhang zwischen dem Alter der Patienten und den gemessenen Protein-Leveln (rote Linie, MW1-D2 $p=0,5261$, 1C2-D2 $p=0,3235$). B) Die Verteilung der Ataxin-3 Messwerte der Patienten aufgetrennt nach Geschlecht war bei beiden Antikörpern nicht statistisch signifikant unterschiedlich. Es zeigten sich aber für den MW1-D2 Assay bei männlichen SCA3-Patienten tendenziell höhere Ataxin-3 Protein Messwerte ($p=0,0511$). Bei den Messungen mittels Antikörper 1C2-D2 waren die Ergebnisse für die expandierte Ataxin-3 Messung ausgeglichen ($p=0,5887$).

Unterteilt man die analysierten PBMC-Proben nach der Messung in die Eingruppierung Kontrollen, präsymptomatische Mutationsträger und manifest erkrankte Patienten, so lässt sich eine klare Differenzierung von Kontrollen und Patienten erkennen (vgl. *Abbildung 31B*). Diese Auswertung belegt, dass die Detektion des expandierten Ataxin-3 Proteins mittels des TR-FRET Assay durchführbar ist. Erwartungsgemäß zeigte sich eine statistisch hoch signifikante ($p < 0,0001$) Trennung zwischen den Werten der gesunden Kontrollen und den Mutationsträgern für beide Antikörper MW1-D2 (links) und 1C2-D2 (rechts).

Eine Differenzierung zwischen präsymptomatischen und symptomatischen Mutationsträgern war hingegen nur bei Verwendung des MW1-D2 Antikörpers

statistisch signifikant möglich ($p=0,0125$). Bei Verwendung des 1C2-D2 Assays zeigte sich diesbezüglich kein signifikanter Unterschied ($p=0,0572$), aber auch hier zeigten präsymptomatische Mutationsträger tendenziell kleinere Messwerte und somit weniger Ataxin-3 Protein als die Patienten. Die gemessenen Ataxin-3 Konzentrationen für den homozygoten Mutationsträger lagen nahe des Mittelwertes der Gesamtkohorte von heterozygoten symptomatischen SCA3 Patienten (Punkt-Markierung im Graphen).

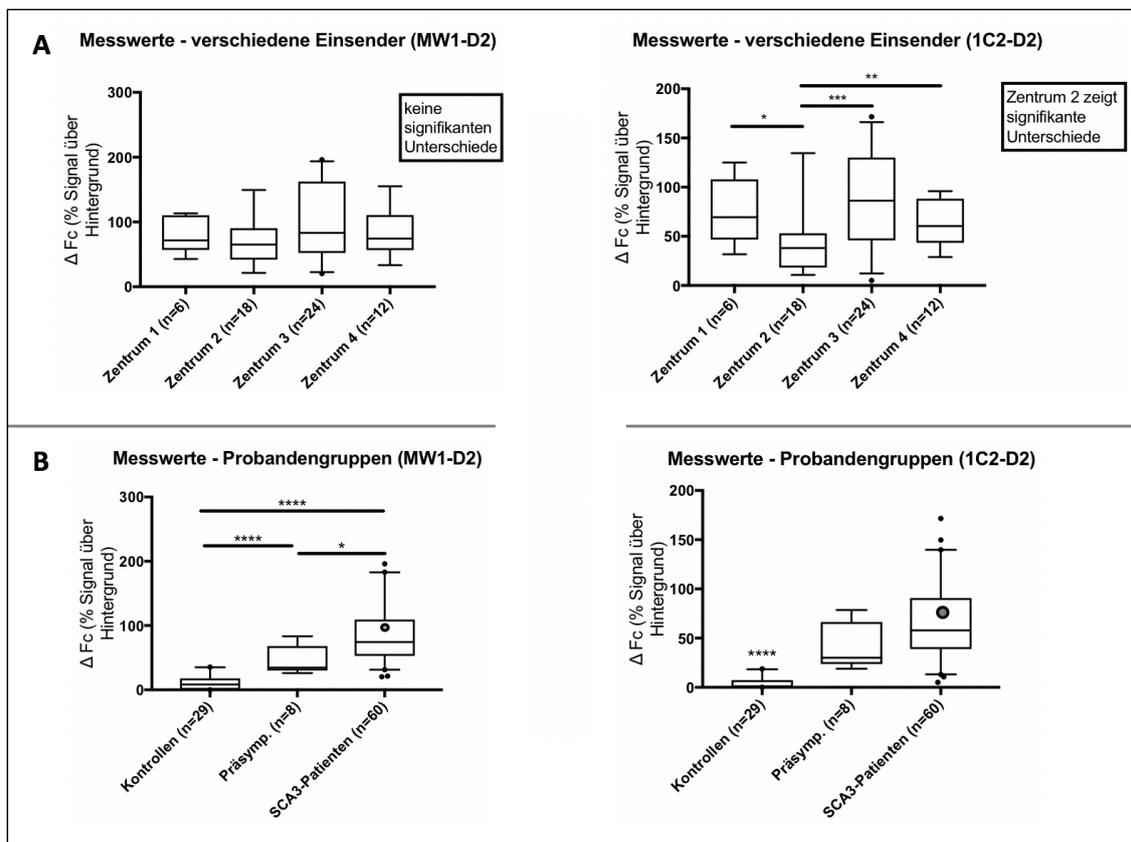


Abbildung 31: Vergleich der Ataxin-3 Level zwischen den verschiedenen Genotypen und Zentren

A) Werden die Messwerte der Patienten-Proben nach den verschiedenen Zentren, in welchen die Proben abgenommen wurden, eingeteilt, zeigten sich lediglich bei 1C2-D2 für Zentrum 2 signifikant niedrigere Ataxin-3 Level im Vergleich zu den anderen Gruppen. Es ergaben sich folgende p -Werte: Unterschied Zentrum 2 zu Zentrum 1 $p=0,0224$, zu Zentrum 3 $p=0,0050$ und zu Zentrum 4 $p=0,0077$. Ansonsten bestand keine Anhängigkeit von Zentrum und gemessenen Protein-Leveln. B) Es zeigte sich für beide Antikörper MW1-D2 und 1C2-D2 eine deutliche Unterscheidung zwischen Kontrollen, präsymptomatischen Mutationsträgern und Patienten. Während bei der Detektion mit 1C2-D2 kein signifikanter Unterschied zwischen manifest erkrankten und präsymptomatischen Mutationsträgern vorlag, ist bei MW1-D2 eine deutlichere Unterscheidung dieser beider Gruppen erkennbar. Erwartungsgemäß zeigten die Kontrollen in beiden Messungen (MW1-D2 und 1C2-D2) höchst signifikant niedrigere Proteinkonzentrationen zu präsymptomatischen Mutationsträgern und Patienten ($p<0,0001$).

Um zu bewerten, ob expandiertes Ataxin-3 Protein als ein möglicher Progressions-, bzw. Verlaufsmarker relevant sein könnte, wird im Folgenden das gemessene Protein-Level mit dem Erkrankungsbeginn und der Erkrankungsdauer der Patienten verglichen. Leider konnten im Zeitraum dieser Arbeit noch keine *Follow-up* Proben der Kohorte bereitgestellt werden, aber eine solche Analyse ist im ESMI-Projekt ebenfalls vorgesehen und wird in naher Zukunft erfolgen.

Tendenziell zeigte sich, dass Patienten mit frühem Erkrankungsbeginn (vor dem 30. Lebensjahr) ein durchschnittlich höheres Ataxin-3 Level aufwiesen, als später erkrankte Probanden (vgl. *Abbildung 32A*). Patienten mit einem sehr späten Erkrankungsbeginn (über 51 Jahre) zeigten im Mittel höhere Messwerte, wobei allerdings hier die geringere Gruppenstärke von nur $n=9$ beachtet werden muss und die Werte insgesamt stark streuten. Statistisch signifikante Unterschiede zeigten sich nur bei den Messungen mit dem Antikörper MW1-D2 zwischen den präsymptomatischen Mutationsträgern und den Patienten mit einem mittleren Erkrankungsalter zwischen 30-40 Jahren ($p= 0,0207$) und 40-50 Jahren ($p= 0,0300$) (vgl. *Abbildung 32A*).

Bei der Einteilung in Bezug zur Erkrankungsdauer sind die Ergebnisse für die Assays MW1-D2 und 1C2-D2 von einander abweichend und uneinheitlich (vgl. *Abbildung 32B*). Während bei MW1-D2 länger erkrankte Patienten (Erkrankungsdauer über 20 Jahre) im Mittel niedrigere Level aufwiesen, zeigte sich bei Messungen mit 1C2-D2 ein gegenteiliger Effekt. Allerdings ist auch hier die Untergruppe der sehr lang erkrankten Patienten mit $n=5$ zu klein und die Streuung der Messwerte zu groß, um sichere Schlussfolgerungen treffen zu können.

Statistisch signifikante Unterschiede ergaben sich bei der Auswertung der Erkrankungsdauer mit den gemessenen expandierten Ataxin-3 Protein-Leveln nur bei dem MW1-D2 Assay. So zeigten die präsymptomatischen Mutationsträger im Vergleich zu den Patienten mit Erkrankungsdauer bis einschließlich 10 Jahren geringere Ataxin-3 Protein-Level ($p= 0,0221$) und ebenfalls zu den Patienten mit einer Erkrankungsdauer zwischen 11-20 Jahren ($p= 0,0077$) (vgl. *Abbildung 32B*).

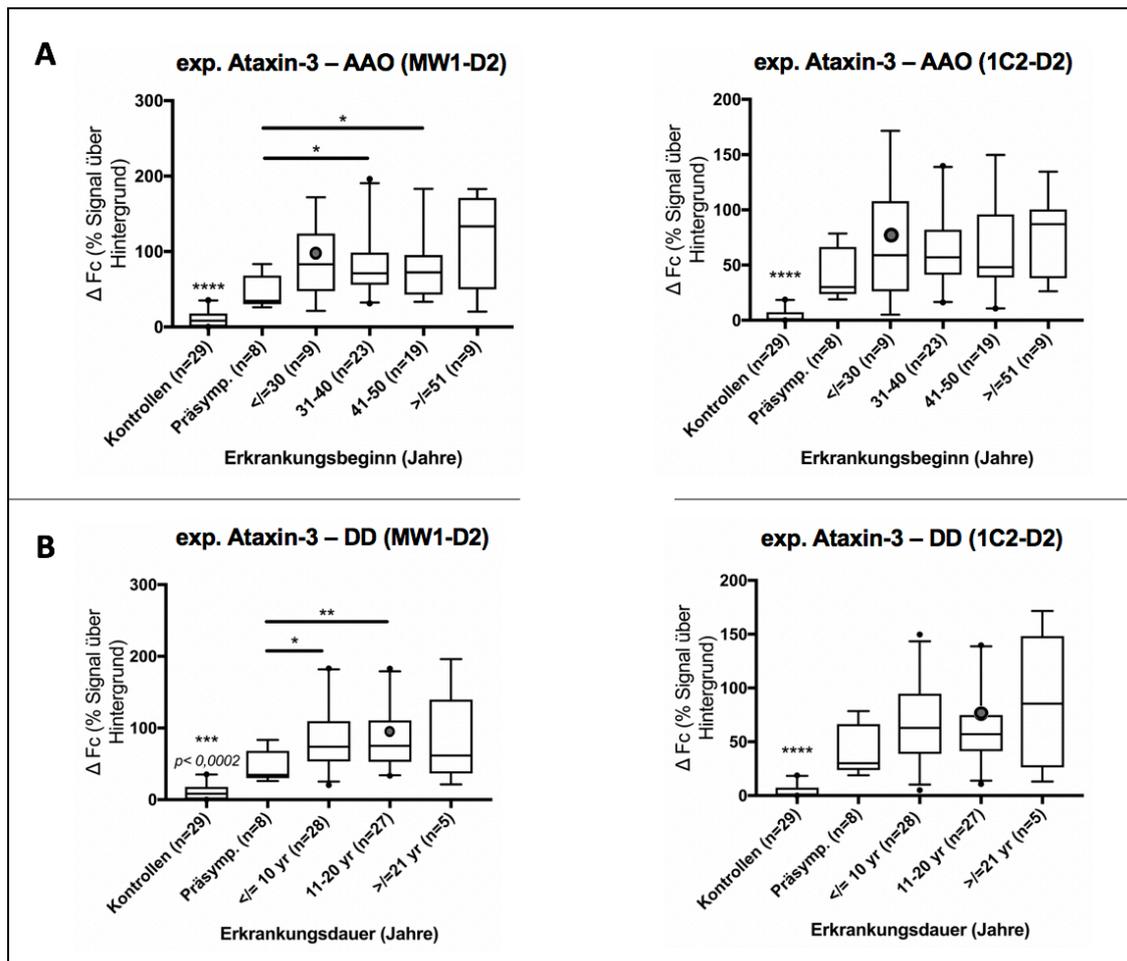


Abbildung 32: Ataxin-3 Level in Korrelation zu Erkrankungsbeginn und Erkrankungsdauer

A) Die Einteilung der Patienten gemäß ihres Krankheitsbeginns zeigte bei beiden Assays bei frühem Beginn der Symptome (unter 30 Jahre) ein durchschnittlich höheres Ataxin-3 Level, als bei Patienten deren AAO um das 40 Lebensjahre datiert war. In der Gruppe der spät erkrankten Patienten (über 51 Jahre) streuten die gemessenen Werte sehr stark. B) Betrachtet man die Erkrankungsdauer, so unterschieden sich die beiden Ergebnisse für MW1-D2 und 1C2-D2 von einander, besonders im Hinblick auf die Gruppe der sehr lang erkrankten Patienten. Der homozygote SCA3 Patient (Punkt) lag jeweils in seiner Untergruppe der entsprechenden heterozygoten Patienten in diesen Analysen leicht über deren Mittelwert bezüglich des Ataxin-3 Protein-Levels. AAO = Age at onset, Erkrankungsbeginn; DD= Disease Duration, Erkrankungsdauer

Die lineare Korrelation der gemessenen Ataxin-3 Protein-Level mit dem Erkrankungsbeginn (*Age at onset*, AAO) und der Erkrankungsdauer (*Disease Duration*, DD) der Patienten ergab keine statistisch signifikanten linearen Zusammenhänge (vgl. *Abbildung 33*). Die ermittelten p -Werte lagen für den MW1-D2 Assay bei $p= 0,4670$ (AAO) und $p= 0,8773$ (DD) und für den 1C2-D2 Assay bei $p= 0,8916$ (AAO) und $p= 0,2759$ (DD).

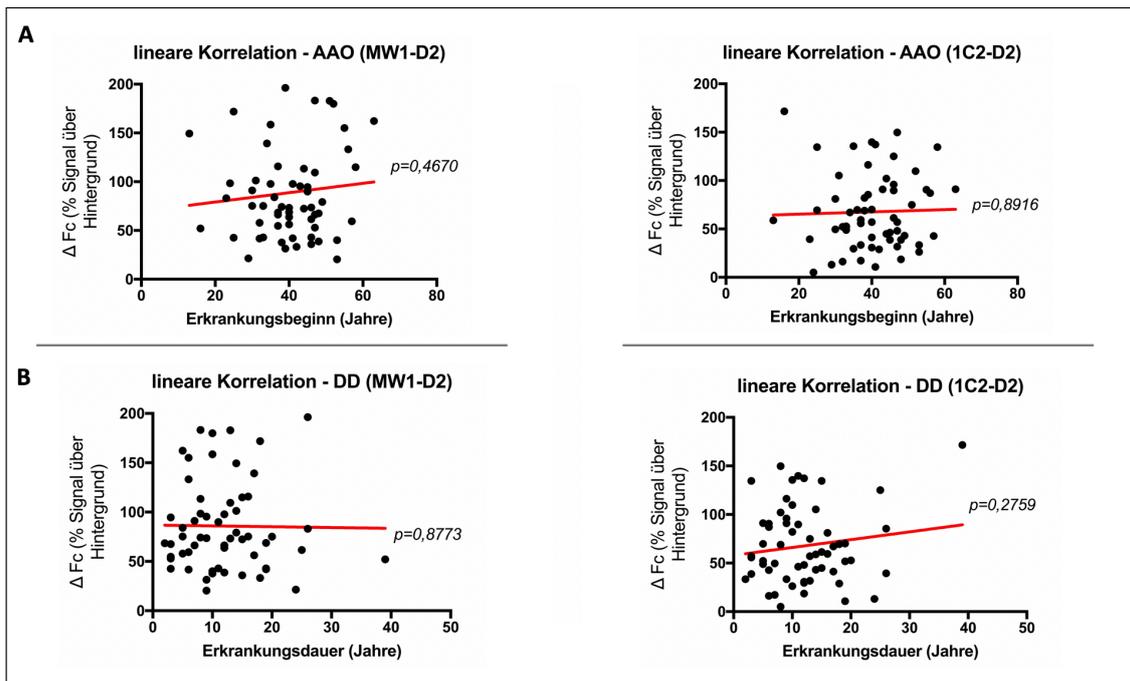


Abbildung 33: Untersuchung linearer Zusammenhänge zwischen Ataxin-3 Protein-Level und Erkrankungsbeginn und Erkrankungsdauer

Eine lineare Korrelation zwischen den gemessenen expandierten Ataxin-3 Leveln und dem Erkrankungsbeginn (*Age at onset*, AAO) (A) oder der Erkrankungsdauer (*Disease Duration*, DD) (B) ergab keinen signifikanten Zusammenhang.

3.3.3 Korrelation expandierte Ataxin-3 Protein-Level mit klinischen Scores

Für die Evaluation des Potenzials des Ataxin-3 Protein-Levels in PBMCS als Biomarker zu fungieren, ist der Vergleich mit etablierten klinischen Scores zur Bewertung des Krankheitsstadiums unverzichtbar (*vgl. Kapitel 1.4 Biomarker und relevante klinische Scores*). Die Auswertung zwischen den gemessenen expandierten Ataxin-3 Leveln und den klinischen Scores SARA und INAS zur Bewertung der aktuellen Schwere des Erkrankungsstadiums, zeigte statistisch relevante lineare Korrelationen mit *p*-Werten zwischen 0,02 und 0,03 (*vgl. Abbildung 34B, Abbildung 35B*). Diese Beobachtung traf sowohl für die Messungen mit MW1-D2, als auch für die Quantifizierung mit 1C2-D2 zu, wobei bei der Auswertung des SARA Scores die Proportionalität nur bis zu Werten von 24 Score-Punkten gegeben war (>24 schwer erkrankt). Die genauere Betrachtung der Auswertung für den SARA-Score zeigte, dass zwischen

Kontrollen und Mutationsträgern ein hoch signifikanter Unterschied mit $p < 0,0001$ bei beiden Assays (MW1-D2 und 1C2-D2) vorlag (vgl. *Abbildung 34A*). Bei den leicht (3-12) und moderat (13-24) betroffenen SCA3 Patienten zeigte sich ein signifikanter Unterschied zu der Gruppe der präsymptomatischen Mutationsträger mit einem SARA unter 3 von $p = 0,0182$ und $p = 0,0091$ für dem MW1-D2 Antikörper. Die Detektion mit 1C2-D2 ergab einen signifikanten Unterschied zwischen präsymptomatischen Mutationsträgern (SARA < 3) und der Gruppe mit moderatem SARA von 13-24 ($p = 0,0462$). Bei beiden Assays fällt auf, dass die gemessenen Werte des löslichen expandierten Ataxin-3 Proteins in der Gruppe der schwer betroffenen SCA3 Patienten (> 24) wieder sanken.

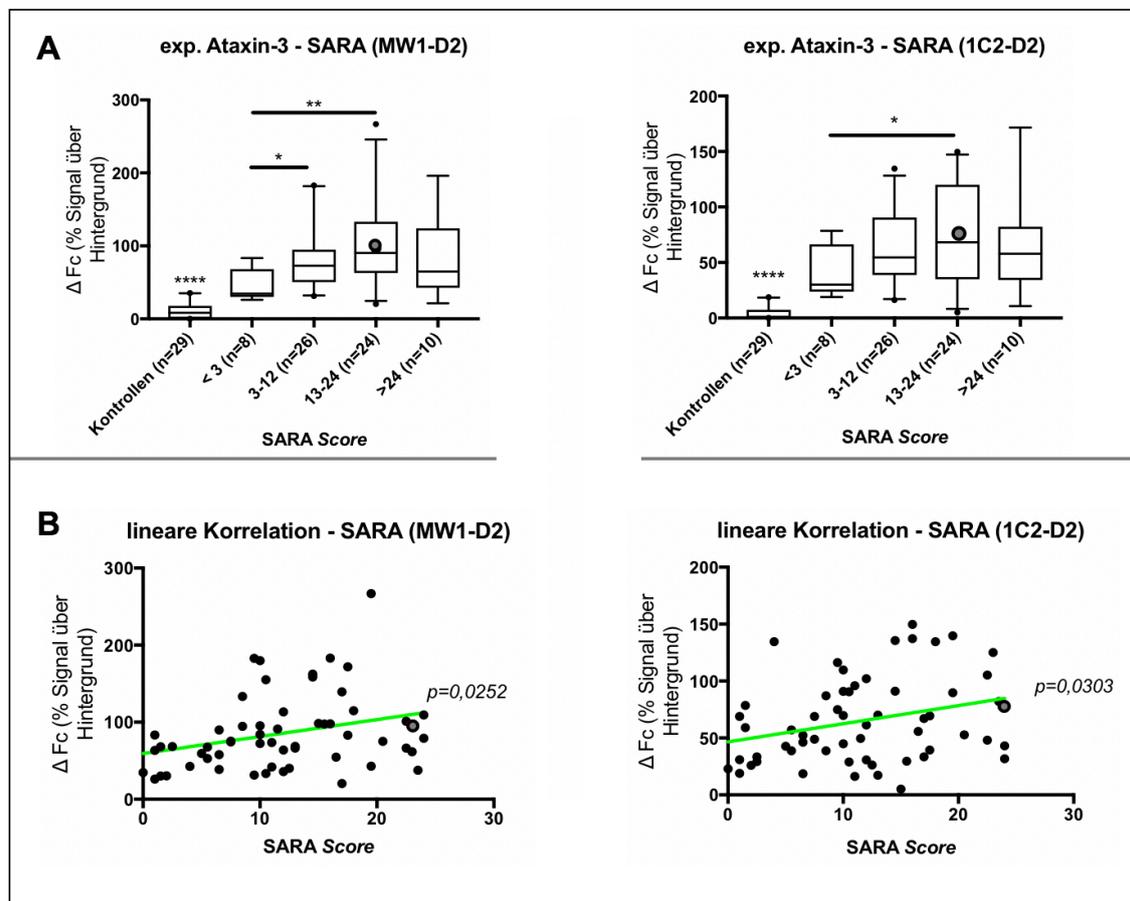


Abbildung 34: Korrelation zwischen SARA-Score und expandiertem Ataxin-3 Level

A) Bei den Gruppen mit einem SARA-Score bis einschließlich 24 (leicht bis moderat betroffenen Patienten) zeigte sich ein progredienter Anstieg der gemessenen Ataxin-3 Level. In der Gruppe der schwer betroffenen Patienten mit einem SARA über 24 sanken die gemessenen Protein-Level wieder ab. B) zeigte die lineare Korrelation zwischen SARA Werten bis 24 und den dazu gehörigen Ataxin-3 Protein-Leveln. Für MW1-D2 konnte eine signifikante Korrelation von $p = 0,0252$ und für 1C2-D2 von $p = 0,0303$ ermittelt werden.

Ähnliche Zusammenhänge ergab die Korrelation der Messwerte des expandierten Ataxin-3 Proteins zum INAS-Score. Für beide Antikörper zeigte sich eine relevante lineare Beziehung zwischen den Ataxin-3 Proteinkonzentrationen und dem INAS-Score bei Betrachtung der SCA3 Patienten mit $p=0,020$ bei MW1-D2 und $p=0,0230$ für den 1C2-D2 Assay (vgl. *Abbildung 35B*). Die detaillierte Betrachtung der Untergruppen zeigte beim MW1-D2 Antikörper einen statistisch signifikanten Unterschied der Messwerte zwischen Patienten mit INAS-Score 0-2 und 5-6 ($p=0,0108$), 7-8 ($p=0,0310$), sowie 9-11 ($p=0,0056$) (vgl. *Abbildung 35A*). Die Detektion mit 1C2-D2 ergab einen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe mit INAS 0-2 und der Gruppe mit 5-6 ($p=0,0246$).

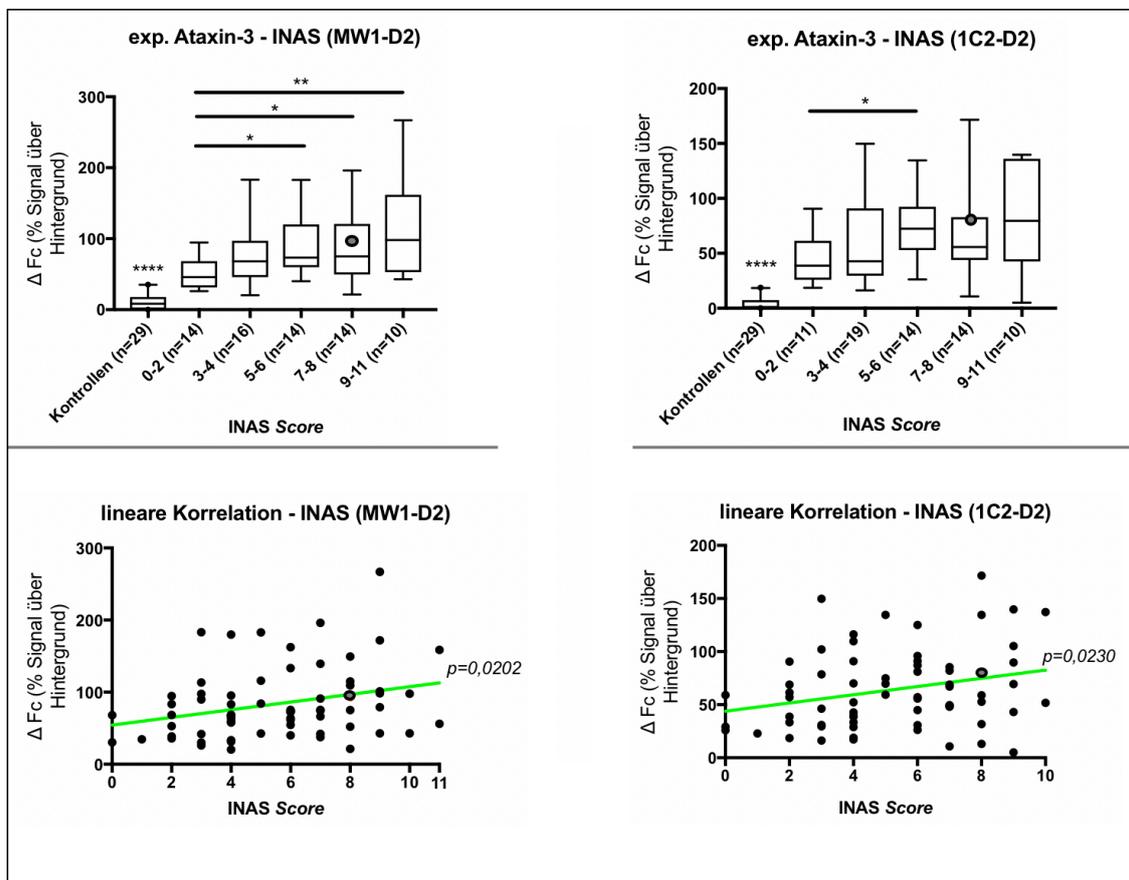


Abbildung 35: Korrelation zwischen INAS-Score und expandiertem Ataxin-3 Level

A) Die gemessenen Ataxin-3 Level stiegen bei höherem INAS-Score zunehmend an. Dieser Effekt zeigte sich bei beiden Assays, wobei bei MW1-D2 signifikant höhere Protein-Level bei den Gruppen mit INAS 5-6 ($p=0,0108$), 7-8 ($p=0,0310$) und 9-11 ($p=0,0056$) im Vergleich zur Gruppe der leicht symptomatischen Patienten (INAS 0-2) vorlag. Bei 1C2-D2 war nur der Unterschied zwischen den Gruppen mit INAS 0-2 und 5-6 statistisch relevant ($p=0,0246$). B) Es zeigte sich ein statistisch signifikanter linearer Zusammenhang zwischen steigenden INAS-Score und höheren expandierten Ataxin-3 Leveln für MW1-D2 ($p=0,0202$) und 1C2-D2 ($p=0,0230$).

Der kombinierte Score aus Erkrankungsbeginn und Erkrankungsdauer, auch *Cross Sectional Disease Progression Score* (CSDP) genannt, zeigte keinen nachvollziehbaren Zusammenhang mit den jeweiligen Ataxin-3 Messwerten und war bei den beiden Antikörpern uneinheitlich (vgl. *Abbildung 36*).

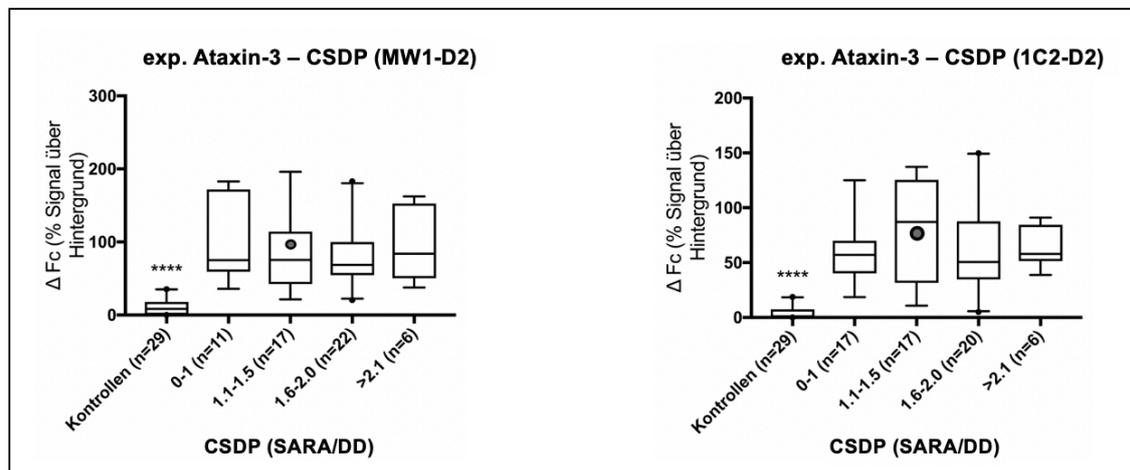


Abbildung 36: Korrelation zwischen dem *Cross sectional disease progression* (CSDP) Score und exp. Ataxin-3 Level

Der Quotient aus Erkrankungsschwere (SARA-Score) und Erkrankungsdauer (DD) CSDP zeigte keine einheitlichen Ergebnisse im Vergleich der beiden Antikörper MW1-D2 und 1C2-D2. Die Mittelwerte der eingeteilten Gruppen zeigten keine Tendenz für einen linearen Zusammenhang zwischen Protein-Level und steigendem Score.

3.3.4 Korrelation exp. Ataxin-3 mit der expandierten CAG-Länge und der Zeit zwischen Nahrungsaufnahme und Blutabnahme

Die *CAG-Repeat*-Längen aller SCA3 Patienten, präsymptomatischen Mutationsträgern und Kontrollen der ESMI-Kohorte wurden einheitlich neu in unserem Institut durch die Doktoranden Gabriele Anna Kaucher und Patrik Pelz mit Unterstützung von der MTA Frau Alexandra Grenzendorf bestimmt. Die Auswertung der *CAG-Repeats* in Korrelation zum Ataxin-3 Protein-Level zeigte lediglich für die Gruppe der Patienten mit kleineren expandierten *CAG-Repeats* (57-64 CAGs) im Mittel geringere Ataxin-3 Level im Vergleich zu den Patienten mit *CAG-Repeats* über 65 mit einem p -Wert von 0,0341 (vgl. *Abbildung 37A*). Allerdings gilt es hier zu beachten, dass in dieser Kohorte lediglich 10 Patienten mit solchen kurzen *CAG-Repeat*-Längen analysiert wurden. Da gesunde

Kontrollen nicht über ein pathologisch expandiertes Ataxin-3 Allel verfügen, wurde zu Vergleichs- und Analysezwecken hier das Allel mit der längeren CAG-Sequenz betrachtet. Das dabei längste ermittelte CAG-Repeat bei gesunden Probanden dieser Kohorte wies eine Länge von 28 CAG-Repeats auf. Es wäre somit für den Antikörper MW1-D2 (>15Q) detektierbar und für 1C2-D2 (>37Q) nicht erkennbar.

Die Korrelation der analysierten CAG-Repeat-Längen mit den gemessenen Ataxin-3 Protein-Leveln ergab keine signifikante proportionale Korrelation. Es ergab sich für MW1-D2 $p=0,3301$ und 1C2-D2 $p=0,3697$ (vgl. Abbildung 37B).

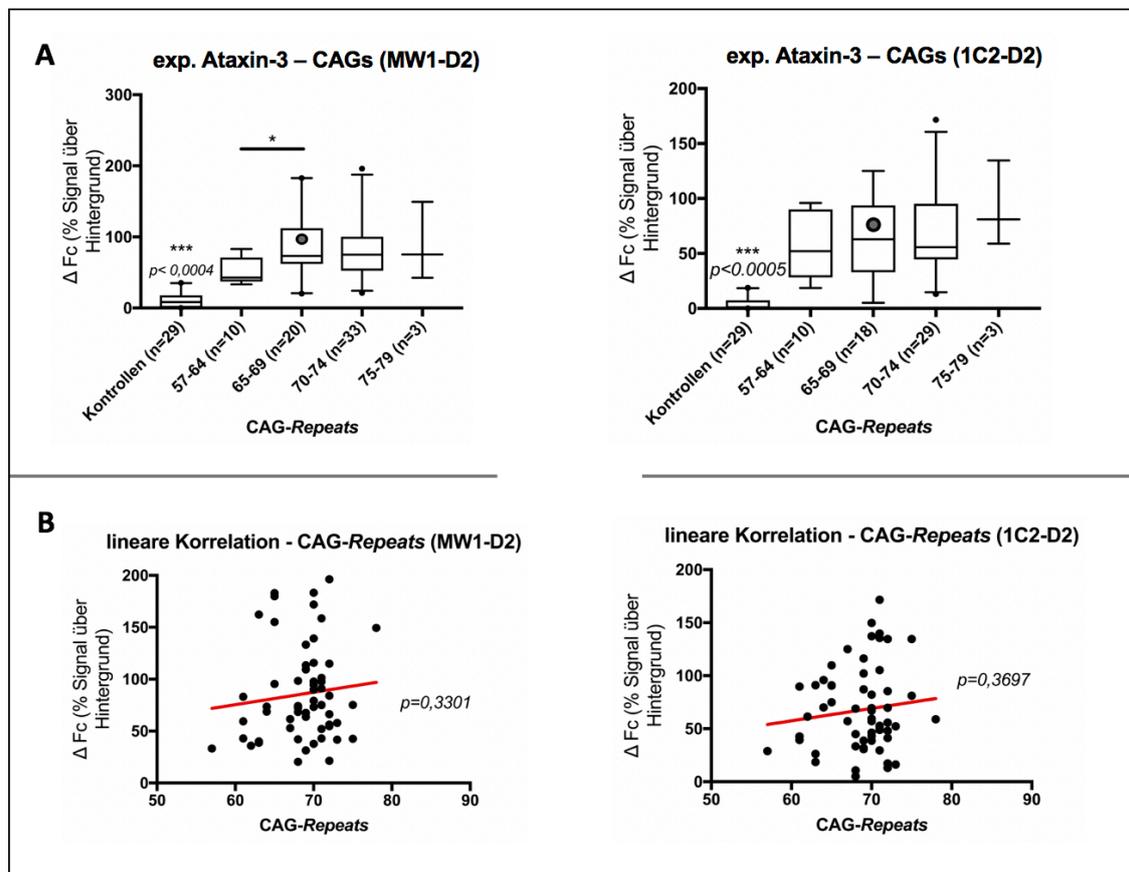


Abbildung 37: Korrelation zwischen der CAG-Repeat-Länge und den exp. Ataxin-3 Leveln

A) Patienten mit kürzeren CAG-Repeat-Längen (<65) zeigten im Mittel geringere Ataxin-3 Level als die Gruppe der Patienten zwischen 65 und 69 CAG-Repeats. Bei Patienten mit über 70 CAG-Repeats zeigten sich Ataxin-3 Protein-Level, wie sie auch in der Gruppe 65-69 detektiert werden konnten. B) Es bestand kein proportionaler Zusammenhang zwischen den ermittelten CAG-Repeat-Längen und den gemessenen expandierten Ataxin-3 Werten (MW1-D2 $p=0,3301$ und 1C2-D2 $p=0,3697$).

Da frühere Etablierungen des TR-FRET Assays zur Ataxin-3 Messung in PBMCs Hinweise ergaben, dass der Zeitpunkt der letzten Nahrungsaufnahme vor der Blutabnahme einen Einfluss auf die späteren gemessenen Protein-Level nehmen könnte, wurde im Rahmen des ESMI-Projekts der Zeitpunkt der letzten Nahrungsaufnahme vor Blutabnahme, falls möglich, erhoben. Der aus früheren Studien ermittelte Zusammenhang zwischen Ataxin-3 Level in den PBMC-Proben und dem Einfluss der Nahrungsaufnahme vor der Blutabnahme zeigte sich nicht in der Gegenüberstellung der Protein-Level und der Nüchtern-Zeit (MW1-D2 $p=0,1768$, 1C2-D2 $p=0,7706$, vgl. *Abbildung 38*). Allerdings wurden nur von 68% aller Probanden die Zeiten der Nahrungsaufnahme dokumentiert. Im Fall dieser Kohorte scheint man die Zeit der Nahrungsaufnahme vernachlässigen zu können, aber für ein einheitliches Studiendesign zum Ausschluss eines potenziellen Bias ist die Blutabnahme im nüchternen Zustand (8 h Nahrungskarenz) zu bevorzugen.

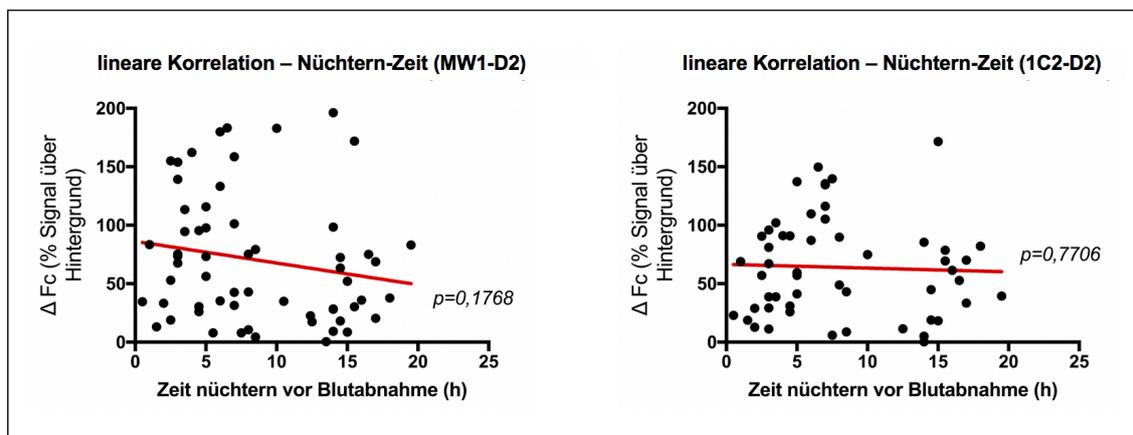


Abbildung 38: Untersuchung der Abhängigkeit der Messwerte von der Nüchtern-Zeit vor der Blutabnahme

Die Angaben zur letzten Mahlzeit vor der Blutabnahme wurde nicht für alle Probanden übermittelt oder erhoben ($n=78$ statt 98). Die Korrelation der vorhandenen Nüchtern-Zeit Angaben in Stunden mit den Ataxin-3 Proteinkonzentrationen zeigte jedoch hier keinen signifikanten Zusammenhang.

3.3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse Teil B (Ataxin-3 Messungen)

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Auswertungen und Korrelationen der gemessenen expandierten Ataxin-3 Protein-Level mit den klinischen Daten der

ESMI-Probanden tabellarisch für beide Assays dargestellt (vgl. *Tabelle 21*).

Tabelle 21: Zusammenfassung der Ergebnisse Teil B

Klinischer Parameter	Ataxin-3 Level mit MW1-D2 Assay	Ataxin-3 Level mit 1C2-D2 Assay
Alter	Keine lineare Korrelation zwischen Alter der Patienten und exp. Ataxin-3 Level, $p=0,5261$	Keine lineare Korrelation zwischen Alter der Patienten und exp. Ataxin-3 Level, $p=0,3235$
Geschlecht	Bei männlichen Patienten tendenziell höhere exp. Ataxin-3 Level als bei weiblichen, aber nicht statistisch signifikant mit $p=0,0511$	Ausgewogene Verteilung der exp. Ataxin-3 Level bei weiblichen und männlichen SCA3-Patienten, nicht statistisch signifikant mit $p=0,5887$
Zentrum der Proben-Bearbeitung	Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Einsendern	Ein Zentrum zeigte eine breite Streuung der Messwerte und signifikante Unterschiede zu den anderen Einsendern ($p=0,0224-0,0077$)
Erkrankungsbeginn (AAO)	Keine lineare Korrelation zwischen AAO und Ataxin-3 Level, $p=0,4670$ Präsymptomatische Mutationsträger zeigten signifikant niedrigere Ataxin-3 Level als Patienten mit einem mittleren AAO (40+/-10 Jahre). $p=0,027-0,0300$	Keine lineare Korrelation zwischen AAO und Ataxin-3 Level, $p=0,8916$ Patienten mit einem frühen AAO (unter 30 Jahren) zeigten tendenziell höhere exp. Ataxin-3 Level im Vergleich zu Patienten mit mittlerem Erkrankungsbeginn.
Erkrankungsdauer (DD)	Keine lineare Korrelation zwischen DD und Ataxin-3 Level, $p=0,8773$	Keine lineare Korrelation zwischen DD und Ataxin-3 Level, $p=0,2759$
SARA-Score	Lineare Korrelation zwischen SARA (bis 24) und exp. Ataxin-3 Level $p=0,0252$ Bei Patienten mit schwerem Erkrankungsstadium (SARA >24) sanken die löslichen Protein-Level wieder ab	Lineare Korrelation zwischen SARA (bis 24) und exp. Ataxin-3 Level $p=0,0303$ Bei Patienten mit schwerem Erkrankungsstadium (SARA >24) sanken die löslichen Protein-Level wieder ab
INAS-Score	Lineare Korrelation zwischen INAS und exp. Ataxin-3 Level, $p=0,0202$	Lineare Korrelation zwischen INAS und exp. Ataxin-3 Level, $p=0,0230$
CSDP-Score (SARA/DD)	Keine signifikanten Zusammenhänge zwischen CSDP und exp. Ataxin-3 Level	Keine signifikanten Zusammenhänge zwischen CSDP und exp. Ataxin-3 Level
CAG-Repeat-Länge	Keine lineare Korrelation zwischen CAG- <i>Repeats</i> und Ataxin-3 Level, $p=0,3301$ Patienten mit sehr kurzen CAG-Längen (57-64) zeigten geringere Protein-Level im Vergleich zu Patienten mit 65-69 CAG- <i>Repeats</i> ($p=0,0341$)	Keine lineare Korrelation zwischen CAG- <i>Repeats</i> und Ataxin-3 Level, $p=0,3697$
Nüchtern-Zeit vor Blutabnahme (h)	Keine lineare Korrelation zwischen Nüchtern-Zeit und Ataxin-3 Level, $p=0,1768$	Keine lineare Korrelation zwischen Nüchtern-Zeit und Ataxin-3 Level, $p=0,7706$

3.4 Teil C: Ergebnisse der Analyse der CAG-Repeat-Längen und Polymorphismen

3.4.1 Übersicht der Kohorte für CAG-Repeat Längenbestimmung

Im Zeitraum dieser Arbeit konnte von 118 ESMI-Probanden EDTA-Blut bereitgestellt werden, welches dann zur DNA-Gewinnung und anschließend zur Bestimmung der CAG-Repeat-Längen verwendet wurde. Bei 10 Teilnehmern waren die klinischen Daten unvollständig und bei 2 Analysen blieb die Bestimmung der CAG-Repeat-Längen trotz mehrmaliger Wiederholung unklar. Somit ergab sich eine Kohorte von 106 Teilnehmern mit 31 Kontrollen, 8 präsymptomatischen Mutationsträgern und 66 symptomatischen SCA3 Patienten, sowie einem homozygot betroffenen Patienten (vgl. Tabelle 22).

Tabelle 22: Übersicht der Kohorte für die Analyse der CAG-Repeat-Längen

	Kontrollen	Präsymptomatisch	SCA3 Patienten	Homozygoter Patient
CAG-Repeat Analyse	31	8	66	1
unvollständige klinische Daten	3	-	7	
unklarer Status	-	-	2	
Gesamt	34	8	75	1

3.4.2 Übersicht der Kohorte für die Polymorphismen Bestimmung

Die gewonnene DNA der Probanden wurde zusätzlich zur Bestimmung von einzelnen bekannten Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) genutzt. Untersucht wurden 3 SNPs im *PARK2* Gen (rs1801474, rs1891582, rs1801334) und 3 weitere SNPs im *ATXN3* Gen (rs1048755, rs12895357, rs7158733). Diese Polymorphismen sind im Kapitel 1.6 *Polymorphismen als modulierende Faktoren* genauer beschrieben. Es konnte nur ein kleiner Teil der Kohorte untersucht werden, da das momentan gewählte Verfahren zur Bestimmung der SNPs mittels PCR und spätere Sequenzierung recht fehleranfällig und sehr arbeitsintensiv war. Ein Beispiel des PCR-Produktes zeigt *Abbildung 39B*. Die bisher analysierte Kohorte ist in den *Tabellen 23 und 24* dargestellt. Besonders die PCR zur Analyse der beiden SNPs im *ATXN3* Gen, welche hinter dem Polyglutamin-

Bereich liegen, zeigte häufiger fehlerhafte Ergebnisse, da die Arbeit der Polymerase durch die *CAG-Repeats* erschwert wurde. Es konnte dann keine Auftrennung der beiden Allele im Gel erzielt werden (vgl. *Abbildung 39C*).

Tabelle 23: Übersicht der Kohorte zur Bestimmung von SNPs

Spalte 1 und 2 zeigen die Aufteilung der 35 Probanden nach Kontrolle oder SCA3-Patient, Spalte 3 und 4 zeigen die Aufteilung der 35 analysierten Probanden nach dem jeweiligen Einsender-Zentrum.

	Kontrollen	SCA3 Patienten	davon Zentrum 1	davon Zentrum 3
Polymorphismen	8	21	8	23
unvollständige klinische Daten	-	3	3	-
kein CPT Blut erhalten	-	2	-	2
PBMC Pellet zu klein	-	1	-	1
Gesamt	8	27	10	25
		35	35	

Tabelle 24: Anzahlen der analysierten Probanden bezüglich bestimmter SNPs

	SNP Varianten	Kontrollen	SCA3 Patienten
Polymorphismen Analyse		8	27
SNP <i>PARK2</i> Exon 4	G ⁶⁰¹ /A ⁶⁰¹	7	22
SNP <i>PARK2</i> Exon 10	G ¹²³⁹ /C ¹²³⁹	6	24
SNP <i>PARK2</i> Exon 11	G ¹²⁸¹ /A ¹²⁸¹	7	25
SNP <i>ATXN3</i> Exon 8	A ⁶⁶⁹ /G ⁶⁶⁹	6	24
SNP <i>ATXN3</i> Exon 10	G ⁹⁸⁷ /C ⁹⁸⁷	5	17
SNP <i>ATXN3</i> Exon 10	C ¹¹¹⁸ /A ¹¹¹⁸	5	17

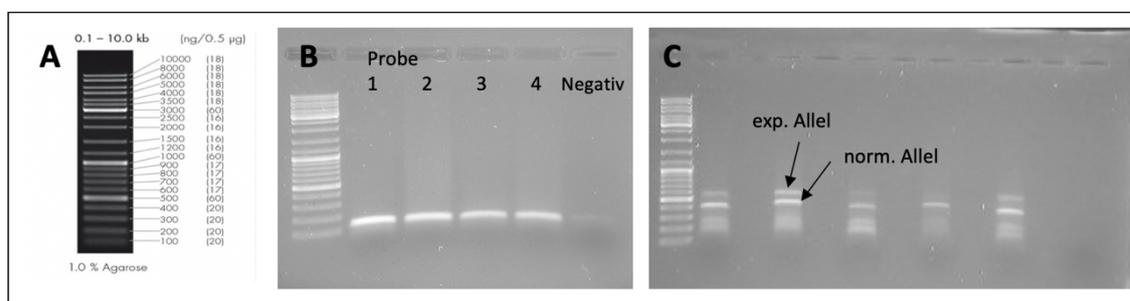


Abbildung 39: Exemplarische Darstellung eines Agarose-Gels zur Post-PCR-Kontrolle

A) Basenpaar-Länge in Kilobasen der Markerbanden-Referenz. B) PCR Kontrollgel einer erfolgreichen PCR mit 4 Patienten-Proben und der Negativ-Kontrolle. C) Auftrennung der beiden Allele (normale und expandierte Form) bei dem PCR-Produkt zur Analyse der Polymorphismen hinter dem *CAG-Repeat*.

3.4.3 Korrelationen CAG-Repeat-Länge und Patienten-Daten

Auch wenn nicht jede Variation des AAO oder der klinischen Scores verschiedener SCA3 Patienten anhand der CAG-Repeat-Länge erklärt werden kann, gibt es aber durchaus bekannte proportionale Zusammenhänge, weshalb im Folgenden zunächst die ermittelten CAG-Repeats mit den Patienten-Daten wie Erkrankungsbeginn (AAO) und Schwere der Erkrankung (SARA, INAS, CSDP) korreliert wurden (vgl. *Abbildung 40*). Es zeigte sich für alle vier Parameter ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der CAG-Repeat-Länge und den jeweiligen Parametern in der ESMI-Kohorte (CAG-AAO $p < 0,0001$, CAG-CSDP $p = 0,0070$, CAG-SARA $p = 0,0084$, CAG-INAS $p = 0,0229$).

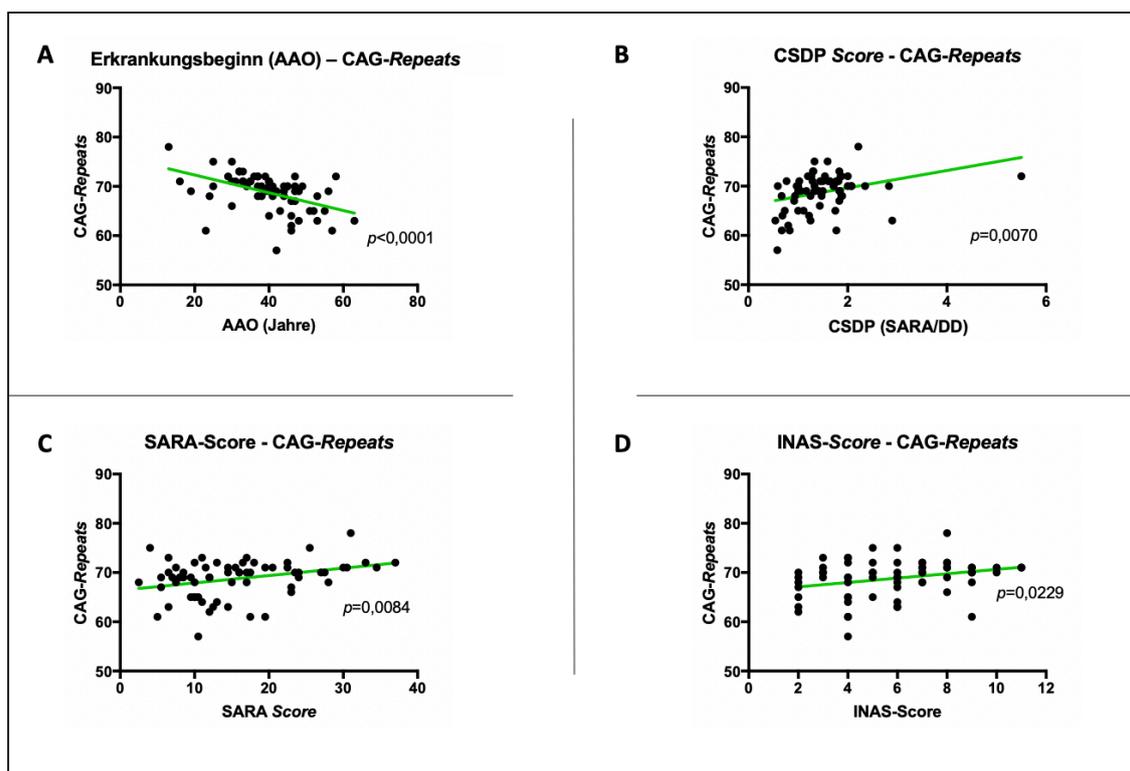


Abbildung 40: Korrelation zwischen CAG-Repeat-Länge und Patienten-Daten

A) Die lineare Korrelation zwischen CAG-Repeat-Länge und Erkrankungsalter (AAO) der Patienten zeigte, dass Patienten mit einem kürzerem CAG-Repeat tendenziell später erkranken, als Patienten mit einem längerem CAG-Repeat ($p < 0,0001$). Der *Cross-sectional disease progression Score* (B), SARA (C) und INAS (D) zeigten einen proportionalen Zusammenhang zwischen steigendem Score-Wert und CAG-Repeat-Länge mit B) $p = 0,0070$, C) $p = 0,0084$ und D) $p = 0,0229$.

Die direkte Gegenüberstellung der ermittelten expandierten Ataxin-3 Messwerte und der *CAG-Repeat*-Längen ergab keine relevanten Ergebnisse (vgl. Kapitel 3.3.4), dennoch könnte eventuell der Ataxin-3 Protein-Level einige der Ausreiser erklären, die nicht dem beschriebenen proportionalen Zusammenhang zwischen *CAG-Repeats* und AAO, SARA, INAS, und dem CSDP folgen. So zeigte beispielsweise ein Patient mit einem kurzen *CAG-Repeat* von 57 dennoch einen relativ frühen Erkrankungsbeginn von 42 Jahren. Der gemessene Protein-Level an löslichem Ataxin-3 war bei diesem Patient mit $\Delta Fc = 33,27$ (MW1-D2) bzw. 28,89 (1C2-D2) relativ gering, was auf das Vorhandensein von mehr Aggregaten hinweisen könnte. Um diese Vermutungen genauer zu überprüfen, wurde eine multilinare Regression zwischen der analysierten *CAG-Repeat*-Länge, dem AAO und dem gemessenen Ataxin-3 Protein-Level durchgeführt. Nach Normalisierung der Protein-Level auf die *CAG*-Länge konnte jedoch kein statistisch signifikanter Zusammenhang in Korrelation zum Erkrankungsbeginn (AAO: $p=0,2386$ für MW1, $p=0,1164$ für 1C2) oder der Schwere der Erkrankung (SARA: $p=0,8127$ für MW1, $p=0,1285$ für 1C2; INAS: $p=0,5480$ für MW1, $p=0,1431$ für 1C2; CSDP: $p=0,6575$ für MW1, $p=0,7419$ für 1C2) gefunden werden (Graphen nicht abgebildet).

3.4.4 Korrelation Haplotypen und Patienten-Daten

Neben der *CAG-Repeat*-Länge der Patienten könnten auch einige bekannte Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) Einfluss auf die Ataxin-3 Protein-Level nehmen und somit Ausreißer erklären. Leider konnten insgesamt nur 35 Probanden in diese Auswertung mit einbezogen werden, da die Methode zur Bestimmung der SNPs zu diesem Zeitpunkt noch aufwändig und fehleranfällig war. Die genauen Anzahlen der Probanden je Polymorphismus sind in *Tabelle 24* dargestellt. Alle Ergebnisse im Folgenden können nur mögliche Tendenzen anzeigen und sollten somit vorsichtig interpretiert werden.

Die Analyse der 3 Parkin-Polymorphismen auf Exon 4, 10 und 11 der SCA3 Patienten ist im Folgenden dargestellt: Für den SNP G^{601}/A^{601} zeigte sich bei 3 Patienten der Haplotyp (A/G) und bei 15 Patienten (G/G), für SNP G^{1239}/C^{1239} zeigten 6 Patienten (C/G) und 12 Probanden (G/G), und für SNP G^{1281}/A^{1281}

konnte bei keinem Proband dieser Kohorte eine Abweichung im Haplotyp von (G/G) gefunden werden. Somit wurden nur die SNPs auf Exon 4 und 10 mit den Patienten-Daten AAO und CSDP verglichen (vgl. *Abbildung 41A*). Es zeigte sich hier kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit verschiedenen Haplotypen bezüglich des AAO (G^{601}/A^{601} $p=0,8946$, G^{1239}/C^{1239} $p=0,2585$) oder des CSDP Scores (G^{601}/A^{601} $p=0,497$, G^{1239}/C^{1239} $p=0,4440$). Eine weitere Analyse zur Überprüfung, ob eine bestimmte Kombination der SNPs im Haplotyp einen relevanten Einfluss auf den Erkrankungsbeginn (AAO) oder den Krankheitsverlauf (CSDP) haben könnte, ist in *Abbildung 41B* dargestellt.

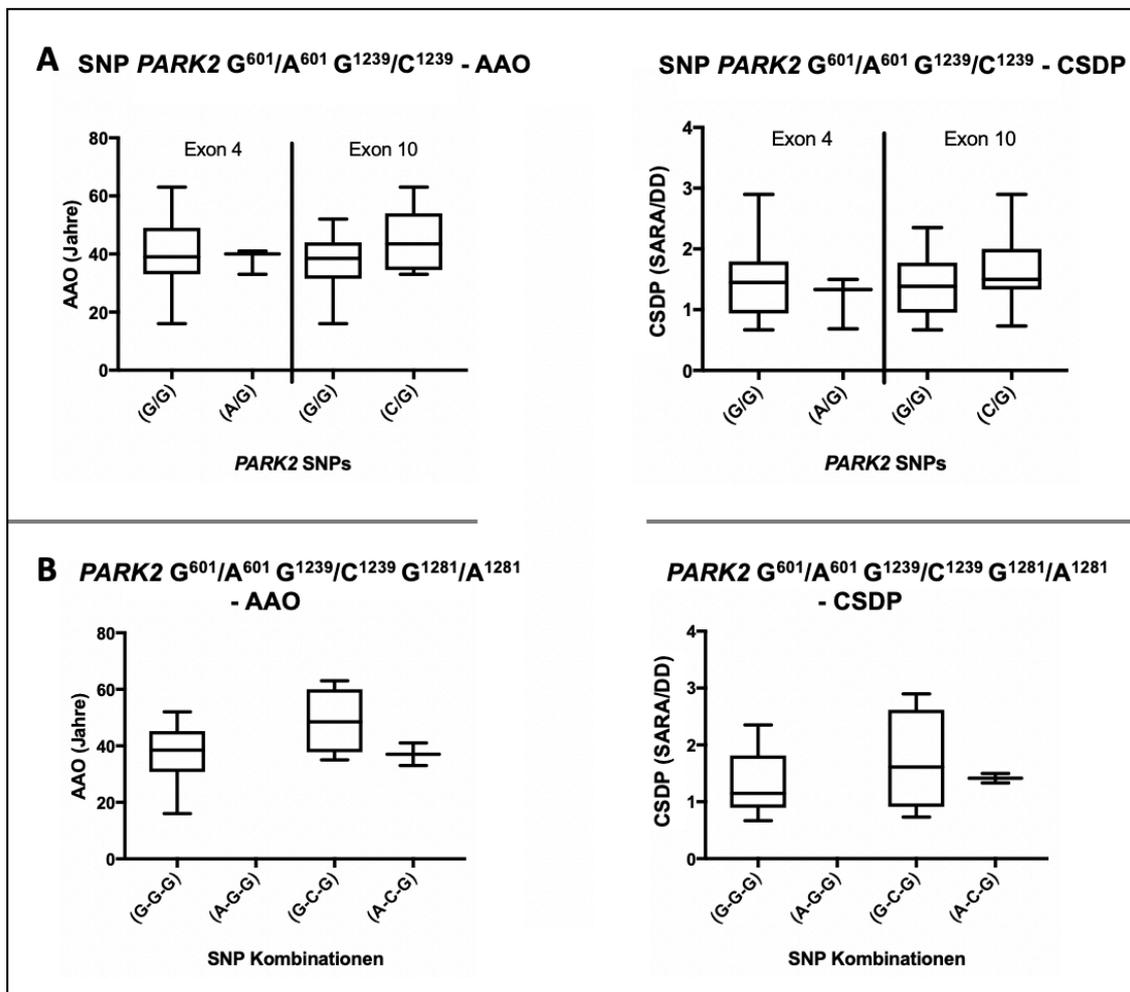


Abbildung 41: Vergleich der Haplotypen im *PARK2* Gen mit den klinischen Patienten-Daten

A) Die Verteilung der Haplotypen für die SNPs auf Exon 4, G^{601}/A^{601} und Exon 10, G^{1239}/C^{1239} zeigte weder beim Erkrankungsbeginn (AAO: G^{601}/A^{601} $p=0,8946$, G^{1239}/C^{1239} $p=0,2585$) noch bei der Progression der Krankheit (CSDP: G^{601}/A^{601} $p=0,497$, G^{1239}/C^{1239} $p=0,4440$) relevante Unterschiede. B) Auch die Kombination verschiedener Haplotypen zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Dabei wurde der Reihe nach G^{601}/A^{601} - G^{1239}/C^{1239} - G^{1281}/A^{1281} aufgetragen. Mit der Form A-G-G gab es keinen Patienten in dieser Kohorte, Haplotyp G-G-G lag bei 10, G-C-G bei 4 und A-C-G bei 2 Patienten vor. Insgesamt zeigten sich keine signifikanten Zusammenhänge, weder in Bezug auf den AAO noch des CSDP Score, da die Untergruppen mit $n=4$ und $n=2$ zu klein waren, um sichere Aussagen treffen zu können (vgl. *Abbildung 41B*).

Im *ATXN3* Gen wurden ebenfalls 3 SNPs analysiert. Bei dem Polymorphismus A^{669}/G^{669} lag bei 12 Probanden (A/G), bei 3 Probanden (G/G) und bei 4 Probanden (A/A) vor (vgl. *Abbildung 42*). Die Auswertung ergab auch hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Haplotypen und dem AAO ($p= 0,0681- 0,9$) oder dem CSDP Score ($p= 0,0571- 0,7703$). Dennoch könnte Haplotyp (A/A) tendenziell mit einem etwas späterem AAO und dafür rascherem Krankheitsverlauf assoziiert sein. Diese These müsste an der gesamten ESMI-Kohorte und damit an einer größeren Stichprobengröße überprüft werden.

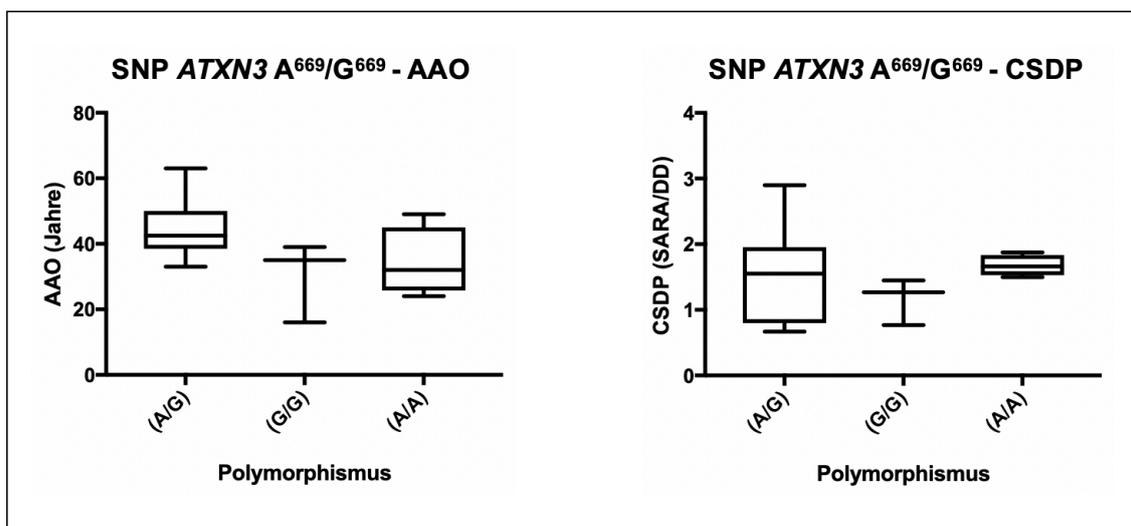


Abbildung 42: Vergleich des SNP A^{669}/G^{669} im *ATXN3* Gen mit den klinischen Patienten-Daten

Die Gegenüberstellung der Haplotypen mit dem Erkrankungsbeginn (AAO) ergab keine statistisch relevanten Ergebnisse, aber tendenziell schienen die Varianten (G/G) und (A/A) einen etwas früheren Erkrankungsbeginn aufzuweisen ($p=0,061$ und $p=0,0984$). Ebenso zeigte sich eine nicht signifikante aber erkennbare Trennung zwischen den Gruppen (G/G) und (A/A) bezüglich des Progression Scores (CSDP) mit $p=0,0571$. Da in beiden Gruppen mit (G/G) $n=3$ und (A/A) $n=4$ die Stichprobengröße sehr gering war, kann leider auch hier keine sichere Aussage getroffen werden.

Bei den beiden SNPs im *ATXN3* Gen, welche sich hinter dem *CAG-Repeat* befinden (G^{987}/C^{987} , C^{1118}/A^{1118}), konnten sowohl der Haplotyp des normalen

Allels als auch des expandierten Allels ermittelt werden. So ergaben sich bei SNP G^{987}/C^{987} die Formen (G/C), (G/G), (C/C) bei jeweils 2 und (C/G) bei 7 Probanden. Auch hier konnte bei der Auswertung keine statistische Signifikanz ermittelt werden, aber es scheint, dass der Haplotyp (C/G) einen späteren AAO und langsamere Progression (CSDP) aufweist, als die selteneren Varianten (vgl. *Abbildung 43A*). Probanden mit dem bei SNP C^{1118}/A^{1118} häufigsten Haplotyp (C/A) wiesen einen durchschnittlich späteren AAO auf und zeigten niedrigere CSDP Scores (vgl. *Abbildung 43B*). Auf eine Analyse der Kombination der verschiedenen SNPs im *ATXN3* Gen wurde, aufgrund der zu kleinen Untergruppengrößen, verzichtet.

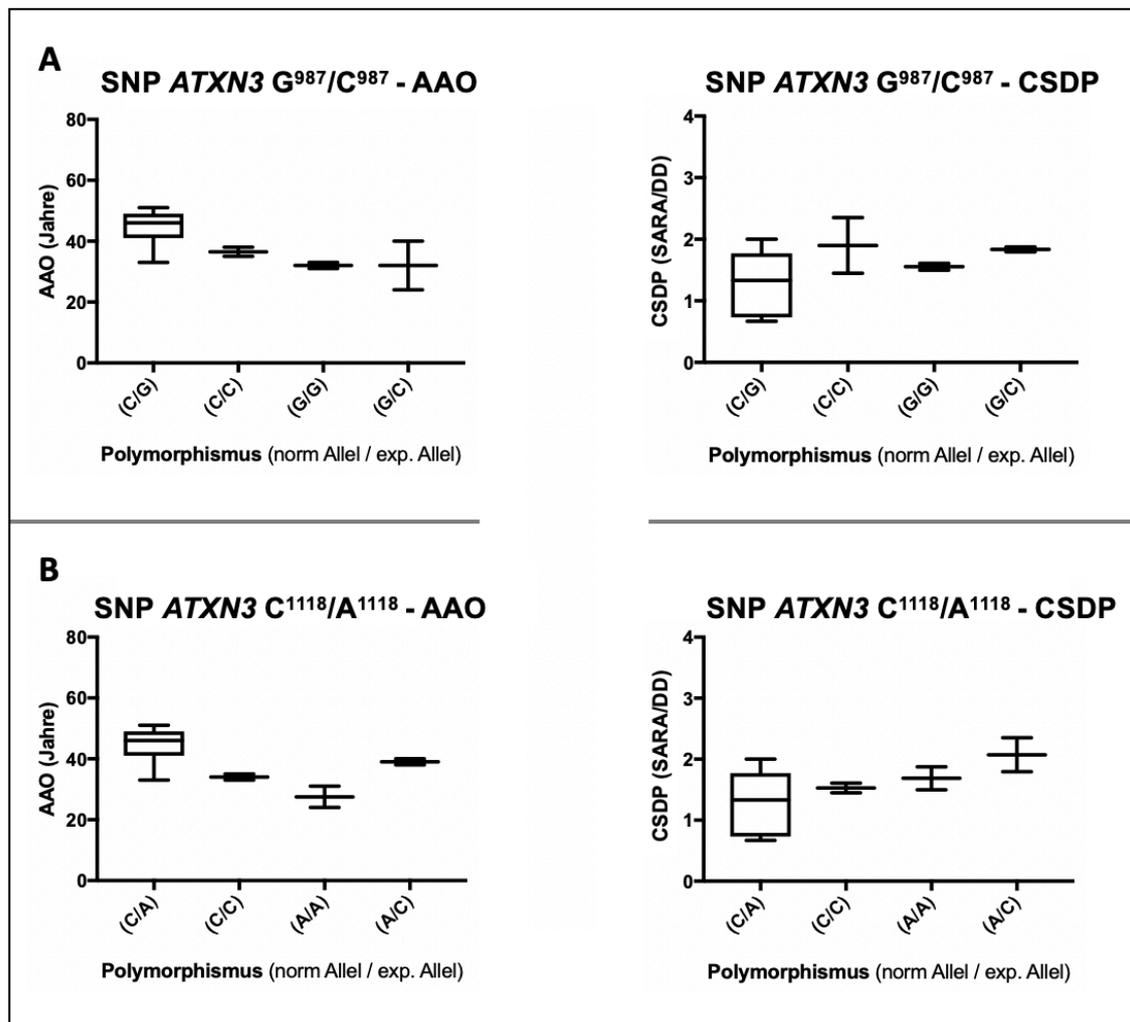


Abbildung 43: Vergleich der SNPs G^{987}/C^{987} und C^{1118}/A^{1118} im *ATXN3* Gen mit den klinischen Daten

A) Die Analyse des SNP G^{987}/C^{987} zeigte, dass SCA3 Patienten mit dem Haplotyp (C/G) tendenziell einen späteren Erkrankungsbeginn (AAO) und eine langsamere Progression (CSDP) im Vergleich zu den anderen Formen zeigten. B) Auch für SNP C^{1118}/A^{1118} zeichnete sich bei Patienten mit dem häufigsten Haplotyp (C/A) diese Tendenz ab.

3.4.5 Korrelation Haplotypen und exp. Ataxin-3 Messwerte

Um zu überprüfen, ob die 6 bestimmten Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) einen Einfluss auf den gemessenen Ataxin-3 Protein-Level haben könnten, wurden die Werte der TR-FRET Messung je nach vorliegendem Polymorphismus eingeteilt. Einbezogen wurden alle Probanden, bei denen die Proteinmessung in den PBMC-Lysaten erfolgreich war und von denen zum Zeitpunkt dieser Arbeit die SNPs bestimmt waren. Leider ist somit manchmal nur ein Proband in einer der Untergruppen enthalten, was eine weiterführende statistische Analyse nicht sinnvoll erscheinen lässt, aber mögliche Tendenzen zeigen könnte.

Die Graphen im folgenden Abschnitt zeigen jeweils den gemessenen Wert an löslichem expandiertem Ataxin-3 Protein der Patienten und Kontrollen, aufgeteilt nach dem jeweiligen Haplotyp. Wie bereits im *Ergebnis-Teil B* sind links die Ergebnisse der TR-FRET Messungen mittels MW1-D2 Antikörper und rechts die Werte der Messung mittels dem 1C2-D2 Antikörper aufgetragen.

Bei beiden SNPs auf G⁶⁰¹/A⁶⁰¹ (Exon 4) und G¹²³⁹/C¹²³⁹ (Exon 10) im *PARK2* Gen fiel auf, dass nach Aufteilung gemäß der ermittelten Polymorphismen in allen Gruppen die Werte der Ataxin-3 Messung stark streuten und keine relevanten Unterschiede zwischen den Gruppen auftraten (*vgl. Abbildung 44*). Lediglich der Haplotyp (C/G) bei dem SNP G¹²³⁹/C¹²³⁹ könnte mit leicht erhöhten Ataxin-3 Leveln assoziiert sein. Diese Vermutung müsste aber noch mit einer größeren Stichprobengröße belegt werden. Betrachtet man die Kombination der 3 analysierten SNPs im *PARK2* Gen (Reihenfolge G⁶⁰¹/A⁶⁰¹ - G¹²³⁹/C¹²³⁹ - G¹²⁸¹/A¹²⁸¹), zeigte sich bei den Messungen mit beiden Antikörpern (MW1-D2 und 1C2-D2) ebenfalls keine Tendenz einer Beziehung zwischen Protein-Level und dem Haplotyp der Patienten oder Kontrollen (*vgl. Abbildung 45*). Allerdings ist auch hier die Probanden-Anzahl für sichere Aussagen zu gering und es gab keinen Patienten mit der Kombination (A-G-G), sowie keinen Kontrollprobanden mit (A-C-G).

Der SNP A⁶⁶⁹/G⁶⁶⁹ im *ATXN3* Gen zeigte bei den Messungen mittels 1C2-D2 im Durchschnitt geringere Protein-Level (*vgl. Abbildung 46*). Doch auch bei dieser Auswertung war die Streuung der Werte in den einzelnen Untergruppen sehr stark und keine einheitliche Tendenz erkennbar. Bei dem SNP G⁹⁸⁷/C⁹⁸⁷ im

ATXN3 Gen zeigte sich bei den Ataxin-3 Protein-Leveln gemessen mit dem MW1-D2 Antikörper für alle Haplotypen erneut eine große Streuung, aber bei der Messung mittels 1C2-D2 ergab sich die Tendenz, dass Patienten mit dem Haplotyp (C/G) höhere Ataxin-3 Protein-Level aufwiesen als Patienten mit (G/C). Der Polymorphismus C¹¹¹⁸/A¹¹¹⁸ ergab für den Antikörper MW1-D2 niedrigere Protein-Level an löslichem Ataxin-3 von Haplotyp (A/C) als beim Haplotyp (A/C). Bei dem Antikörper 1C2-D2 war diese Tendenz ebenfalls sichtbar. Die Analyse der Kombination verschiedener Haplotypen im *ATXN3* Gen wurde aufgrund der zu kleinen Gruppen ausgesetzt.

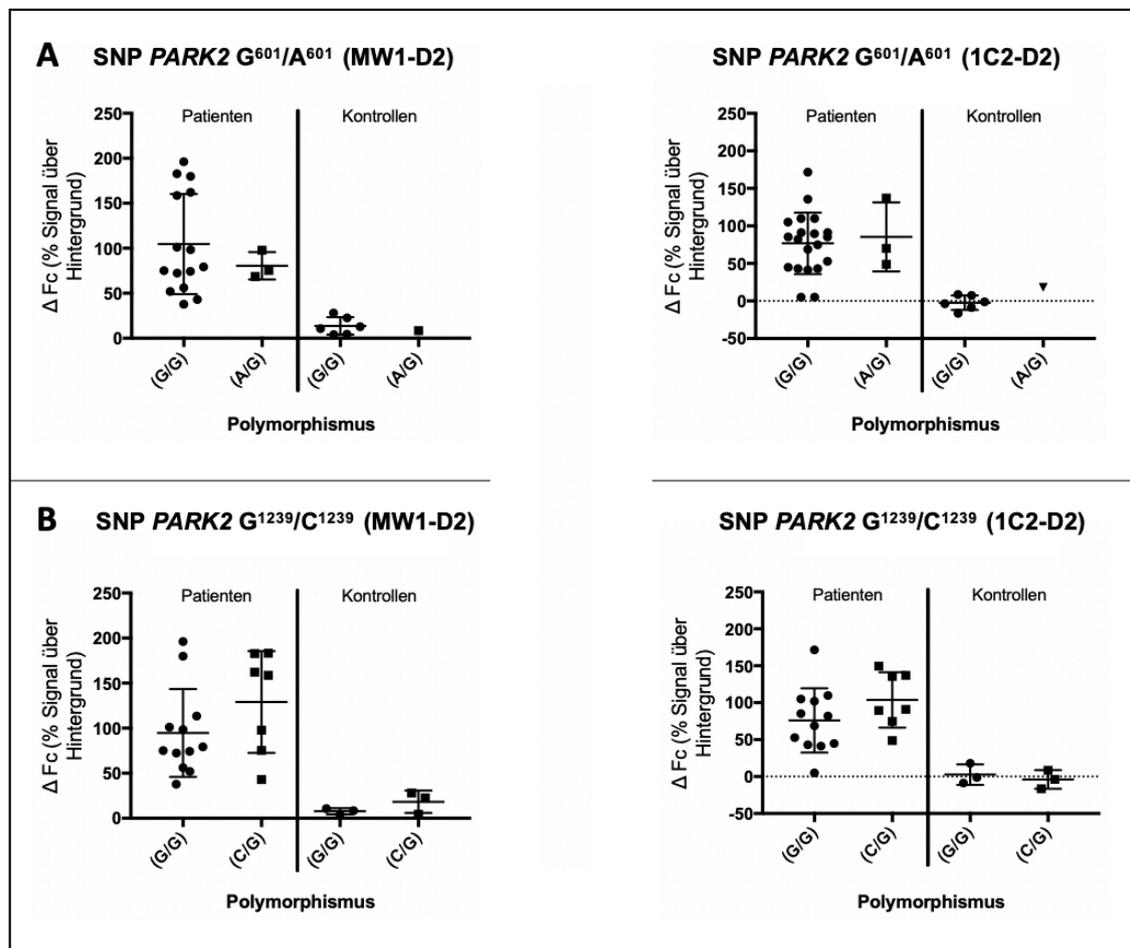


Abbildung 44: Korrelation der Polymorphismen im *PARK2* Gen mit den exp. Ataxin-3 Protein-Leveln

A) Bei dem SNP auf Exon 4, G⁶⁰¹/A⁶⁰¹ zeigten die Protein-Level bei beiden Antikörpern (MW1-D2 und 1C2-D2) keine relevanten Unterschiede zwischen den Haplotypen. B) Bei dem SNP auf Exon 10, G¹²³⁹/C¹²³⁹ erschien der Haplotyp (C/G) im Durchschnitt leicht höhere Ataxin-3 Level aufzuweisen, allerdings streuten die Werte bei beiden Patienten-Gruppen stark. A),B) Die Kontrollen zeigten keine erkennbaren Unterschiede bei den Protein-Leveln eingeteilt nach dem jeweiligen Haplotyp.

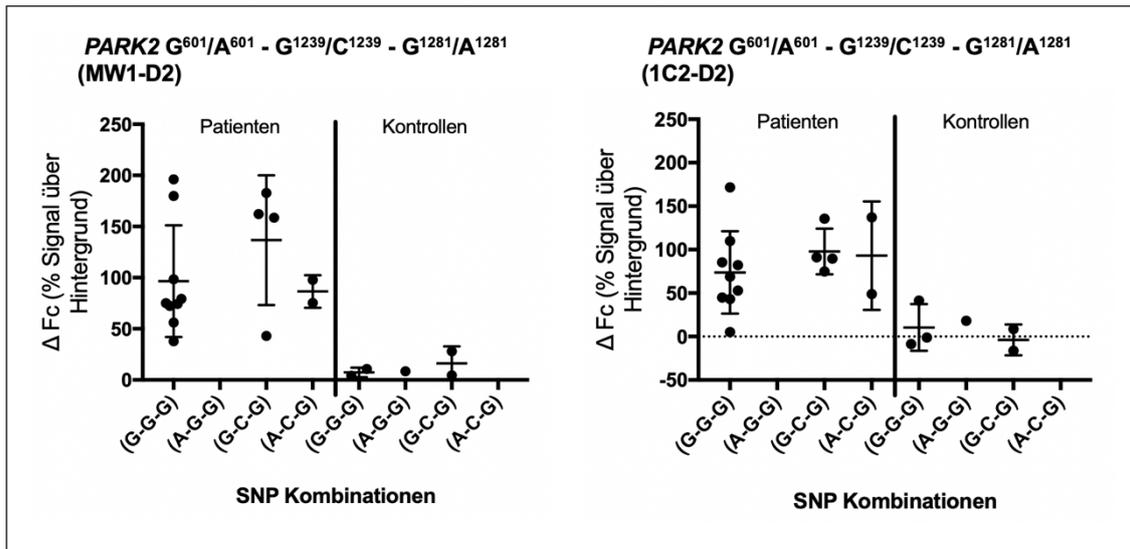


Abbildung 45: Korrelation von SNP Kombinationen im *PARK2* Gen mit den exp. Ataxin-3 Protein-Leveln

Die Kombination der verschiedenen Haplotypen (G⁶⁰¹/A⁶⁰¹ - G¹²³⁹/C¹²³⁹ - G¹²⁸¹/A¹²⁸¹) ergab keine klaren Tendenzen bezüglich der jeweiligen Verteilung der Ataxin-3 Protein-Level. Patienten mit der Kombination (G-C-G) könnten leicht höhere Messwerte zeigen, aber besonders bei MW1-D2 streuten die Werte sehr stark. Die Kombination (A-G-G) und (A-C-G) war sowohl bei den analysierten SCA3 Patienten, als auch bei gesunden Kontrollen kaum oder gar nicht vorhanden.

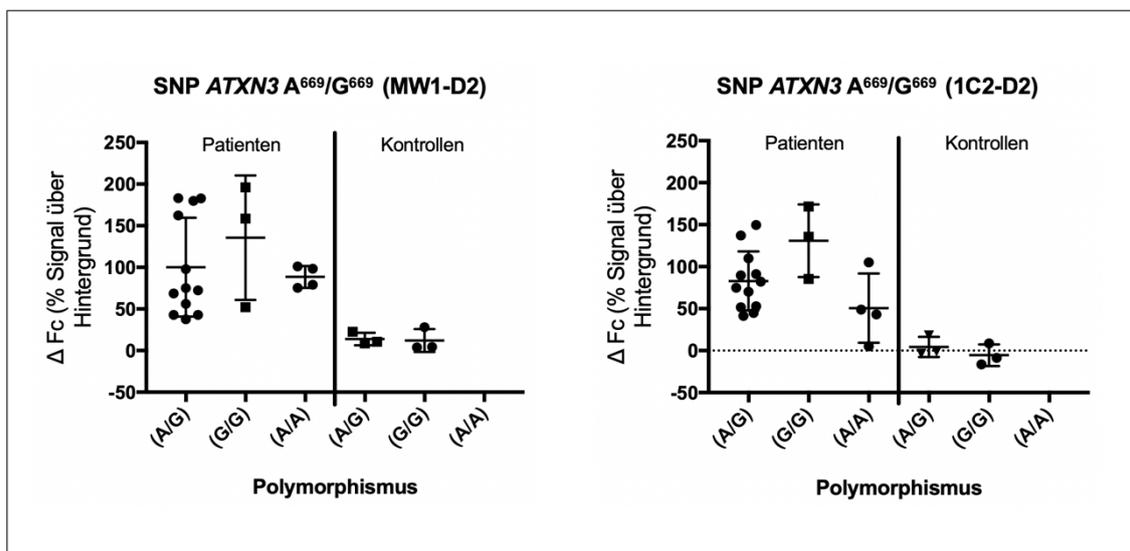


Abbildung 46: Korrelation des SNP A⁶⁶⁹/G⁶⁶⁹ im *ATXN3* Gen mit den exp. Ataxin-3 Protein-Leveln

Bei SCA3 Patienten mit dem Haplotyp (A/A) zeigten sich zumindest bei den Messungen mit dem 1C2-D2 Antikörper durchschnittlich niedrigere Ataxin-3 Protein-Level, wobei insgesamt die Streuung der Protein-Level bei allen Haplotypen meist sehr stark war.

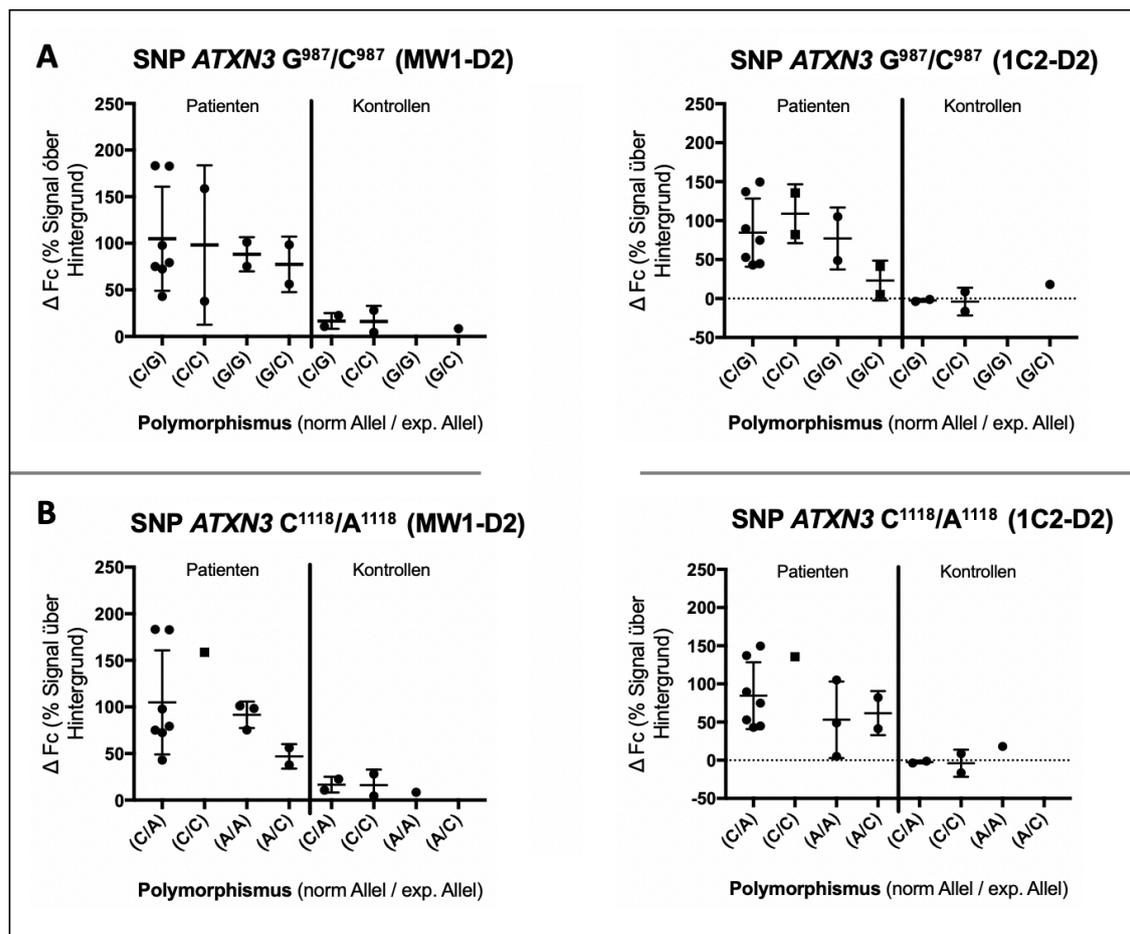


Abbildung 47: Korrelation der SNPs G⁹⁸⁷/C⁹⁸⁷ und C¹¹¹⁸/A¹¹¹⁸ im ATXN3 Gen mit den exp. Ataxin-3 Protein-Leveln

A) Die Analyse des SNP G⁹⁸⁷/C⁹⁸⁷ zeigte bei den Ataxin-3 Protein-Leveln gemessen mit dem MW1-D2 Antikörper für alle Haplotypen eine recht große Streuung, aber bei der Messung mittels 1C2-D2 ergab sich die Tendenz, dass Patienten mit dem Haplotyp (C/G) höhere Protein-Werte aufwiesen, als Patienten mit (G/C). B) Bei dem SNP C¹¹¹⁸/A¹¹¹⁸ für MW1-D2 zeigte die Auswertung absteigend niedrigere Protein-Level an löslichem Ataxin-3 von Haplotyp (C/A) zum Haplotyp (A/C). Eine ähnliche Tendenz konnte auch im 1C2-D2 Assay beobachtet werden.

3.4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse Teil C (CAG und SNP Analyse)

Die Analyse und Auswertung der CAG-Repeat-Längen der Patienten und Kontrollen sind in der folgenden *Tabelle 25* dargestellt. Die Ergebnisse der Bestimmung der Polymorphismen gestaltete sich insgesamt als sehr zeitintensiv und aufwändig, wodurch nur eine kleine Kohorte im Zuge dieser Arbeit analysiert werden und somit lediglich Tendenzen abgeleitet werden konnten. Somit sind weitere Analysen der gesamten ESMI-Kohorte bezüglich der SNPs notwendig,

um valide Aussagen und Vorhersagen treffen zu können.

Tabelle 25: Zusammenfassung der Ergebnisse Teil C

Versuch/Fragestellung	Ergebnis mit MW1-D2 Assay	Ergebnis mit 1C2-D2 Assay
Besteht ein proportionaler Zusammenhang zwischen der CAG-Repeat-Länge und klinischen Parametern?	<p>CAG-<i>Repeats</i> und AAO: Längere CAG-<i>Repeats</i> waren mit einem früherem Erkrankungsbeginn (AAO) assoziiert ($p < 0,0001$)</p> <p>CAG-<i>Repeats</i> und klinische <i>Scores</i>: Patienten mit einem längeren CAG-<i>Repeat</i> zeigten höhere <i>Score</i>-Werte CAG-<i>Repeats</i> und SARA: $p = 0,0084$ CAG-<i>Repeats</i> und INAS: $p = 0,0229$ CAG-<i>Repeats</i> und CSDP: $p = 0,0070$</p>	
Gibt es erkennbare Zusammenhänge zwischen dem Haplotyp der SNPs im <i>PARK2</i> Gen und den klinischen Parametern?	Keiner der analysierten SNPs, noch die Kombination verschiedener Haplotypen, zeigte einen signifikanten Zusammenhang mit dem Erkrankungsbeginn (AAO: G^{601}/A^{601} $p = 0,8946$, G^{1239}/C^{1239} $p = 0,2585$) oder der Progression der SCA3-Erkrankung (CSDP: G^{601}/A^{601} $p = 0,497$, G^{1239}/C^{1239} $p = 0,4440$).	
Gibt es erkennbare Zusammenhänge zwischen dem Haplotyp der SNPs im <i>ATXN3</i> Gen und den klinischen Parametern?	<p>Der SNP A^{669}/G^{669} zeigte keine relevanten Zusammenhänge mit dem AAO oder CSDP.</p> <p>Der SNP G^{987}/C^{987} zeigte, dass SCA3 Patienten mit dem Haplotyp (C/G) tendenziell einen späteren Erkrankungsbeginn (AAO) und einen langsameren Progressions-Verlauf (CSDP) aufwiesen.</p> <p>Auch für SNP C^{1118}/A^{1118} zeichnete sich bei Patienten mit dem häufigsten Haplotyp (C/A) diese Tendenz ab .</p>	
Zeigen die verschiedenen Haplotypen der analysierten SNPs im <i>PARK2</i> Gen einen Zusammenhang mit den gemessenen Ataxin-3 Protein-Leveln?	<p>SNP G^{601}/A^{601} (Exon 4): keine Zusammenhänge zw. Haplotyp und Protein-Level</p> <p>SNP G^{1239}/C^{1239} (Exon10): Patienten mit Haplotyp (C/G) zeigten im Durchschnitt leicht höhere Ataxin-3 Level</p> <p>Kombination der Haplotypen ($G^{601}/A^{601} - G^{1239}/C^{1239} - G^{1281}/A^{1281}$): Kombination (G-C-G) zeigte leicht höhere Protein-Level, aber eine starke Streuung der Messwerte</p>	<p>SNP G^{601}/A^{601} (Exon 4): keine Zusammenhänge zw. Haplotyp und Protein-Level</p> <p>SNP G^{1239}/C^{1239} (Exon 10): Patienten mit Haplotyp (C/G) zeigten im Durchschnitt leicht höhere Ataxin-3 Level</p> <p>Kombination der Haplotypen ($G^{601}/A^{601} - G^{1239}/C^{1239} - G^{1281}/A^{1281}$): keine relevanten Unterschiede</p>
Zeigen die verschiedenen Haplotypen der analysierten SNPs im <i>ATXN3</i> Gen einen Zusammenhang mit den gemessenen Ataxin-3 Protein-Leveln?	<p>SNP A^{669}/G^{669}: keine klaren Zusammenhänge erkennbar, da die Werte stark streuten</p> <p>SNP G^{987}/C^{987}: Patienten mit dem Haplotyp hatten (C/G) durchschnittlich höhere Protein-Werte, als Patienten mit (G/C)</p> <p>SNP C^{1118}/A^{1118}: absteigend niedrigere Protein-Level an löslichem Ataxin-3 von Haplotyp (C/A) zum Haplotyp (A/C)</p>	<p>SNP A^{669}/G^{669}: Patienten mit dem Haplotyp (A/A) zeigten durchschnittlich niedrigere Ataxin-3 Protein-Level</p> <p>SNP G^{987}/C^{987}: Patienten mit dem Haplotyp hatten (C/G) durchschnittlich höhere Protein-Werte, als Patienten mit (G/C)</p> <p>SNP C^{1118}/A^{1118}: ähnliche Tendenz wie bei MW1-D2, aber größere Streuung</p>

4 Diskussion

4.1 Etablierung und Validierung des TR-FRET Assays für den expandierten Ataxin-3 Protein Nachweis

In der bisher unheilbaren Erkrankung der Spinozerebellären Ataxie Typ 3 wird momentan intensiv an potentiellen Biomarkern und deren Messverfahren geforscht. Neben Hormonen und Stoffwechselprodukten eignen sich besonders auch Proteine als Biomarker-Substanzen. In anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS), dem Morbus Parkinson oder der Multiplen Sklerose (MS) gelang es bereits beispielsweise Neurofilamente aus CSF Proben als Biomarker zu etablieren (Khalil et al., 2018). Diese Entwicklung wurde erst durch den Einsatz hochsensitiver Messverfahren wie dem Simoa-Assay (*Single Molecule Array*) ermöglicht. Auch andere Verfahren wie der TR-FRET Assay (Messung von Alpha-Synuklein Protein in CSF) oder das SMC-Verfahren (*Single-molecule-counting*, Messung Huntingtin Protein in CSF) eignen sich für hoch-sensitive Protein-Messungen (Bidinosti et al., 2012, Fodale et al., 2017).

Neben CSF sind auch andere, teils einfacher zu gewinnende humane Biomaterialien als Ausgangsmaterial von Interesse: So sind momentan neben CSF auch Serum, Plasma oder sogar Urin und Speichel im Zentrum der Forschung und werden für die Biomarker-Etablierung geprüft (Vu und Bowser, 2017). Humane PBMC-Proben aus peripherem Blut wurden als Ausgangsmaterial für die Messung von Huntingtin Protein-Leveln bereits erfolgreich genutzt (Daldin et al., 2017).

Ein sich daraus ableitender möglicher Ansatz für die SCA3 Erkrankung, welcher in dieser Arbeit verfolgt wurde, ist die Messung des löslichen pathologischen (expandierten) Ataxin-3 Proteins in PBMC-Proben, gewonnen aus venösem Blut. Um die geringen Mengen des Ataxin-3 Proteins in humanen Biomaterialien wie den PBMCs zu messen, wird die hoch-sensitive Methode des TR-FRET Assays genutzt. Der TR-FRET Assay wurde für die Detektion des *full-length* und expandierten Ataxin-3 Proteins bereits im Vorfeld dieser Arbeit etabliert (Nguyen

et al., 2013). Dabei wurde erfolgreich lösliches Ataxin-3 in HEK293T Zellen und im Maus-Modell mittels der Antikörper MW1-D2 (>15Q) und 1H9-tb gemessen. Für die Messungen des Ataxin-3 Proteins in humanen PBMC-Proben wurde der Assay unter der Leitung von Frau Dr. rer. nat. Hübener-Schmid und der Doktorandin Frau Gonsior weiterentwickelt und sollte nun für diese Arbeit weiter validiert werden, sowie um den Antikörper 1C2-D2 (>37Q) ergänzt werden.

Mit den in dieser Arbeit ermittelten Konzentration von 3 ng 1C2-D2 und 1 ng 1H9-tb bestätigten sich die Angaben der empfohlenen möglichen Konzentrationen von Donor und Akzeptor zueinander, welche bereits in früheren TR-FRET Etablierungen für Proteinmessungen in der SCA3 Erkrankung, Morbus Parkinson und Chorea Huntington bekannt waren (Nguyen et al., 2013, Bidinosti et al., 2012, Weiss et al., 2012).

Der Assay mittels 1C2-D2 Antikörper zeigte sich erwartungsgemäß als noch sensitiver für die Unterscheidung zwischen SCA3 Patienten und gesunden Kontrollen, da Letztere in der Regel selten *CAG-Repeats* über 37Q aufweisen. Bei der ESMI-Kohorte wiesen die gesunden Probanden maximal 28 *CAG-Repeats* auf, jedoch sind bei Gesunden bis zu 36 *CAG-Motive* möglich (Rieß und Schöls, 1996). Zudem sollte beachtet werden, dass in der vorliegenden analysierten ESMI-Kohorte das kürzeste pathologische *CAG-Repeat* 57 betrug, in der Literatur jedoch Patienten mit 45 bis 51 *CAGs* bekannt sind, wobei dann die Trennschärfe zu Kontroll-Proben auch mittels des 1C2-D2 (>37Q) abnehmen könnte (Gu et al., 2004, Padiath et al., 2005).

Die absoluten Werte für ΔF_c sind für den 1C2-D2 Assay immer deutlich geringer als für den MW1-D2 Assay, da weniger bzw. kein nicht expandiertes Ataxin-3 mit gemessen werden kann.

Um die Robustheit und Sensitivität des Assays zu steigern, wurde angelehnt an bereits erhältliche gewerblich verfügbare TR-FRET Assays für Alpha-Synuklein (*Total Human α -Synuclein Kit 500 tests* von Cisbio) auch mit der Inkubationszeit der Antikörper und der Temperatur während der Inkubation experimentiert. Mit dem 1C2-D2 Antikörper konnten bei Raumtemperatur gute Ergebnisse für die ΔF -Werte erzielt werden. Allerdings ist der Einsatz der doppelten Volumina an Probe und Antikörper-Mix mit deutlich höheren Kosten verbunden und je nach

Ausbeute der Ausgangs-PBMC-Probe (pro CPT Röhrchen im Schnitt 75 μ l) schwer realisierbar, falls Wiederholungsmessungen benötigt werden. Der MW1-D2 Assay ergab keine positiven Messwerte, wenn die Inkubation bei Raumtemperatur stattfand. In einem für das Huntingtin Protein entwickelten TR-FRET Assay, welcher ebenfalls MW1-D2 als Polyglutamin-spezifischen Antikörper nutzte (zusammen mit 2B7-tb einem Huntingtin-spezifischem Antikörper), wurde eine Inkubation bei Raumtemperatur für 1 Stunde genutzt und lieferte hohe ΔF -Werte von 200-1000 (Weiss et al., 2012).

Die Temperatur zeigte jedoch in der Vorbereitungsphase der 384-Well Platte während der Zugabe des Antikörpers einen relevanten Einfluss: In den Analysen der Intra-Platten-Versuche zeigte sich, dass bei einer größeren Probenanzahl die Zugabe des Antikörpers bei der späteren Inkubationstemperatur (4° C) erfolgen sollte, um Platten-Verteilungs-Effekte zu vermeiden. Die Beobachtung, dass zuerst pipettierte Proben-Well's bei der späteren Messung ein höheres Signal lieferten, lässt sich durch die verlängerte Inkubation bei Raumtemperatur (teils 15 min) und die somit höhere Kinetik der Antikörperbindung erklären.

Im Zuge dieser Arbeit wurde auch der lineare Detektionsbereich der Assays für beide Antikörper (MW1-D2 und 1C2-D2) untersucht. Nur wenn die gemessenen Signalwerte und die eingesetzte Proteinkonzentration proportional zueinander verlaufen, kann die Methode verlässlich für die Bestimmung der Ataxin-3 Protein-Level genutzt werden. Setzt man in den Immuno-Assay zu hohe Konzentrationen an Substrat ein, erfolgt der sogenannte HOOK-Effekt oder *prozone effect*, da bei übermäßiger Auslastung der Antikörper nicht beide an dem selben Molekül, sondern an zwei verschiedenen Proteinen binden, und somit kein Energietransfer stattfindet (Schiettecatte, 2012). Die gesamte Signalstärke nimmt dadurch ab, obwohl sehr viel Protein in der Probe enthalten ist (*vgl. Abbildung 48*). Dieser Effekt wurde auch bei einem TR-FRET Assay für Huntingtin-Protein gezeigt, wo ab einer Proteinmenge von ca. 0,1 ng/Well das Signal trotz erhöhter Proteinmenge abnahm (Cui et al., 2014).

Eine Studie mit Calmodulin zeigte, dass die Nutzung von positiven kooperativen Bindungen (allosterische Aktivatoren oder Inhibitoren) den HOOK-Effekt

abmildern konnten (Roy et al., 2017). In wie fern solche *Linker*-Proteine in den vorliegenden Assay eingebaut werden könnten, ist jedoch derzeit noch fraglich.

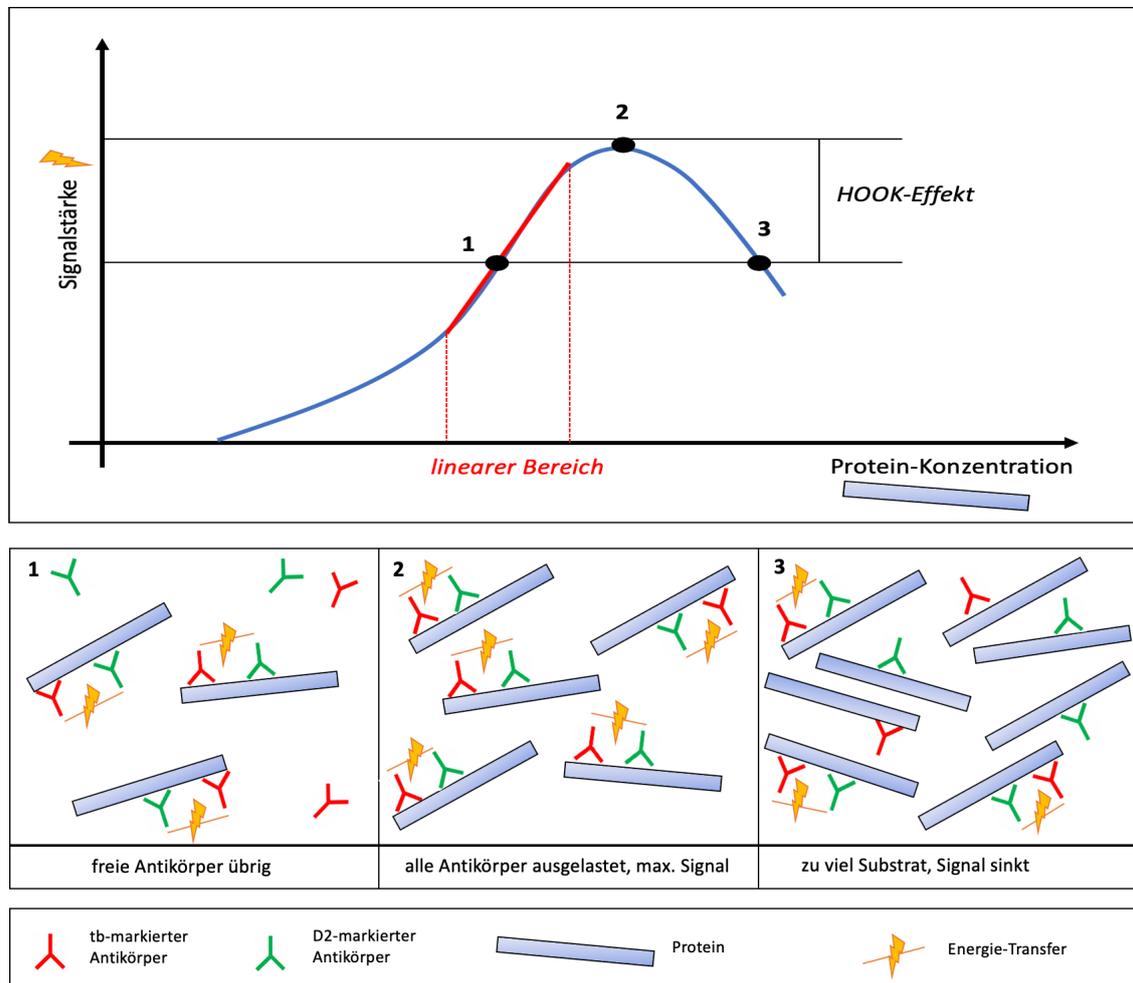


Abbildung 48: Darstellung des HOOK-Effekts, modifiziert nach Schiettecatte, 2012

Die Signalstärke steigt in einem bestimmten Bereich (rote Linie) proportional zur vorhandenen Proteinkonzentration an. Punkt 1 zeigt diesen Zustand, es sind dabei freie Antikörper vorhanden. Bei Punkt 2 ist das maximale Signal erreicht, alle Antikörper sind hier im Idealfall mit den entsprechenden Proteinen gebunden. Steigt nun die Protein-Konzentration weiter an, sind nicht mehr genügend freie Antikörper vorhanden und es tritt häufiger der Fall ein, dass an einem Molekül nur einer der beiden Antikörper (tb- oder D2-markiert) bindet, so bleibt der Energie-Transfer häufiger aus und es werden ähnliche Signalwerte erreicht wie an Punkt 1. Dadurch würde fälschlicherweise eine geringere Proteinkonzentration angenommen werden. Dieses Phänomen beschreibt der HOOK-Effekt.

In unseren Versuchsreihen mit überexprimiertem Ataxin-3 aus HEK-Zellen und endogenen Ataxin-3 aus iPSCs zeigte sich ein recht enger linearer Detektionsbereich. Er lag bei Verdünnungen von 0,001-0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (überexprimiertes Ataxin-3) und 0,01-0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (endogenes Ataxin-3). Der lineare Detektionsbereich wurde nicht immer in den Validierungen der Assays

anderer Studien dargestellt, einen vergleichbaren Bereich zeigte aber der SMC-Assay für das Huntingtin Protein mit einem linearen Detektionsbereich von Verdünnungen von 0,01-1 µg/µl für endogenes Protein in CSF Proben (Fodale et al., 2017).

Da im TR-FRET Assay zwar die Gesamtproteinkonzentration der PBMC-Probe berücksichtigt wird, aber nicht der Ataxin-3 Gehalt selbst im Vorfeld ermittelt werden kann, sollte die Probe in verschiedenen Verdünnungen (i.d.R. 1:4 und 1:8) in den TR-FRET eingesetzt werden. Ähnliche Verdünnungen werden auch für den gewerblich verfügbaren TR-FRET Assay für Alpha-Synuklein (*Total Human α -Synuclein Kit 500 tests* von Cisbio) empfohlen.

Ein Vorteil der TR-FRET Methode zeigt sich durch die geringe Menge an Probenmaterial, welche für eine Messung benötigt wird, da der Assay sehr sensitiv ist. Selbst eine obligat im Duplikat durchgeführte Messung benötigt nur 10 µl (5 µl pro *Well*) der meist vorverdünnten PBMC-Probe. Somit kann bei einer durchschnittlichen Ausbeute von ca. 75 µl Ausgangsmaterial und anschließender 1:4 Verdünnung die Messung problemlos auch im Triplikate oder mit mehreren Wiederholungen gemessen werden.

Die Vorbereitung der Proben, Zusammenstellung des Antikörper-Mixes und das Pipettieren sind für den geübten Anwender zeitlich mit überschaubarem Aufwand zu bewältigen. Bei einer durchschnittlichen Probenanzahl von 20 Proben (40 im Duplikat und weitere 6 Negativ-/Positiv-Proben) kann der Vorgang der Plattenbelegung in 20 Minuten abgeschlossen sein (Erfahrungswerte). Somit eignet sich der TR-FRET Assay auch als Massenquantifizierungsmethode und ist im Vergleich zu anderen bekannten Immuno-Assays wie dem ELISA schneller anzuwenden (Cohen et al., 2016).

Ebenfalls positiv zeigte sich der Vergleich verschiedener Messungen derselben Probe. Der Intra-Platten-Vergleich einer Messung ergab mit einem Variationskoeffizient von 4,9-6,9 % durchaus robuste Werte, wie sie auch bei anderen Studien mit ultra-sensitiver Messmethode (Simoa Assay, Messung von Serum Neurofilament, 6,6 %) angegeben werden (Wilke et al., 2018). Der Variationskoeffizient zwischen den verschiedenen Platten 8,2-13,1 % war etwas

höher (Vergleichsstudie s.o. 6,4 %) und sollte in späteren Anwendungen nochmals überprüft werden, da es einzelne Ausreißer bei den Inter-Platten-Vergleichen gab, welche bisher nicht erklärt werden konnten. Dennoch ist auch hier der Inter-Platten-Vergleich mit knapp über 10 % tragbar, wenn man Vergleiche mit anderen Immuno-Assays wie beispielsweise einem klassischen gewerblich erhältlichen ELISA-Assay (*VCAM-1 Human ELISA-Kit von Thermo Fischer*) vergleicht. Hier werden für die Intra-Assay-Präzision ein Variationskoeffizient von 4,9-7,6 % und für die Inter-Assay-Präzision von 7,4-9,9 % angegeben (Thermo Fischer Scientific, 2019). Für den etablierten SMC-Assay beim Huntingtin Protein ist der Variationskoeffizient für die Intra-Assay-Präzision mit gerundet 8,4-14,0 % und für die Inter-Assay-Präzision mit 9,3-16,0 % sogar leicht höher (Fodale et al., 2017).

Trotz vieler Vorteile weist der TR-FRET Assay in der Ataxin-3 Protein-Detektion zum momentanen Zeitpunkt noch einige Defizite und Nachteile auf, die auch bei der Interpretation der späteren Messwerte immer berücksichtigt werden sollten. Als mögliche Fehlerquellen zeigten sich neben Pipettierfehlern durch den Anwender (falsches *Well*, doppelte Menge Antikörper-Mix) und Pipettier-Ungenauigkeiten (Abweichung des Duplikats von über 10 %) auch störende Schwebeteilchen oder Lichtausbleichungen der fluoreszenzmarkierten Antikörper, wie sie auch in anderen TR-FRET Studien beschrieben sind (Liang et al., 2014). Diese Fehlerquellen sind relativ unproblematisch korrigierbar oder vermeidbar. Problematischer könnten sich störende Substanzen in der Probe oder dem *Well* zeigen, welche dann indirekten Einfluss auf die Signalstärke nehmen und somit die Messung verzerren könnten. In der Literatur ist beispielsweise Hämoglobin als Störfaktor beschrieben, welches durch den Häm-Farbstoff eine Eigenfluoreszenz aufweist und die Messung stört (Cohen et al., 2016). Trotz sorgfältiger Vorbereitung der Proben kam es in einigen Fällen zu Verunreinigungen der PBMC-Proben mit Erythrozyten. In diesen dokumentierten Fällen der ESMI-Kohorte konnten allerdings keine Ausreißer-Messwerte zugeordnet werden. Ebenfalls mit dem TR-FRET Assay interagieren können laut

einer Studie Salicylate, welche durchaus in den Blutproben bei entsprechender Medikation der Probanden enthalten sein könnten (Hanley et al., 2016).

Ein weiteres mögliches Defizit dieses TR-FRET Assay für Ataxin-3 Protein ist die starke Einflussnahme der zuvor bestimmten und mit eingerechneten Gesamtproteinmenge der PBMC-Probe. Treten hier Ungenauigkeiten oder Fehler auf, überträgt sich dies auf die ΔF_c -Werte. Der Bradford-Assay zeigte sich in den Versuchen zu dieser Arbeit nicht als die ideale Methode, um die Proteinmengen der Verdünnungen (1:4) der PBMC-Proben sicher zu quantifizieren. Hier wäre für spätere Tests und die Weiterführung dieser Studie eine Gesamtproteinbestimmung mittels des BCA-Assay empfehlenswert, wie sie auch bei anderen TR-FRET Anwendungen genutzt wurde (Cui et al., 2014, Weiss et al., 2012). Ein weiteres Problem bei der Gesamtproteinbestimmung könnte die in den lysierten PBMC-Proben enthaltene Reagenz TritonX100 darstellen, welche für einige gängige Proteinbestimmungs-Kits als möglicher Störfaktor angegeben wird (Thermo Fischer Scientific, 2012).

In Anbetracht dieser Limitationen des Assays zum momentanen Stand empfiehlt es sich, die Messung der Patienten- und Kontroll-Proben immer mit beiden Antikörper-Kombinationen durchzuführen, da somit eine gewisse Kontrolle und Validierung der Messwerte durch den Vergleich möglich wird. Zeigte beispielsweise eine Probe mittels der 1C2-D2 Analyse sehr hohe ΔF -Werte, während die Messung mittels MW1-D2 sehr weit darunter lag, konnte dies ein Anzeichen für einen der oben genannten Fehler darstellen und es konnte eine Wiederholungsmessung durchgeführt werden.

Leider gelang es bisher nicht, CSF als Ausgangsmaterial für die Ataxin-3 Analyse zu nutzen. In Anlehnung an den bereits etablierten TR-FRET Assay für Alpha-Synuklein in CSF wurde der Versuch unternommen, eine Kalibrations-Matrix zu generieren, was allerdings bisher für Ataxin-3 nicht gelang (Bidinosti et al., 2012). Da im Zuge dieser Arbeit der Fokus auf den Analysen der PBMC-Proben lag, wurden sicherlich nicht alle Mittel zur Etablierung des Assays in CSF ausgeschöpft. Andere Ansätze mit leichten Variationen in den Zusätzen von Protease-Inhibitoren oder Reagenzien wie Tween-20 oder TritonX100, wie sie in

der Bestimmung von Huntingtin in CSF genutzt werden, sollten ebenfalls weiter untersucht werden (Wild et al., 2015). Es konnten keine Angaben gefunden werden, wie viel expandiertes lösliches Ataxin-3 Protein in CSF exprimiert wird. Durch die anatomische Nähe zum Zielort der Erkrankung könnte man auf relativ hohe Ataxin-3 Protein-Level schließen, aber auch sehr geringe Mengen wie beim Huntingtin Protein sind denkbar (vgl. *Abbildung 4*). So sollten in Zukunft möglicherweise noch sensitivere Methoden im Vergleich zum TR-FRET Assay, wie beispielsweise der SMC-Assay (*Singulex-Assay* von *Evotec*), für die Ataxin-3 Detektion in CSF erprobt werden.

Da CSF durch die enge räumliche Beziehung zum erkrankten Organ von besonderem Interesse ist, arbeiten viele der momentanen Forschungen an neurodegenerativen Erkrankungen mit diesem Ausgangsmaterial (vgl. *Tabelle 26*).

Ein leichter zu gewinnendes Biomaterial im Vergleich zu CSF ist Serum. Dieses konnte für die Messung von Neurofilamenten bereits ebenfalls als Ausgangsmaterial verifiziert werden (Disanto et al., 2017, Feneberg et al., 2018, Wilke et al., 2018). Für den TR-FRET Assay für Ataxin-3 Protein scheint die Sensitivität momentan nicht gegeben, da die Konzentrationen an Ataxin-3 Protein im Plasma/Serum wahrscheinlich sehr gering sind (vgl. *Abbildung 4*).

Eine zusammenfassende Bewertung des aktuellen Standes des TR-FRET Ataxin-3 Assays findet sich in *Tabelle 27*.

Tabelle 26: Auswahl momentan erforschter Biomarker in neurodegenerativen Erkrankungen

Besonders CSF und Serum-Proben sind im Fokus momentaner Biomarker-Etablierungen in verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen. Durch den hochsensitive Simoa-Assay ist besonders die Messung von Neurofilament aktuell von großer Bedeutung.

Erkrankung	Marker (Protein)	Ausgangsmaterial	Methode	Veröffentlichung
Amyotrophen Lateralsklerose (ALS)	Neurofilamente	CSF CSF, Serum	Simoa-Assay Simoa-Assay, ELISA	<i>Vu et al., 2017</i> <i>Feneberg et al., 2018</i>
Chorea Huntington	Huntingtin	CSF	SMC	<i>Wild et al., 2015</i> <i>Fodale et al., 2017</i>
Morbus Parkinson	Alpha-Synuklein	CSF	TR-FRET	<i>Bidinosti et al., 2012</i>
Multiple Sklerose (MS)	Neurofilamente	CSF, Serum	Simoa-Assay	<i>Disanto et al., 2017</i>
Spinozerebelläre Ataxie (Typ 1,2,3,6)	Neurofilament	Serum	Simoa-Assay	<i>Wilke et al., 2018</i>

Tabelle 27: Bewertung des aktuellen Standes des TR-FRET Assays für die Ataxin-3 Detektion

Stärken des TR-FRET Assay	Defizite des TR-FRET Assay
Sichere Detektion des exp. Ataxin-3 Proteins im Vergleich zu gesunden Kontrollen, besonders für den 1C2-D2 Assay	Starker Einfluss möglicher Fehler bei der Gesamtproteinbestimmung auf die Endwerte der Kalkulation (ΔFc -Werte)
Intra- und Inter-Assay-Präzision sind im Vergleich zu anderen Immuno Assays (Simoa, SMC, ELISA) ähnlich gut.	Der momentan genutzte Bradford-Assay scheint nicht ausreichend sensitiv für die Messung von Verdünnungen.
Der Zeitaufwand bei der Vorbereitung und Anwendung ist im Vergleich zu ELISA, SMC geringer.	Einfluss von Substanzen welche mit den Antikörpern interagieren (z.B. Hämoglobin, Salicylate)
Sehr kleine Probenmengen sind ausreichend.	Relativ hohe Kosten
Die Kombination beider Assays (MW1-D2 und 1C2-D2) erhöht die Sicherheit der Messergebnisse.	Eine Detektion in CSF/Plasma gelang bisher nicht, mit diesen Materialien arbeiten allerdings andere Assays (für Huntingtin, Alpha-Synuklein) erfolgreich.

4.2 Zusammenhänge der klinischen Daten analysierter SCA3 Patienten und der gemessenen Ataxin-3 Protein-Level

TR-FRET Messungen vom Ataxin-3 Protein in PBMC-Proben wurden bereits im Zuge der medizinischen Doktorarbeit von Frau Kathrin Gonsior durchgeführt. Allerdings lagen zum damaligen Zeitpunkt keine einheitlichen *Biosampling*-Protokolle vor und die Kohorte war mit ca. 60 Teilnehmern etwas kleiner. In der ESMI-Studie lagen nun erstmals verbindliche einheitliche Protokolle für die Probensammlung, Probenbearbeitung und Lagerung vor und durch die multizentrische Studie konnte die Probandenzahl in dieser vorliegenden Arbeit fast verdoppelt werden. Zudem ist das Projekt noch nicht abgeschlossen und sollte auch eine longitudinale Verlaufskontrolle beinhalten, welche zwar nicht mehr Bestandteil dieser Arbeit war, aber in der Zukunft wichtige Erkenntnisse liefern kann. So sind momentan einige (laufende) Studien in der Biomarker Forschung der SCA3 Erkrankung noch vor der longitudinalen Testung oder erst als Pilotstudien angelegt (Lima und Raposo, 2018, Wilke et al., 2018).

Longitudinale Studien mit MRT-Bildgebung zeigten sich sehr vielversprechend und teils sensibler für Veränderungen, als die gängigen klinischen Scores (Adanyeguh et al., 2018). MRT-Analysen sind zwar Bestandteil des ESMI-Projektes, stehen aber in dieser Arbeit nicht zur Auswertung zur Verfügung, wodurch die Ataxin-3 Proteinmessungen mit den klassischen klinischen Scores INAS und SARA korreliert wurden. Hierbei gilt immer zu beachten, dass selbst etablierte Bewertungsmaßstäbe wie der SARA-Score tagesformabhängig (Patient) und subjektiv in der Bewertung (Behandler) sein können. Es sollte zudem beachtet werden, dass die ESMI-Studie nur Patienten aus Europa analysiert und es zu SCA3 Patienten anderer Ethnien (Brasilien, China) durchaus Unterschiede in der Krankheits-Progression geben kann. Eine aktuelle Studie mit knapp 200 SCA Patienten (Typ 1,2,3,6 und 17) zeigte allerdings keine Unterschiede zwischen Kaukasiern und Chinesen bezüglich Krankheitsverlauf oder Progression der Erkrankung (Lin et al., 2018).

Vor dem Hintergrund dieser Betrachtungen lassen sich nun im Folgenden die Ergebnisse der löslichen expandierten Ataxin-3 Proteinmessung diskutieren:

Die Auswertung der Ataxin-3 Level ergab für präsymptomatische Mutationsträger geringere Level an löslichem Ataxin-3 im Vergleich zu manifest erkrankten Patienten ($p=0,0125$ MW1-D2, $p=0,0572$ 1C2-D2). Geht man von der Hypothese aus, dass Patienten, die bereits schwerer erkrankt sind, mehr Aggregate aufweisen, könnte man erwarten, dass sie somit geringere lösliche Ataxin-3 Protein-Level aufweisen. Eine (spekulative) Erklärung könnte ein möglicher *Feedback-Mechanismus* sein, wobei die Bildung von mehr Aggregaten auch zur Bildung von neuem löslichem Ataxin-3 Protein führt. Um diese Vermutung allerdings zu überprüfen, müsste der Assay verändert werden, um auch Aggregate messen zu können bzw. *post-mortem* Gehirn-Proben analysiert werden.

Bezüglich des Erkrankungsbeginns (AAO) der Patienten zeigte sich für Probanden mit frühem AAO (≤ 30 Jahre) ein durchschnittlich höheres Ataxin-3 Level. Es liegt die Vermutung nahe, dass Patienten mit einem frühem AAO auch eine längere Erkrankungsdauer (DD) und somit mehr Aggregate und weniger lösliches Ataxin-3 aufweisen. In dieser Kohorte zeigten die Probanden mit AAO

≤ 30 Jahre im Durchschnitt eine DD von 17,2 Jahren, während die restlichen Probanden mit einer durchschnittlichen DD von 10,7 Jahren deutlich darunter lagen. Somit stellt sich auch hier die Frage, ob möglicherweise trotz vermehrter Aggregate auch mehr lösliches Ataxin-3 Protein vorliegt (Feedback-Mechanismus). Aber um diesen Sachverhalt genauer zu analysieren, sollte eine Validierung mittels MRT stattfinden, um zu überprüfen, ob die früh erkrankten Patienten auch stärkere Atrophien im Cerebellum aufweisen. Auch eine Korrelation mit der Messung von Neurofilament als potenzieller Marker für das Maß neuronaler Läsionen könnte ergänzend sinnvoll sein (Wilke et al., 2018). Zudem darf nicht außer Acht gelassen werden, dass trotz frühem Erkrankungsbeginn auch andere Faktoren wie Lebensstil, Ernährung und mögliche Therapien oder Medikamente Einfluss nehmen könnten.

Eine graphische Darstellung der Hypothese zum Zusammenhang zwischen AAO, DD und Ataxin-3 Level findet sich in *Abbildung 49*. Bei der Gruppe der spät erkrankten SCA3 Patienten (AAO >50 Jahre) zeigten sich der Hypothese entsprechend höhere lösliche Ataxin-3 Protein-Level, allerdings war in dieser Gruppe die Streuung der Werte sehr stark, wodurch allgemeine Aussagen erschwert sind.

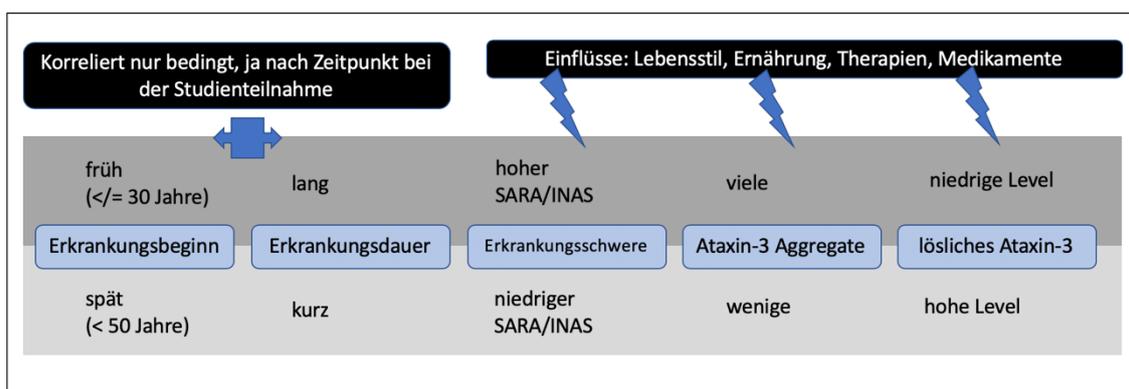


Abbildung 49: Hypothese zum Zusammenhang von klinischen Parametern und Ataxin-3 Protein-Level

Betrachtet man die Korrelation zwischen SARA- und INAS-Score mit den gemessenen Ataxin-3 Protein-Leveln, so zeigte sich, dass bis zu einem Stadium der schweren Erkrankung (SARA > 24) lösliches Ataxin-3 Protein und Score-Wert

proportional zueinander anstiegen. Erst bei schwer erkrankten Probanden zeigte sich gemäß der oben gestellten Hypothese ein Abfall der Ataxin-3 Level mit der Vermutung, dass hier mehr Aggregate vorliegen könnten. Durch die verstärkte Neurodegeneration in diesem Stadium könnte bedingt durch Zelltod weniger lösliches Ataxin-3 gebildet worden sein. Um diese These zu untersuchen, müsste man im Tier-Modell verschiedene Krankheitsstadien (präsymptomatisch, mild, schwer) gemäß ihrer löslichen Ataxin-3 Protein-Level in PBMC- und Gehirn-Proben messen und gleichzeitig die betroffenen Gehirnareale auf Aggregate untersuchen. Ebenfalls wäre an dieser Stelle auch eine Korrelation mit Messungen von Neurofilament womöglich hilfreich.

Die Auswertung der Ataxin-3 Messwerte in Relation zum INAS-Score ergab entgegen der Hypothese generell einen proportionalen Zusammenhang zwischen löslichem Ataxin-3 und Score-Wert. Da der INAS-Score sich auf andere Bereiche der Symptome der SCA3 Erkrankung (nicht-Ataxie-Symptome) konzentriert, könnten damit die leichten Unterschiede zur Analyse mittels SARA erklärt werden.

Da mit unserem Assay primär das pathologische Protein detektiert wird, kann man vermuten, dass bei milder betroffenen Patienten noch nicht so viel pathologisches Protein vorliegt bzw. sie noch über funktionierende Korrekturmechanismen verfügen und somit den Level geringer halten. Hier ergibt sich eine zweite Hypothese, welche keinen rein linearen Zusammenhang zwischen Erkrankungsschwere und Protein-Gehalt beschreibt (vgl. *Abbildung 50*). Obwohl die Mutation im *ATXN3* bereits von Geburt an die Bildung von löslichem expandiertem Ataxin-3 Protein bedingt, scheinen zu Beginn womöglich noch Korrekturmechanismen die pathologische Wirksamkeit des expandierten Ataxin-3 Proteins zu reduzieren. Denkbar wären hier ein noch funktionierender Abbau durch das Proteasom-System oder ein erst später einsetzendes Schneiden des Proteins in die toxischen Fragmente durch beispielsweise Calpaine (Bence et al., 2001, Goti et al., 2004, Hübener et al., 2013).

Diese These würde auch den durchschnittlichen Erkrankungsbeginn von erst 30 bis 40 Jahren bei den Betroffenen mit erklären, da erst ein gewisser Schwellenwert von toxischem Protein überschritten werden muss, um die

Symptome auszulösen. Im weiteren Verlauf scheint dann die Bedeutung der Anhäufung von Aggregaten mit einhergehender verstärkter Neurodegeneration zum Tragen zu kommen und zeigt sich in unseren Messungen mit fallenden löslichen Ataxin-3 Leveln bei der Korrelation mit dem SARA-Score. (vgl. *Abbildung 50*). Warum diese Beobachtung sich bei der Korrelation mit dem INAS-Score nicht komplett deckte, lässt sich an dieser Stelle nicht eindeutig beantworten. Die Hypothese zum erkannten Zusammenhang zwischen löslichem expandiertem Ataxin-3 Gehalt und der Schwere der Erkrankung müsste allerdings im oben genannten Tier-Modell weiter untersucht werden.

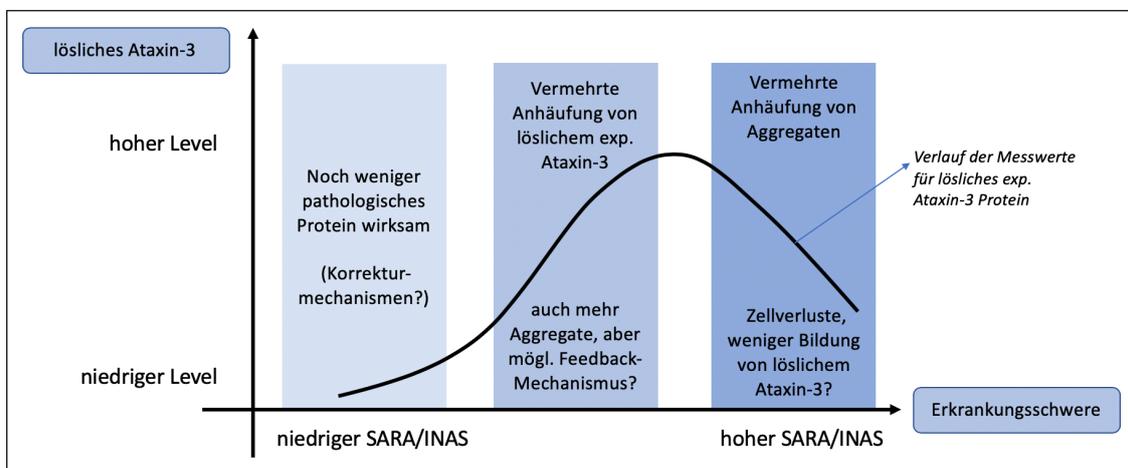


Abbildung 50: Hypothese zum Zusammenhang zwischen Erkrankungsschwere und Ataxin-3 Protein-Level

Das Diagramm zeigt den in dieser Arbeit beobachteten Zusammenhang zwischen löslichem Ataxin-3 Protein-Level und der Erkrankungsschwere (hier anhand des SARA-/ INAS-Scores bestimmt). Da Patienten im präsymptomatischen Stadium geringere Protein-Level aufwiesen, könnten hier Korrekturmechanismen den Anteil an wirksamem pathologischem Protein noch reduziert haben. Im weiteren Krankheitsverlauf konnten höhere lösliche exp. Ataxin-3 Level gemessen werden, wobei wohl die Bildung von Aggregaten über einen möglichen Feedback-Mechanismus zu noch mehr löslichem Protein führen könnte, weshalb hier die höchsten Protein-Level messbar waren. Säule drei zeigt dann bei den schwer betroffenen Patienten einen Abfall der löslichen exp. Ataxin-3 Messung, womöglich bedingt durch die vermehrte Anhäufung von Aggregaten mit einhergehendem Zellverlust.

Ein bereits seit langem bekannter Zusammenhang ist die Korrelation zwischen frühem Erkrankungsbeginn (AAO) sowie einem schwerem Erkrankungsverlauf und einem langem CAG-Repeat (Durr et al., 1996). Somit kann die CAG-Länge des expandierten Allels ein signifikanter Prädiktor für die Bestimmung des

Erkrankungsbeginns oder die Überlebensdauer darstellen (Diallo et al., 2018, Tezenas Du Montcel et al., 2014b).

Auch in der analysierten ESMI-Kohorte zeigten die Patienten deutlich lineare Zusammenhänge zwischen der CAG-Länge und den klinischen Parametern AAO ($p < 0,0001$), SARA ($p = 0,0084$), INAS ($p = 0,00229$) und CSDP ($p = 0,0070$). Betrachtet man nun die gemessenen Ataxin-3 Protein-Level in Korrelation zu der CAG-Repeat-Längenbestimmung, zeigte sich keine lineare Korrelation, was auf einen möglicherweise komplexeren Zusammenhang hindeuten könnte.

In der analysierten Kohorte lag der durchschnittliche AAO bei den Patienten mit kurzem CAG-Repeat (57-64 CAGs) bei 47,1 Jahren und somit deutlich später als bei Patienten mit längerem Repeat (38,8 Jahre). Der SARA-Score lag bei 12,1 Punkten bei den kurzen Repeats leicht unter denen der anderen Patienten (16,3), obwohl die Erkrankungsdauer (DD) mit 12,4 Jahren (57-64 CAGs) sogar durchschnittlich leicht über der DD der anderen Patienten lag (11,5 Jahre). Somit bestätigte sich auch in unserer Kohorte, dass Patienten mit kürzeren CAG-Repeats teils mildere Krankheitsverläufe aufweisen, wobei andere modifizierende Faktoren (Therapien, Lebensstil etc.) hier nicht mit berücksichtigt werden. Dennoch passt diese Beobachtung zu der oben gestellten Hypothese (vgl. *Abbildung 50*), dass milder erkrankte Probanden geringere Ataxin-3 Protein-Level aufzuweisen scheinen. Es wurde zudem mit der einheitlichen (Neu-) Bestimmung aller CAG-Repeats sichergestellt, dass Unterschiede zwischen den Laboren ausgeschlossen werden können (Akimoto et al., 2014).

Da bekannter Weise aber nicht jede Variation des AAO oder der Erkrankungsschwere mit der CAG-Repeat-Länge oder der ethnischen Unterschiede der Patienten erklärt werden kann, wurde bereits in der Vergangenheit nach modifizierenden genetischen Faktoren in der SCA3-Erkrankung geforscht (Tezenas Du Montcel et al., 2014a). Häufig traten Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) in das Zentrum der Forschung: Patienten, die beispielsweise einen bestimmten SNP im Gen für das Apolipoprotein (APOE Gen) tragen, zeigten einen im Durchschnitt um 4 Jahre früheren AAO (Peng et al., 2014).

Die im Zuge dieser Arbeit analysierten SNPs $\underline{A}^{669}\underline{TG}/\underline{G}^{669}\underline{TG}$ (rs1048755), $\underline{C}^{987}\underline{GG}/\underline{G}^{987}\underline{GG}$ (rs12895357) sowie $\underline{TAA}^{1118}/\underline{TAC}^{1118}$ (rs7158733) sind bereits seit längerem bekannt und untersucht (Goto et al., 1997, Maciel et al., 1999).

Eine frühere weltweite Analyse (16 Nationen) der Haplotypen dieser drei Polymorphismen ergab, dass die Variante A-C-A (669-987-1118) bei SCA3 Patienten mit 72 % deutlich vermehrt vorliegt, während sie bei gesunden Kontrollen kaum vorkommt (Gaspar et al., 2001). Leider war im Zuge dieser Arbeit die erfolgreich analysierte Gruppe für die *ATXN3* SNPs zu klein, um sie bezüglich aller 3 Haplotypen-Kombinationen zu unterteilen.

Vergleiche dieser einzelnen SNPs getrennt von einander analysiert, finden sich in der Literatur nach aktuellem Kenntnisstand keine. Ebenso gibt es keine veröffentlichte Studie zu den 3 analysierten SNPs im *PARK2* Gen. Es ist an dieser Stelle also nur möglich, Tendenzen zu diskutieren und die weitere, vollständige Auswertung der ESMI-Kohorte abzuwarten.

Tendenziell zeigte sich die Auswertung der SNPs im *ATXN3* Gen für die SNPs hinter dem *CAG-Repeat* am vielversprechendsten für die weitere Erforschung der SNPs im Hinblick auf potenzielle genetische Modifikationen. Für $\underline{C}^{987}\underline{GG}/\underline{G}^{987}\underline{GG}$ (rs12895357) sowie $\underline{TAA}^{1118}/\underline{TAC}^{1118}$ (rs7158733) zeigten sich bezüglich des AAO und des CSDP *Score* Unterschiede je nach der vorliegenden Variation im nicht betroffenen oder expandierten Allel. Aufgrund der geringen Anzahl (n=6 bis 2) je Untergruppe, kann es sich aber auch um eine zufällige Beobachtung handeln. Allerdings zeigte bereits eine Studie zu 2 anderen erforschten SNPs im *ATXN3* Gen (rs709930 und rs910369) mit 170 chinesischen SCA3 Patienten und 200 Kontrollen einen für rs709930 mit Allel A und rs910369 Allel T einen um 2 bis 4 Jahre früheren Erkrankungsbeginn (Long et al., 2015). Eine weitere Analyse der ESMI-Kohorte könnte eine ähnliche Probandenanzahl erreichen und ist abzuwarten. SNPs sind allerdings nicht nur für die Erforschung möglicher modifizierender Einflüsse auf die SCA3 Erkrankung von Interesse. Sie könnten auch ein potenzieller Ansatzpunkt für die Therapie mittels siRNA zur Ausschaltung des pathologischen expandierten Allels, darstellen, wobei das normale Allel und seine Funktion nicht beeinträchtigt werden sollten (Miller et al., 2003). Um so interessanter kann die zukünftige Analyse der gesamten ESMI-

Kohorte bezüglich der SNPs sein, da im Zuge dieser Arbeit das Verfahren zur Bestimmung der SNPs noch zu aufwendig und fehleranfällig war und somit diese Kohorte für allgemeine Aussagen zu klein ausfiel.

4.3 Fazit: Ataxin-3 Protein als potenzieller Biomarker?

Der Weg in der Biomarker Forschung der SCA3 Erkrankung weist aktuell stark in die Richtung mehrerer Biomarker, welche je nach Fragestellung eingesetzt werden, als auf eine einzige Testsubstanz oder Molekül als Marker, hin (Lima und Raposo, 2018). Im Maus-Modell zeigte eine Analyse des Plasmas zwischen an SCA3 erkrankten und gesunden Tieren 32 Metabolite, welche signifikante Unterschiede aufwiesen und somit alle potentielle Marker darstellen könnten (Toonen et al., 2018). Dies lässt erkennen, dass das expandierte Ataxin-3 Protein nur einen potenziellen Marker unter möglicherweise zahlreichen anderen darstellen wird.

Als diagnostischer Marker ist das expandierte Ataxin-3 Protein sicherlich weniger geeignet als die bereits bekannten genutzten genetischen Analysen (*Southern Blot, tethering PCR*) (Cagnoli et al., 2018). Seine Qualität als prognostischer Marker bzw. Progressions-Marker kann in dieser Arbeit noch nicht abschließend bewertet werden, da longitudinale Messungen noch ausstehen. Erste statistisch signifikante Korrelationen zu etablierten Scores wie SARA und INAS sind aber vielversprechend, während zu Parametern wie dem Erkrankungsbeginn oder dem CSDP Score jedoch keine linearen Zusammenhänge in Erscheinung traten. Als Biomarker zur Bewertung der Erfolge von klinischen randomisierten Studien zur Medikamenten-Testung oder Therapieerfolgs-Bewertung könnte Ataxin-3 von Interesse sein: Aktuelle Forschungen zum *Silencing* des *ATXN3* Gens mittels Antisense-Oligonukleotiden (ASO) zeigten im Maus-Modell eine Reduktion des pathologischen Proteins um bis zu 50% in den betroffenen Gehirnregionen (Moore et al., 2017). Das hier gezeigte Verfahren zur Ataxin-3 Proteinmessung in PBMCs könnte somit als Biomarker dann zum Einsatz kommen, wenn es einer Messung der therapeutischen Reduktion des expandierten Ataxin-3 Protein bedarf, um so mögliche Therapie-Studien zu begleiten und zu bewerten. Ob

dabei wirklich der TR-FRET Assay, oder doch sensitivere Methoden wie der SMC-Assay zum Einsatz kommen sollten, muss noch weiter eruiert werden. Ebenso werden zukünftige Studien weiter das Feld möglicher Ausgangsmaterialien erforschen, womit CSF möglicherweise die PBMC-Proben ablösen könnte.

5 Zusammenfassung

Die seltene Erkrankung der Spinozerebellären Ataxie Typ 3 (SCA3) ist eine neurodegenerative, autosomal dominant vererbte Erkrankung, welche zu dem Formenkreis der Polyglutamin-Erkrankungen gehört. Es existiert zum aktuellen Zeitpunkt kein heiltherapeutischer Ansatz. Symptomatische Behandlungen zur Verbesserung der Situation der Patienten sind begrenzt, da bisherige Studien zur Medikamenten-Entwicklung nicht die nötigen Evidenzlevel erreichten. Eine mögliche Ursache sehen Forscher in dem Mangel an validen Biomarkern für die SCA3 Erkrankung zur Überprüfung des möglichen Therapieerfolges. Ein solcher Biomarker sollte möglichst einfach dem Patient entnommen werden können und objektiv den aktuellen Zustand widerspiegeln, um so Aufschluss über beispielsweise positive Einflüsse von Medikamenten geben zu können. Da bei seltenen Erkrankungen die Kohortenstärke häufig einen limitierenden Faktor darstellt, wurde mit dem ESMI-Projekt eine multizentrische europaweite Studie angelegt, welche erstmals nach gemeinsamen Protokollen arbeitete. Somit entstand eine Kohorte von 29 gesunden Probanden, 8 präsymptomatischen Mutationsträgern und 61 manifest erkrankten SCA3 Patienten.

Im Zuge dieser Arbeit sollte das in der SCA3 Erkrankung pathologische (expandierte) Ataxin-3 Protein in PBMC-Proben, gewonnen aus venösem Blut, gemessen und als potenzieller Biomarker untersucht werden. Für die Messungen des Ataxin-3 Proteins wurde das hoch-sensitive Verfahren des TR-FRET genutzt und der vorhandene Assay weiter ausgebaut und validiert. Darüber hinaus wurden von allen Probanden die *CAG-Repeat*-Längen mittels Fragment-Längenanalyse einheitlich neu in unserem Zentrum bestimmt und zusammen mit den übermittelten klinischen Daten (AAO, SARA, INAS, etc.) für Korrelationen mit den gemessenen Protein-Leveln genutzt. Die Hypothese, dass mit zunehmender Schwere der Krankheit (SARA-/ INAS-Score) die expandierten

Ataxin-3 Level ansteigen, konnte in Teilen bestätigt werden ($p= 0,0202$ bis $0,0303$), wobei bei stark betroffenen Patienten ($SARA >24$) die Protein-Level wieder abfielen. Dies könnte auf das Vorhandensein vermehrter Aggregate zurückzuführen sein, welche mit diesem Assay nicht miterfasst werden können. Die Korrelationen zu AAO, DD, *CAG-Repeats*, sowie anderen Parametern ergaben allerdings keine eindeutigen oder statistisch signifikante Ergebnisse. Hier gilt es die weiteren Auswertungen des noch laufenden ESMI-Projekts und longitudinale Messungen abzuwarten. Die Abgrenzung zwischen den Protein-Messwerten von Kontrollen und Patienten war hingegen sehr eindeutig ($p < 0,0001$) und belegt die korrekte Funktionsweise im Kern des Assays. Dennoch weist das aktuelle Messverfahren mittels TR-FRET Analyse einige Defizite auf: Der aktuell genutzte Bradford-Assay zur Bestimmung der Gesamtproteinmenge der PBMC-Proben erscheint nicht ausreichend sensitiv und nimmt gleichzeitig starken Einfluss auf die kalkulierten Endergebnisse der Ataxin-3 Messung. Alternativ könnten andere Verfahren wie der BCA-Assay, der bereits in vergleichbaren Studien genutzt wurde, vorteilhafter sein. Zudem gelang zum aktuellen Zeitpunkt keine Ataxin-3 Messung mittels TR-FRET in anderen Ausgangsmaterialien wie CSF oder Plasma, welche aber in der Biomarker-Forschung momentan häufig im Fokus stehen. Bereits in der Biomarker-Etablierung anderer neurodegenerativer Erkrankungen angewandte Protein-Messungen wie dem Huntingtin-Protein in der Erkrankung Chorea Huntington greifen auf das *Single-molecule-counting* (SMC-Assay, *Singulex*) zurück oder nutzen die *Simoa*-Technologie (Messung von Neurofilament, in der ALS-Erkrankung, Multiple Sklerose u.a.). Solche Verfahren sollten auch im Hinblick auf weitere Studien zur Ataxin-3 Protein-Messung erwogen werden, besonders wenn die Erforschung weiterer Ausgangsmaterialien wie CSF oder Plasma im Zentrum steht. Die Analyse bekannter SNPs zeigt in dieser Arbeit vielmehr den Charakter einer Pilotstudie und konnte aufgrund der kleinen analysierten Probanden-Zahl ($n < 30$) keine eindeutigen Ergebnisse liefern, da sich das angewandte Verfahren als zu fehleranfällig und aufwändig herausstellte und in Zukunft modifiziert werden sollte. Eine weitere Erforschung der SNPs erscheint sinnvoll, da auch sie als potenzielle modulierende Faktoren als Angriffspunkte für

Therapie-Interventionen dienen könnten. Besonders aber für die aktuellen Forschungen zur Reduktion des Ataxin-3 Proteins mittels Antisense-Oligonukleotiden könnte die Ataxin-3 Messung einen interessanten potenziellen Biomarker darstellen und zukünftige Therapie-Studien begleiten.

6 Literaturverzeichnis

- ADANYEGUH, I. M., PERLBARG, V., HENRY, P. G., RINALDI, D., PETIT, E., VALABREGUE, R., BRICE, A., DURR, A. & MOCHEL, F. 2018. Autosomal dominant cerebellar ataxias: Imaging biomarkers with high effect sizes. *Neuroimage Clin*, 19, 858-867.
- ADEGBUYIRO, A., SEDIGHI, F., PILKINGTON, A. W. T., GROOVER, S. & LEGLEITER, J. 2017. Proteins Containing Expanded Polyglutamine Tracts and Neurodegenerative Disease. *Biochemistry*, 56, 1199-1217.
- AKIMOTO, C., VOLK, A. E., VAN BLITTERSWIJK, M., VAN DEN BROECK, M., LEBLOND, C. S., LUMBROSO, S., CAMU, W., NEITZEL, B., ONODERA, O., VAN RHEENEN, W., PINTO, S., WEBER, M., SMITH, B., PROVEN, M., TALBOT, K., KEAGLE, P., CHESI, A., RATTI, A., VAN DER ZEE, J., ALSTERMARK, H., BIRVE, A., CALINI, D., NORDIN, A., TRADOWSKY, D. C., JUST, W., DAOUD, H., ANGERBAUER, S., DEJESUS-HERNANDEZ, M., KONNO, T., LLOYD-JANI, A., DE CARVALHO, M., MOUZAT, K., LANDERS, J. E., VELDINK, J. H., SILANI, V., GITLER, A. D., SHAW, C. E., ROULEAU, G. A., VAN DEN BERG, L. H., VAN BROECKHOVEN, C., RADEMAKERS, R., ANDERSEN, P. M. & KUBISCH, C. 2014. A blinded international study on the reliability of genetic testing for GGGGCC-repeat expansions in C9orf72 reveals marked differences in results among 14 laboratories. *J Med Genet.*, 51, 419-424.
- BENCE, N. F., SAMPAT, R. M. & KOPITO, R. R. 2001. Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science*, 292, 1552-5.
- BETTENCOURT, C., HENSMAN-MOSS, D., FLOWER, M., WIETHOFF, S., BRICE, A., GOIZET, C., STEVANIN, G., KOUTSIS, G., KARADIMA, G., PANAS, M., YESCAS-GOMEZ, P., GARCIA-VELAZQUEZ, L. E., ALONSO-VILATELA, M. E., LIMA, M., RAPOSO, M., TRAYNOR, B., SWEENEY, M., WOOD, N., GIUNTI, P., DURR, A., HOLMANS, P., HOULDEN, H., TABRIZI, S. J. & JONES, L. 2016. DNA repair pathways underlie a common genetic mechanism modulating onset in polyglutamine diseases. *Ann Neurol*, 79, 983-90.
- BETTENCOURT, C. & LIMA, M. 2011. Machado-Joseph Disease: from first descriptions to new perspectives. *Orphanet J Rare Dis*, 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, 193-202.
- BIDINOSTI, M., SHIMSHEK, D. R., MOLLENHAUER, B., MARCELLIN, D., SCHWEIZER, T., LOTZ, G. P., SCHLOSSMACHER, M. G. & WEISS, A. 2012. Novel one-step immunoassays to quantify alpha-synuclein: applications for biomarker development and high-throughput screening. *J Biol Chem*, 287, 33691-705.
- BIRD, T. D. 1993. Hereditary Ataxia Overview. In: ADAM, M. P., ARDINGER, H. H., PAGON, R. A., WALLACE, S. E., BEAN, L. J. H., STEPHENS, K. & AMEMIYA, A. (eds.) *GeneReviews((R))*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.
- BOTEZ, M. I., YOUNG, S. N., BOTEZ, T. & PEDRAZA, O. L. 1991. Treatment of heredo-degenerative ataxias with amantadine hydrochloride. *Can J Neurol Sci*, 18, 307-11.
- BOY, J., SCHMIDT, T., WOLBURG, H., MACK, A., NUBER, S., BOTTCHE, 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, 4282-95.

- BRADFORD, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- CAGNOLI, C., BRUSSINO, A., MANCINI, C., FERRONE, M., ORSI, L., SALMIN, P., PAPPI, P., GIORGIO, E., POZZI, E., CAVALIERI, S., DI GREGORIO, E., FERRERO, M., FILLA, A., DE MICHELE, G., GELLERA, C., MARIOTTI, C., NETHISINGHE, S., GIUNTI, P., STEVANIN, G. & BRUSCO, A. 2018. Spinocerebellar Ataxia Tethering PCR: A Rapid Genetic Test for the Diagnosis of Spinocerebellar Ataxia Types 1, 2, 3, 6, and 7 by PCR and Capillary Electrophoresis. *J Mol Diagn*, 20, 289-297.
- CHANG, X. L., MAO, X. Y., LI, H. H., ZHANG, J. H., LI, N. N., BURGUNDER, J. M., PENG, R. & TAN, E. K. 2011. Functional parkin promoter polymorphism in Parkinson's disease: new data and meta-analysis. *J Neurol Sci*, 302, 68-71.
- CHATTERJEE, N., LIN, Y., SANTILLAN, B. A., YOTNDA, P. & WILSON, J. H. 2015. Environmental stress induces trinucleotide repeat mutagenesis in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 112, 3764-9.
- CHUNG, S. J., ARMASU, S. M., BIERNACKA, J. M., LESNICK, T. G., RIDER, D. N., LINCOLN, S. J., ORTOLAZA, A. I., FARRER, M. J., CUNNINGHAM, J. M., ROCCA, W. A. & MARAGANORE, D. M. 2011. Common variants in PARK loci and related genes and Parkinson's disease. *Mov Disord*, 26, 280-8.
- COHEN, N., ZAHAVY, E., ZICHEL, R. & FISHER, M. 2016. An internal standard approach for homogeneous TR-FRET immunoassays facilitates the detection of bacteria, biomarkers, and toxins in complex matrices. *Anal Bioanal Chem*, 408, 5179-88.
- COSTA, M. C., SEQUEIROS, J. & MACIEL, P. 2002. Identification of three novel polymorphisms in the MJD1 gene and study of their frequency in the Portuguese population. *J Hum Genet*, 47, 205-7.
- COSTA, M. D. C. & PAULSON, H. L. 2012. Toward understanding Machado-Joseph Disease. *Progress in Neurobiology*, 97, 239-257.
- COUTINHO, P. & ANDRADE, C. 1978. Autosomal dominant system degeneration in Portuguese families of the Azores Islands. A new genetic disorder involving cerebellar, pyramidal, extrapyramidal and spinal cord motor functions. *Neurology*, 28, 703-9.
- CUI, X., LIANG, Q., LIANG, Y., LU, M., DING, Y. & LU, B. 2014. TR-FRET Assays of Huntingtin Protein Fragments Reveal Temperature and PolyQ Length-Dependent Conformational Changes. *Scientific Reports*, 4, 5601.
- D'ABREU, A., FRANÇA, M. C., PAULSON, H. L. & LOPES-CENDES, I. 2010. Caring for Machado-Joseph Disease: current understanding and how to help patients. *Parkinsonism & related disorders*, 16, 2.
- DA SILVA CARVALHO, G., SAUTE, J. A., HAAS, C. B., TORREZ, V. R., BROCHIER, A. W., SOUZA, G. N., FURTADO, G. V., GHENO, T., RUSSO, A., MONTE, T. L., SCHUMACHER-SCHUH, A., D'AVILA, R., DONIS, K. C., CASTILHOS, R. M., SOUZA, D. O., SARAIVA-PEREIRA, M. L., TORMAN, V. L., CAMEY, S., PORTELA, L. V. & JARDIM, L. B. 2016. Cytokines in Machado Joseph Disease/Spinocerebellar Ataxia 3. *Cerebellum*, 15, 518-25.
- DALDIN, M., FODALE, V., CARIULO, C., AZZOLLINI, L., VERANI, M., MARTUFI, P., SPIEZIA, M. C., DEGUIRE, S. M., CHERUBINI, M., MACDONALD, D., WEISS, A., BRESCIANI, A., VONSATTEL, J.-P. G., PETRICCA, L., MARSH, J. L., GINES, S., SANTIMONE, I., MARANO, M., LASHUEL, H. A., SQUITIERI, F. & CARICASOLE, A. 2017. Polyglutamine expansion affects huntingtin conformation in multiple Huntington's disease models. *Scientific Reports*, 7, 5070.
- DE ASSIS, A. M., SAUTE, J. A. M., LONGONI, A., HAAS, C. B., TORREZ, V. R., BROCHIER, A. W., SOUZA, G. N., FURTADO, G. V., GHENO, T. C., RUSSO, A., MONTE, T. L., CASTILHOS, R. M., SCHUMACHER-SCHUH, A., D'AVILA, R., DONIS, K. C., DE MELLO RIEDER, C. R., SOUZA,

- D. O., CAMEY, S., LEOTTI, V. B., JARDIM, L. B. & PORTELA, L. V. 2017. Peripheral Oxidative Stress Biomarkers in Spinocerebellar Ataxia Type 3/Machado-Joseph Disease. *Front Neurol*, 8, 485.
- DEGORCE, F., CARD, A., SOH, S., TRINQUET, E., KNAPIK, G. P. & XIE, B. 2009. HTRF: A Technology Tailored for Drug Discovery –A Review of Theoretical Aspects and Recent Applications. *Current Chemical Genomics*, 3, 22-32.
- DESTEFANO, A. L., CUPPLES, L. A., MACIEL, P., GASPAR, C., RADVANY, J., DAWSON, D. M., SUDARSKY, L., CORWIN, L., COUTINHO, P., MACLEOD, P., SEQUEIROS, J., ROULEAU, G. A. & FARRER, L. A. 1996. A Familial Factor Independent of CAG Repeat Length Influences Age at Onset of Machado-Joseph Disease. *American Journal of Human Genetics*, 59, 119-127.
- 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-HÜBSCH, T., SCHÖLS, L., HENGEL, H., MELEGH, B., FILLA, A., ANTENORA, A., INFANTE, J., BERCIANO, J., VAN DE WARRENBURG, B. P., TIMMANN, D., BOESCH, S., PANDOLFO, M., SCHULZ, J. B., BAUER, P., GIUNTI, P., KANG, J.-S., KLOCKGETHER, T. & TEZENAS DU MONTCEL, S. 2018. Survival in patients with spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6 (EUROSCA): a longitudinal cohort study. *The Lancet Neurology*, 17, 327-334.
- DISANTO, G., BARRO, C., BENKERT, P., NAEGELIN, Y., SCHÄDELIN, S., GIARDIELLO, A., ZECCA, C., BLENNOW, K., ZETTERBERG, H., LEPPERT, D., KAPPOS, L., GOBBI, C. & KUHLE, J. 2017. Serum Neurofilament light: A biomarker of neuronal damage in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 81, 857-870.
- DONIS, K. C., SAUTE, J. A., KRUM-SANTOS, A. C., FURTADO, G. V., MATTOS, E. P., SARAIVA-PEREIRA, M. L., TORMAN, V. L. & JARDIM, L. B. 2016. Spinocerebellar ataxia type 3/Machado-Joseph disease starting before adolescence. *Neurogenetics*, 17, 107-13.
- DURCAN, T. M. & FON, E. A. 2013. Ataxin-3 and its e3 partners: implications for machado-joseph disease. *Front Neurol*, 4, 46.
- 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, 490-9.
- EVERS, M. M., TOONEN, L. J. & VAN ROON-MOM, W. M. 2014. Ataxin-3 protein and RNA toxicity in spinocerebellar ataxia type 3: current insights and emerging therapeutic strategies. *Mol Neurobiol*, 49, 1513-31.
- FENEBERG, E., OECKL, P., STEINACKER, P., VERDE, F., BARRO, C., VAN DAMME, P., GRAY, E., GROSSKREUTZ, J., JARDEL, C., KUHLE, J., KOERNER, S., LAMARI, F., AMADOR, M. D. M., MAYER, B., MORELLI, C., MUCKOVA, P., PETRI, S., POESEN, K., RAAPHORST, J., SALACHAS, F., SILANI, V., STUBENDORFF, B., TURNER, M. R., VERBEEK, M. M., WEISHAUPT, J. H., WEYDT, P., LUDOLPH, A. C. & OTTO, M. 2018. Multicenter evaluation of neurofilaments in early symptom onset amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, 90, e22-e30.
- FODALE, V., BOGGIO, R., DALDIN, M., CARIULO, C., SPIEZIA, M. C., BYRNE, L. M., LEAVITT, B. R., WILD, E. J., MACDONALD, D., WEISS, A. & BRESCIANI, A. 2017. Validation of Ultrasensitive Mutant Huntingtin Detection in Human Cerebrospinal Fluid by Single Molecule Counting Immunoassay. *Journal of Huntington's Disease*, 6, 349-361.
- FRANCA, M. C., JR., D'ABREU, A., FRIEDMAN, J. H., NUCCI, A. & LOPES-CENDES, I. 2007. Chronic pain in Machado-Joseph disease: a frequent and disabling symptom. *Arch Neurol*, 64, 1767-70.
- FUJITA, K., NAKAMURA, Y., OKA, T., ITO, H., TAMURA, T., TAGAWA, K., SASABE, T., KATSUTA, A., MOTOKI, K., SHIWAKU, H., SONE, M., YOSHIDA, C., KATSUNO, M., EISHI, Y., MURATA,

- M., TAYLOR, J. P., WANKER, E. E., KONO, K., TASHIRO, S., SOBUE, G., LA SPADA, A. R. & OKAZAWA, H. 2013. A functional deficiency of TERA/VCP/p97 contributes to impaired DNA repair in multiple polyglutamine diseases. *Nat Commun*, 4, 1816.
- GABSI, S., GOUIDER-KHOUBA, N., BELAL, S., FKI, M., KEFI, M., TURKI, I., BEN HAMIDA, M., KAYDEN, H., MEBAZAA, R. & HENTATI, F. 2001. Effect of vitamin E supplementation in patients with ataxia with vitamin E deficiency. *Eur J Neurol*, 8, 477-81.
- GASPAR, C., LOPES-CENDES, I., HAYES, S., GOTO, J., ARVIDSSON, K., DIAS, A., SILVEIRA, I., MACIEL, P., COUTINHO, P., LIMA, M., ZHOU, Y. X., SOONG, B. W., WATANABE, M., GIUNTI, P., STEVANIN, G., RIEß, O., SASAKI, H., HSIEH, M., NICHOLSON, G. A., BRUNT, E., HIGGINS, J. J., LAURITZEN, M., TRANEBJAERG, L., VOLPINI, V., WOOD, N., RANUM, L., TSUJI, S., BRICE, A., SEQUEIROS, J. & ROULEAU, G. A. 2001. Ancestral Origins of the Machado-Joseph Disease Mutation: A Worldwide Haplotype Study. *American Journal of Human Genetics*, 68, 523-528.
- GEM-HD-CONSORTIUM 2015. Identification of Genetic Factors that Modify Clinical Onset of Huntington's Disease. *Cell*, 162, 516-26.
- 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, 10266-79.
- 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, 373-7.
- GROUP, B. D. W. 2001. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*, 69, 89-95.
- GU, W., MA, H., WANG, K., JIN, M., ZHOU, Y., LIU, X., WANG, G. & SHEN, Y. 2004. The shortest expanded allele of the MJD1 gene in a Chinese MJD kindred with autonomic dysfunction. *Eur Neurol*, 52, 107-11.
- GUSELLA, J. F. & MACDONALD, M. E. 2009. Huntington's disease: the case for genetic modifiers. *Genome Medicine*, 1, 80.
- HANLEY, R. P., HORVATH, S., AN, J., HOF, F. & WULFF, J. E. 2016. Salicylates are interference compounds in TR-FRET assays. *Bioorg Med Chem Lett*, 26, 973-977.
- HARMA, H., DAHNE, L., PIHLASALO, S., SUOJANEN, J., PELTONEN, J. & HANNINEN, P. 2008. Sensitive quantitative protein concentration method using luminescent resonance energy transfer on a layer-by-layer europium(III) chelate particle sensor. *Anal Chem*, 80, 9781-6.
- HARRISON, J. R. & OWEN, M. J. 2016. Alzheimer's disease: the amyloid hypothesis on trial. *Br J Psychiatry*, 208, 1-3.
- HIRATA, J., DE JONG, C. F., VAN DONGEN, M. M., BUIJS, J., ARIESE, F., IRTH, H. & GOOIJER, C. 2004. A flow injection kinase assay system based on time-resolved fluorescence resonance energy-transfer detection in the millisecond range. *Anal Chem*, 76, 4292-8.
- HOEFIG, H., OTTEN, J., STEFFEN, V., POHL, M., BOERSMA, A. J. & FITTER, J. 2018. Genetically encoded FRET-based biosensors studied on the single-molecule level. *ACS Sens*. Just Accepted.
- HOLMES, B. B. & DIAMOND, M. I. 2012. Cellular mechanisms of protein aggregate propagation. *Curr Opin Neurol*, 25, 721-6.
- [HTTPS://WWW.CISBIO.COM/DRUG-DISCOVERY/TR-FRET-BASICS](https://www.cisbio.com/drug-discovery/tr-fret-basics). Available: <https://www.cisbio.com/drug-discovery/tr-fret-basics> [Accessed 24.01.2018].

- HÜBENER, J., VAUTI, F., FUNKE, C., WOLBURG, H., YE, Y., SCHMIDT, T., WOLBURG-BUCHHOLZ, K., SCHMITT, I., GARDYAN, A., DRIESSE, 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, 1925-1942.
- HÜBENER, 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, 508-18.
- IGARASHI, S., TAKIYAMA, Y., CANCEL, G., ROGAEVA, E. A., SASAKI, H., WAKISAKA, A., ZHOU, Y. X., TAKANO, H., ENDO, K., SANPEI, K., OYAKE, M., TANAKA, H., STEVANIN, G., ABBAS, N., DURR, A., ROGAEV, E. I., SHERRINGTON, R., TSUDA, T., IKEDA, M., CASSA, E., NISHIZAWA, M., BENOMAR, A., JULIEN, J., WEISSENBACH, J., WANG, G. X., AGID, Y., ST GEORGE-HYSLOP, P. H., BRICE, A. & TSUJI, S. 1996. Intergenerational instability of the CAG repeat of the gene for Machado-Joseph disease (MJD1) is affected by the genotype of the normal chromosome: implications for the molecular mechanisms of the instability of the CAG repeat. *Hum Mol Genet*, 5, 923-32.
- JACOBI, H., DU MONTCEL, S. T., BAUER, P., GIUNTI, P., COOK, A., LABRUM, R., PARKINSON, M. H., DURR, A., BRICE, A., CHARLES, P., MARELLI, C., MARIOTTI, C., NANETTI, L., SARRO, L., RAKOWICZ, M., SULEK, A., SOBANSKA, A., SCHMITZ-HUBSCH, T., SCHOLS, L., HENGEL, H., BALIKO, L., MELEGH, B., FILLA, A., ANTENORA, A., INFANTE, J., BERCIANO, J., VAN DE WARRENBURG, B. P., TIMMANN, D., SZYMANSKI, S., BOESCH, S., NACHBAUER, W., KANG, J. S., PANDOLFO, M., SCHULZ, J. B., MELAC, A. T., DIALLO, A. & KLOCKGETHER, T. 2018. Long-term evolution of patient-reported outcome measures in spinocerebellar ataxias. *J Neurol*, 265, 2040-2051.
- JEONG, H., THEN, F., MELIA, T. J., JR., MAZZULLI, J. R., CUI, L., SAVAS, J. N., VOISINE, C., PAGANETTI, P., TANESE, N., HART, A. C., YAMAMOTO, A. & KRAINIC, D. 2009. Acetylation targets mutant huntingtin to autophagosomes for degradation. *Cell*, 137, 60-72.
- JONES, L., HOULDEN, H. & TABRIZI, S. J. 2017. DNA repair in the trinucleotide repeat disorders. *Lancet Neurol*, 16, 88-96.
- KAWAGUCHI, Y., OKAMOTO, T., TANIWAKI, M., AIZAWA, M., INOUE, M., KATAYAMA, S., KAWAKAMI, H., NAKAMURA, S., NISHIMURA, M., AKIGUCHI, I. & ET AL. 1994. CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet*, 8, 221-8.
- KAWAI, Y., TAKEDA, A., ABE, Y., WASHIMI, Y., TANAKA, F. & SOBUE, G. 2004. Cognitive impairments in Machado-Joseph disease. *Arch Neurol*, 61, 1757-60.
- KAZACHKOVA, N., RAPOSO, M., RAMOS, A., MONTIEL, R. & LIMA, M. 2017. Promoter Variant Alters Expression of the Autophagic BECN1 Gene: Implications for Clinical Manifestations of Machado-Joseph Disease. *Cerebellum*, 16, 957-963.
- KHALIL, M., TEUNISSEN, C. E., OTTO, M., PIEHL, F., SORMANI, M. P., GATTRINGER, T., BARRO, C., KAPPOS, L., COMABELLA, M., FAZEKAS, F., PETZOLD, A., BLENNOW, K., ZETTERBERG, H. & KUHLE, J. 2018. Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders. *Nat Rev Neurol*, 14, 577-589.
- KIELING, C., RIEDER, C. R., SILVA, A. C., SAUTE, J. A., CECCHIN, C. R., MONTE, T. L. & JARDIM, L. B. 2008. A neurological examination score for the assessment of spinocerebellar ataxia 3 (SCA3). *Eur J Neurol*, 15, 371-6.
- KLAES, A., RECKZIEGEL, E., FRANCA, M. C., JR., REZENDE, T. J., VEDOLIN, L. M., JARDIM, L. B. & SAUTE, J. A. 2016. MR Imaging in Spinocerebellar Ataxias: A Systematic Review. *AJNR Am J Neuroradiol*, 37, 1405-12.
- LEGLEITER, J., MITCHELL, E., LOTZ, G. P., SAPP, E., NG, C., DIFIGLIA, M., THOMPSON, L. M. & MUCHOWSKI, P. J. 2010. Mutant huntingtin fragments form oligomers in a

- polyglutamine length-dependent manner in vitro and in vivo. *J Biol Chem*, 285, 14777-90.
- LIANG, Y., YAO, Y., LU, M., HOU, J., YU, S. & LU, B. 2014. TR-FRET Assays for Endogenous Huntingtin Protein Level in Mouse Cells. *J Huntingtons Dis*, 3, 253-9.
- LIMA, M. & RAPOSO, M. 2018. Towards the Identification of Molecular Biomarkers of Spinocerebellar Ataxia Type 3 (SCA3)/Machado-Joseph Disease (MJD). *Adv Exp Med Biol*, 1049, 309-319.
- LIN, Y. C., LEE, Y. C., HSU, T. Y., LIAO, Y. C. & SOONG, B. W. 2018. Comparable progression of spinocerebellar ataxias between Caucasians and Chinese. *Parkinsonism Relat Disord*. Just Accepted.
- LONG, Z., CHEN, Z., WANG, C., HUANG, F., PENG, H., HOU, X., DING, D., YE, W., WANG, J., PAN, Q., LI, J., XIA, K., TANG, B., ASHIZAWA, T. & JIANG, H. 2015. Two Novel SNPs in ATXN3 3' UTR May Decrease Age at Onset of SCA3/MJD in Chinese Patients. *PLoS ONE*, 10, e0117488.
- LOSCHER, F., BOHME, S., MARTIN, J. & SEEGER, S. 1998. Counting of single protein molecules at interfaces and application of this technique in early-stage diagnosis. *Anal Chem*, 70, 3202-5.
- LYSENKO, L., GREWAL, R., MA, W. & PEDDAREDDYGARI, L. R. 2010. Homozygous Machado Joseph Disease: A Case Report and Review of Literature. *Can. J. Neurol. Sci.*, 37, 521-3.
- 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)_n tract. *Eur J Hum Genet*, 7, 147-56.
- 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 USA*, 102, 12700-5.
- MASINO, L., MUSI, V., MENON, R. P., FUSI, P., KELLY, G., FRENKIEL, T. A., TROTTIER, Y. & PASTORE, A. 2003. Domain architecture of the polyglutamine protein ataxin-3: a globular domain followed by a flexible tail. *FEBS Lett*, 549, 21-5.
- MILLER, J., ARRASATE, M., BROOKS, E., LIBEU, C. P., LEGLEITER, J., HATTERS, D., CURTIS, J., CHEUNG, K., KRISHNAN, P., MITRA, S., WIDJAJA, K., SHABY, B. A., LOTZ, G. P., NEWHOUSE, Y., MITCHELL, E. J., OSMAND, A., GRAY, M., THULASIRAMIN, V., SAUDOU, F., SEGAL, M., YANG, X. W., MASLIAH, E., THOMPSON, L. M., MUCHOWSKI, P. J., WEISGRABER, K. H. & FINKBEINER, S. 2011. Identifying polyglutamine protein species in situ that best predict neurodegeneration. *Nat Chem Biol*, 7, 925-34.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 7195-7200.
- MOLLENHAUER, B., BATRLA, R., EL-AGNAF, O., GALASKO, D. R., LASHUEL, H. A., MERCHANT, K. M., SHAW, L. M., SELKOE, D. J., UMEK, R., VANDERSTICHELE, H., ZETTERBERG, H., ZHANG, J., CASPELL-GARCIA, C., COFFEY, C., HUTTEN, S. J., FRASIER, M. & TAYLOR, P. 2017. A user's guide for alpha-synuclein biomarker studies in biological fluids: Perianalytical considerations. *Mov Disord*, 32, 1117-1130.
- 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. 2017a. Evaluation of Antisense Oligonucleotides Targeting ATXN3 in SCA3 Mouse Models. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 7, 200-210.
- MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G. & ERLICH, H. 1992. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. 1986. *Biotechnology*, 24, 17-27.

- NAKANO, K. K., DAWSON, D. M. & SPENCE, A. 1972. Machado disease. A hereditary ataxia in Portuguese emigrants to Massachusetts. *Neurology*, 22, 49-55.
- NGUYEN, H. P., HÜBENER, J., WEBER, J. J., GRUENINGER, S., RIEß, O. & WEISS, A. 2013. Cerebellar Soluble Mutant Ataxin-3 Level Decreases during Disease Progression in Spinocerebellar Ataxia Type 3 Mice. *PLOS ONE*, 8, e62043.
- PADIATH, Q. S., SRIVASTAVA, A. K., ROY, S., JAIN, S. & BRAHMACHARI, S. K. 2005. Identification of a novel 45 repeat unstable allele associated with a disease phenotype at the MJD1/SCA3 locus. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 133b, 124-6.
- PAULSON, H. L. 2007. Dominantly inherited ataxias: lessons learned from Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3. *Semin Neurol*, 27, 133-42.
- PENG, H., WANG, C., CHEN, Z., SUN, Z., JIAO, B., LI, K., HUANG, F., HOU, X., WANG, J., SHEN, L., XIA, K., TANG, B. & JIANG, H. 2014. APOE epsilon2 allele may decrease the age at onset in patients with spinocerebellar ataxia type 3 or Machado-Joseph disease from the Chinese Han population. *Neurobiol Aging*, 35, 2179.e15-8.
- RAPOSO, M., BETTENCOURT, C., RAMOS, A., KAZACHKOVA, N., VASCONCELOS, J., KAY, T., BRUGES-ARMAS, J. & LIMA, M. 2017. Promoter Variation and Expression Levels of Inflammatory Genes IL1A, IL1B, IL6 and TNF in Blood of Spinocerebellar Ataxia Type 3 (SCA3) Patients. *Neuromolecular Med*, 19, 41-45.
- RIEß, O., RÜB, U., PASTORE, A., BAUER, P. & SCHÖLS, L. 2008. SCA3: Neurological features, pathogenesis and animal models. *The Cerebellum*, 7, 125-137.
- RIEß, O. & SCHÖLS, L. 1996. Machado-Joseph-Erkrankung in Deutschland: Genetische Diagnostik und klinische Charakteristika. *Dtsch Arztebl International*, 93, A-1108.
- RISTORI, G., ROMANO, S., VISCONTI, A., CANNONI, S., SPADARO, M., FRONTALI, M., PONTIERI, F. E., VANACORE, N. & SALVETTI, M. 2010. Riluzole in cerebellar ataxia: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot trial. *Neurology*, 74, 839-45.
- RODRIGUES, A. J., DO CARMO COSTA, M., SILVA, T. L., FERREIRA, D., BAJANCA, F., LOGARINHO, E. & MACIEL, P. 2010. Absence of ataxin-3 leads to cytoskeletal disorganization and increased cell death. *Biochim Biophys Acta*, 1803, 1154-63.
- ROSENBERG, R. N., NYHAN, W. L., BAY, C. & SHORE, P. 1976. Autosomal dominant striatonigral degeneration. A clinical, pathologic, and biochemical study of a new genetic disorder. *Neurology*, 26, 703-14.
- ROY, R. D., ROSENMUND, C. & STEFAN, M. I. 2017. Cooperative binding mitigates the high-dose hook effect. *BMC Systems Biology*, 11, 74.
- SANGER, F. & COULSON, A. R. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol*, 94, 441-8.
- 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, 731-5.
- SAUTE, J. A. M. & JARDIM, L. B. 2018. Planning Future Clinical Trials for Machado-Joseph Disease. Kapitel 17, 321-348. In: NÓBREGA, C. & PEREIRA DE ALMEIDA, L. (eds.) *Polyglutamine Disorders*. Cham: Springer International Publishing.
- SCAGLIONE, K. M., ZAVODSZKY, E., TODI, S. V., PATURY, S., XU, P., RODRIGUEZ-LEBRON, E., FISCHER, S., KONEN, J., DJARMATI, A., PENG, J., GESTWICKI, J. E. & PAULSON, H. L. 2011. Ube2w and ataxin-3 coordinately regulate the ubiquitin ligase CHIP. *Mol Cell*, 43, 599-612.
- SCARFF, C. A., ALMEIDA, B., FRAGA, J., MACEDO-RIBEIRO, S., RADFORD, S. E. & ASHCROFT, A. E. 2015. Examination of Ataxin-3 (atx-3) Aggregation by Structural Mass Spectrometry Techniques: A Rationale for Expedited Aggregation upon Polyglutamine (polyQ) Expansion. *Mol Cell Proteomics*, 14, 1241-53.

- SCHIETTECATTE, J. A., E.; SMITZ, J.; CHIU, N. H. L.; CHRISTOPOULOS, T. K. 2012. *Interferences in Immunoassays*. Kapitel 3, 45-62. In: CHIU, N. H. L. (eds.) *Advances in Immunoassay Technology*. InTech. Slavka Krautzeka, Shanghai.
- SCHMIDT, J., SCHMIDT, T., GOLLA, M., LEHMANN, L., JONASZ, HÜBENER-SCHMID, J. & RIEß, O. 2016. In vivo assessment of riluzole as a potential therapeutic drug for spinocerebellar ataxia type 3. *Journal of Neurochemistry*, 138, 150-162.
- SCHMIDT, M. H. & PEARSON, C. E. 2016. Disease-associated repeat instability and mismatch repair. *DNA Repair (Amst)*, 38, 117-26.
- 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., DEPONDT, C., SCHOLS, L., ZDIENICKA, E., KANG, J. S., DOHLINGER, S., KREMER, B., STEPHENSON, D. A., MELEGH, B., PANDOLFO, M., DI DONATO, S., DU MONTCEL, S. T. & KLOCKGETHER, T. 2008. Spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6: disease severity and nonataxia symptoms. *Neurology*, 71, 982-9.
- 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., VAN DE WARRENBURG, B. P., DURR, A., KLOCKGETHER, T. & FANCELLU, R. 2006. Scale for the assessment and rating of ataxia: development of a new clinical scale. *Neurology*, 66, 1717-20.
- SCHÖLS, 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, 1603-7.
- SEVIGNY, J., CHIAO, P., BUSSIERE, T., WEINREB, P. H., WILLIAMS, L., MAIER, M., DUNSTAN, R., SALLOWAY, S., CHEN, T., LING, Y., O'GORMAN, J., QIAN, F., ARASTU, M., LI, M., CHOLLATE, S., BRENNAN, M. S., QUINTERO-MONZON, O., SCANNEVIN, R. H., ARNOLD, H. M., ENGBER, T., RHODES, K., FERRERO, J., HANG, Y., MIKULSKIS, A., GRIMM, J., HOCK, C., NITSCH, R. M. & SANDROCK, A. 2016. The antibody aducanumab reduces Aβ plaques in Alzheimer's disease. *Nature*, 537, 50-6.
- SHANG, X.-J., XU, H.-L., YANG, J.-S., CHEN, P.-P., LIN, M.-T., QIAN, M.-Z., LIN, H.-X., CHEN, X.-P., CHEN, Y.-C., JIANG, B., CHEN, Y.-J., CHEN, W.-J., WANG, N., ZHOU, Z.-M. & GAN, S.-R. 2018. Homozygote of spinocerebellar Ataxia type 3 correlating with severe phenotype based on analyses of clinical features. *Journal of the Neurological Sciences*, 390, 111-114.
- SMITH, P. K., KROHN, R. I., HERMANSON, G. T., MALLIA, A. K., GARTNER, F. H., PROVENZANO, M. D., FUJIMOTO, E. K., GOEKE, N. M., OLSON, B. J. & KLENK, D. C. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150, 76-85.
- TAYLOR, J. P., TANAKA, F., ROBITSCHKE, J., SANDOVAL, C. M., TAYE, A., MARKOVIC-PLESE, S. & FISCHBECK, K. H. 2003. Aggresomes protect cells by enhancing the degradation of toxic polyglutamine-containing protein. *Hum Mol Genet*, 12, 749-57.
- TEUNISSEN, C. E., PETZOLD, A., BENNETT, J. L., BERVEN, F. S., BRUNDIN, L., COMABELLA, M., FRANCIOTTA, D., FREDERIKSEN, J. L., FLEMING, J. O., FURLAN, R., HINTZEN, R. Q., HUGHES, S. G., JOHNSON, M. H., KRASULOVA, E., KUHLE, J., MAGNONE, M. C., RAJDA, C., REJDAK, K., SCHMIDT, H. K., VAN PESCH, V., WAUBANT, E., WOLF, C., GIOVANNONI, G., HEMMER, B., TUMANI, H. & DEISENHAMMER, F. 2009. A consensus protocol for the standardization of cerebrospinal fluid collection and biobanking. *Neurology*, 73, 1914-22.
- TEZENAS DU MONTCEL, S., DURR, A., BAUER, P., FIGUEROA, K. P., ICHIKAWA, Y., BRUSSINO, A., FORLANI, S., RAKOWICZ, M., SCHÖLS, L., MARIOTTI, C., VAN DE WARRENBURG, B. P. C.,

- ORSI, L., GIUNTI, P., FILLA, A., SZYMANSKI, S., KLOCKGETHER, T., BERCIANO, J., PANDOLFO, M., BOESCH, S., MELEGH, B., TIMMANN, D., MANDICH, P., CAMUZAT, A., GOTO, J., ASHIZAWA, T., CAZENEUVE, C., TSUJI, S., PULST, S.-M., BRUSCO, A., RIEß, O., BRICE, A. & STEVANIN, G. 2014a. Modulation of the age at onset in spinocerebellar ataxia by CAG tracts in various genes. *Brain*, 137, 2444-2455.
- TEZENAS DU MONTCEL, S., DURR, A., RAKOWICZ, M., NANETTI, L., CHARLES, P., SULEK, A., MARIOTTI, C., ROLA, R., SCHOLS, L., BAUER, P., DUFAURE-GARE, I., JACOBI, H., FORLANI, S., SCHMITZ-HUBSCH, T., FILLA, A., TIMMANN, D., VAN DE WARRENBURG, B. P., MARELLI, C., KANG, J. S., GIUNTI, P., COOK, A., BALIKO, L., BELA, M., BOESCH, S., SZYMANSKI, S., BERCIANO, J., INFANTE, J., BUERK, K., MASCIULLO, M., DI FABIO, R., DEPONDT, C., RATKA, S., STEVANIN, G., KLOCKGETHER, T., BRICE, A. & GOLMARD, J. L. 2014b. Prediction of the age at onset in spinocerebellar ataxia type 1, 2, 3 and 6. *J Med Genet*, 51, 479-486.
- THERMO FISCHER SCIENTIFIC 2012. Protein assay compatibility table.
- THERMO FISCHER SCIENTIFIC. 2019. *Validierung und Qualitätsprüfung von ELISAs* [Online]. Available: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/antibodies/immunoassays/elisa-kits/elisa-kit-validation-quality-testing.html#3>. [Accessed 02.02.2019].
- 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. *Molecular Neurodegeneration*, 13, 31.
- TROTTIER, Y., LUTZ, Y., STEVANIN, G., IMBERT, G., DEVYS, D., CANCEL, G., SAUDOU, F., WEBER, C., DAVID, G., TORA, L. & ET AL. 1995. Polyglutamine expansion as a pathological epitope in Huntington's disease and four dominant cerebellar ataxias. *Nature*, 378, 403-6.
- TROUILLAS, P., TAKAYANAGI, T., HALLETT, M., CURRIER, R. D., SUBRAMONY, S. H., WESSEL, K., BRYER, A., DIENER, H. C., MASSAQUOI, S., GOMEZ, C. M., COUTINHO, P., BEN HAMIDA, M., CAMPANELLA, G., FILLA, A., SCHUT, L., TIMANN, D., HONNORAT, J., NIGHOGHOSSIAN, N. & MANYAM, B. 1997. International Cooperative Ataxia Rating Scale for pharmacological assessment of the cerebellar syndrome. The Ataxia Neuropharmacology Committee of the World Federation of Neurology. *J Neurol Sci*, 145, 205-11.
- VAN DE WARRENBURG, B. P. C., VAN GAALEN, J., BOESCH, S., BURGUNDER, J. M., DÜRR, A., GIUNTI, P., KLOCKGETHER, T., MARIOTTI, C., PANDOLFO, M. & RIEß, O. 2014. EFNS/ENS Consensus on the diagnosis and management of chronic ataxias in adulthood. *European Journal of Neurology*, 21, 552-562.
- VINATIER, G., CORSI, J. M., MIGNOTTE, B. & GAUMER, S. 2015. Quantification of Ataxin-3 and Ataxin-7 aggregates formed in vivo in Drosophila reveals a threshold of aggregated polyglutamine proteins associated with cellular toxicity. *Biochem Biophys Res Commun*, 464, 1060-5.
- VU, L. T. & BOWSER, R. 2017. Fluid-Based Biomarkers for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics*, 14, 119-134.
- WANG, Z. 2017. Experimental and Clinical Strategies for Treating Spinocerebellar Ataxia Type 3. *Neuroscience*, 371, 138-154.
- WARBY, S. C., DOTY, C. N., GRAHAM, R. K., SHIVELY, J., SINGARAJA, R. R. & HAYDEN, M. R. 2009. Phosphorylation of huntingtin reduces the accumulation of its nuclear fragments. *Mol Cell Neurosci*, 40, 121-7.
- WEBER, J. J., GOLLA, M., GUAITOLI, G., WANICHAWAN, P., HAYER, S. N., HAUSER, S., KRAHL, A. C., NAGEL, M., SAMER, S., ARONICA, E., CARLSON, C. R., SCHOLS, L., RIEß, O.,

- GLOECKNER, C. J., NGUYEN, H. P. & HÜBENER-SCHMID, J. 2017. A combinatorial approach to identify calpain cleavage sites in the Machado-Joseph disease protein ataxin-3. *Brain*, 140, 1280-1299.
- WEIR, D. W., STURROCK, A. & LEAVITT, B. R. 2011. Development of biomarkers for Huntington's disease. *Lancet Neurol*, 10, 573-90.
- WEISS, A., TRÄGER, U., WILD, E. J., GRUENINGER, S., FARMER, R., LANDLES, C., SCAHILL, R. I., LAHIRI, N., HAIDER, S., MACDONALD, D., FROST, C., BATES, G. P., BILBE, G., KUHN, R., ANDRE, R. & TABRIZI, S. J. 2012. Mutant huntingtin fragmentation in immune cells tracks Huntington's disease progression. *The Journal of Clinical Investigation*, 122, 3731-3736.
- WHALEY, N. R., FUJIOKA, S. & WSZOLEK, Z. K. 2011. Autosomal dominant cerebellar ataxia type I: a review of the phenotypic and genotypic characteristics. *Orphanet J Rare Dis*, 6, 33.
- WILD, E. J., BOGGIO, R., LANGBEHN, D., ROBERTSON, N., HAIDER, S., MILLER, J. R., ZETTERBERG, H., LEAVITT, B. R., KUHN, R., TABRIZI, S. J., MACDONALD, D. & WEISS, A. 2015. Quantification of mutant huntingtin protein in cerebrospinal fluid from Huntington's disease patients. *J Clin Invest*, 125, 1979-86.
- WILKE, C., BENDER, F., HAYER, S. N., BROCKMANN, K., SCHOLS, L., KUHLE, J. & SYNOFZIK, M. 2018. Serum neurofilament light is increased in multiple system atrophy of cerebellar type and in repeat-expansion spinocerebellar ataxias: a pilot study. *J Neurol*, 265(7), 1618-1624
- WOODS, B. T. & SCHAUMBURG, H. H. 1972. Nigro-spino-dentatal degeneration with nuclear ophthalmoplegia. *Journal of the Neurological Sciences*, 17, 149-166.
- YOSHIDA, H., YOSHIZAWA, T., SHIBASAKI, F., SHOJI, S. & KANAZAWA, I. 2002. Chemical chaperones reduce aggregate formation and cell death caused by the truncated Machado-Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch. *Neurobiol Dis*, 10, 88-99.
- ZAWACKI, T. M., GRACE, J., FRIEDMAN, J. H. & SUDARSKY, L. 2002. Executive and emotional dysfunction in Machado-Joseph disease. *Mov Disord*, 17, 1004-10.
- ZESIEWICZ, T. A., GREENSTEIN, P. E., SULLIVAN, K. L., WECKER, L., MILLER, A., JAHAN, I., CHEN, R. & PERLMAN, S. L. 2012. A randomized trial of varenicline (Chantix) for the treatment of spinocerebellar ataxia type 3. *Neurology*, 78, 545-50.
- ZOGHBI, H. Y. & ORR, H. T. 2000. Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci*, 23, 217-47.

7 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertation

Diese Arbeit wurde im Institut für Medizinische Genetik und angewandte Genomik unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Olaf Rieß durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte durch Frau Dr. rer. nat. Jeannette Hübener-Schmid (*Post-Doc*) und die Initiatoren des ESMI-Konsortiums unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Klockgether (Deutsches Zentrum für neurologische Erkrankungen, Universität Bonn). Die Proben-Kollektion und Erhebung der klinischen Daten und Untersuchungen wurde von den teilnehmenden Partnern des ESMI-Projektes übernommen. In dieser Arbeit sind die Zentren Tübingen, Coimbra, London und Bonn/Heidelberg involviert.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch die Labormitglieder Frau Dr. J. Hübener-Schmid, Herr Dr. J. Weber und Frau D. Flach und Frau K. Gonsior, von mir in Zusammenarbeit mit dem Doktorand Herrn Patrik Pelz durchgeführt.

Die Methode der PCR und Sequenzierung für die Polymorphismen-Analyse wurde größtenteils durch Praktikantin Frau Annika Lambert und ergänzend durch mich durchgeführt. Die Purifikation der DNA aus EDTA-Blut wurde Großteils von mir durchgeführt, während die PCR zur Fragment-Analyse Großteils von Herrn P. Pelz bearbeitet wurde. Die anschließende Fragment-Längen-Analyse wurde von Frau Alexandra Grenzendorf durchgeführt und von Herrn P. Pelz und mir zusammen ausgewertet. Die Aufreinigung der PBMC-Proben, sowie die anschließende Gesamtprotein-Bestimmung und Verwaltung der Proben wurden von Herrn P. Pelz und mir zusammen ausgeführt. Das Pipettieren und Messen der TR-FRET Ansätze wurde für das hier analysierte expandierte Ataxin-3 Protein (Assay MW1-D2 und 1C2-D2) wurde alleinig durch mich durchgeführt. Die Transfektion von HEK-Zellen zur Generierung von überexprimierten Ataxin-3 Positiv-Kontrollen wurde von mir selbst durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig nach Anleitung durch Frau Dr. J. Hübener-Schmid und Frau B.Sc. L. Keller, durch mich. Ich versichere, das Manuskript selbständig nach Anleitung durch Frau Dr. J. Hübener-Schmid verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den _____.

8 Danksagung

Ich möchte allen Personen danken, die bei der Entstehung dieser Arbeit mitgewirkt haben oder mich dabei unterstützten:

Zunächst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Olaf Rieß, der mir als Betreuer dieser Arbeit die Möglichkeit gegeben hat, an seinem Institut in einem solch interessanten und wichtigem Projekt mitzuarbeiten und viele lehrreiche und spannende Erfahrungen, wie die Teilnahme am ESMI-Konsortium oder am Kongress für Neurologie, ermöglichte.

Ebenfalls gilt mein Dank dem 2. Berichterstatter für die Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit.

Des Weiteren möchte ich allen Teilnehmern des ESMI-Projektes für die Zusammenarbeit und den anregenden fachlichen Austausch danken; insbesondere Frau Dr. Heike Jakobi, Herrn Dr. Hector Garcia-Moreno, Herrn Dr. Holger Hengel, Herrn Prof. Dr. Ludger Schöls und Herrn Prof. Dr. Thomas Klockgether.

Ein großer Dank geht an alle Labormitarbeiter und die Mitglieder der SCA-3 Arbeitsgruppe, für die Hilfestellung bei labortechnischen Arbeiten und die Motivation. Besonders zu dieser Arbeit beigetragen haben hier Herr Dr. Jonasz J. Weber, Frau Annika Lambert, Frau Alexandra Grenzendorf, Frau Doris Flach und Frau Yvonne Schelling. Ein ganz besonderer Dank geht an Frau Kathrin Gonsior für die Vorarbeit zu dieser Arbeit und anfängliche Hilfestellung, sowie an Herrn Patrik Pelz für die erfolgreiche, angenehme und unkomplizierte Zusammenarbeit.

Meiner Familie möchte ich für die Unterstützung und den Rückhalt danken, besonders meiner Mutter für die Korrektur dieser Arbeit und meinem Partner für die Hilfe bei alle technischen Problemen.

Ebenso möchte ich dem Team der Praxis Dr. Werner/Dr. Über-Christensen danken, die mir den Berufsstart parallel zur Arbeit an dieser umfangreichen Dissertation ermöglichten.

Ein ganz besonderer Dank gilt allen SCA3-Patienten und Kontrollprobanden. Ohne ihre Bereitschaft und Mitarbeit wäre diese wichtige Forschung nicht möglich.

Abschließend gilt mein ganz besonderer Dank Frau Dr. Jeannette Hübener-Schmid für die hervorragende und umfassende Betreuung dieser Arbeit. Ich konnte sehr viel lernen und nicht zuletzt Dank ihrer klaren, aber auch immer aufmunternden Worte, konnte diese Arbeit entstehen.

Vielen Dank!

9 Anlagen im Anhang

Rater: _____ date: _____ patient: _____	Scale for the assessment and rating of ataxia (SARA)		Rater: _____ date: _____ patient: _____		
<p>1) Gait Proband is asked (1) to walk at a safe distance parallel to a wall including a half turn (turn around to face the opposite direction of gait) and (2) to walk in tandem (heels to toes) without support.</p> <p>0 Normal, no difficulties in walking, turning and walking tandem (up to one misstep allowed)</p> <p>1 Slight difficulties, only visible when walking 10 consecutive steps in tandem</p> <p>2 Clearly abnormal, tandem walking > 10 steps not possible</p> <p>3 Considerable staggering, difficulties in half-turn, but without support</p> <p>4 Marked staggering, intermittent support of the wall required</p> <p>5 Severe staggering, permanent support of one stick or light support by one arm required</p> <p>6 Walking > 10 m only with strong support (two special sticks or stroller or accompanying person)</p> <p>7 Walking < 10 m only with strong support (two special sticks or stroller or accompanying person)</p> <p>8 Unable to walk, even supported</p> <p>Score</p>	<p>2) Stance Proband is asked to stand (1) in natural position, (2) with feet together in parallel (big toes touching each other) and (3) in tandem (both feet on one line, no space between heel and toe). Proband does not wear shoes, eyes are open. For each condition, three trials are allowed. Best trial is noted.</p> <p>0 Normal, able to stand in tandem for > 10 s</p> <p>1 Able to stand with feet together without sway, but not in tandem for > 10 s</p> <p>2 Able to stand with feet together for > 10 s, but only with sway</p> <p>3 Able to stand for > 10 s without support in natural position, but not with feet together</p> <p>4 Able to stand for > 10 s in natural position only with intermittent support</p> <p>5 Able to stand > 10 s in natural position only with constant support of one arm</p> <p>6 Unable to stand for > 10 s even with constant support of one arm</p> <p>Score</p>	<p>3) Sitting Proband is asked to sit on an examination bed without support of feet, eyes open and arms outstretched to the front.</p> <p>0 Normal, no difficulties sitting > 10 sec</p> <p>1 Slight difficulties, intermittent sway</p> <p>2 Constant sway, but able to sit > 10 s without support</p> <p>3 Able to sit for > 10 s only with intermittent support</p> <p>4 Unable to sit for > 10 s without continuous support</p> <p>Score</p>	<p>4) Speech disturbance Speech is assessed during normal conversation.</p> <p>0 Normal</p> <p>1 Suggestion of speech disturbance</p> <p>2 Impaired speech, but easy to understand</p> <p>3 Occasional words difficult to understand</p> <p>4 Many words difficult to understand</p> <p>5 Only single words understandable</p> <p>6 Speech unintelligible / anarthria</p> <p>Score</p>	<p>5) Finger chase Rated separately for each side Proband sits comfortably. Examiner sits in front of proband and performs 5 consecutive saccades and fast pointing movements in unpredictable directions in a frontal plane, at about 50% of proband's reach. Movements have an amplitude of 30 cm and a frequency of 1 movement every 2 s. Proband is asked to follow the movements with his index finger, as fast and precisely as possible. Average performance of last 3 movements is rated.</p> <p>0 No dysmetria</p> <p>1 Dysmetria, under/ overshooting target < 5 cm</p> <p>2 Dysmetria, under/ overshooting target < 15 cm</p> <p>3 Dysmetria, under/ overshooting target > 15 cm</p> <p>4 Unable to perform 5 pointing movements</p> <p>Score</p> <p>mean of both sides (R+L)/2</p>	<p>6) Nose-finger test Rated separately for each side Proband sits comfortably. If necessary, support of feet and trunk is allowed. Proband is asked to point repeatedly with his index finger from his nose to examiner's finger which is in front of the proband at about 90% of proband's reach. Movements are performed at moderate speed. Average performance of movements is rated according to the amplitude of the kinetic tremor.</p> <p>0 No tremor</p> <p>1 Tremor with an amplitude < 2 cm</p> <p>2 Tremor with an amplitude < 5 cm</p> <p>3 Tremor with an amplitude > 5 cm</p> <p>4 Unable to perform 5 pointing movements</p> <p>Score</p> <p>mean of both sides (R+L)/2</p>
		<p>7) Fast alternating hand movements Rated separately for each side Proband sits comfortably. If necessary, support of feet and trunk is allowed. Proband is asked to perform 10 cycles of repetitive alternation of pro- and supinations of the hand on his/her thigh as fast and as precise as possible. Movement is demonstrated by examiner at a speed of approx. 10 cycles within 7 s. Exact times for movement execution have to be taken.</p> <p>0 Normal, no irregularities (performs < 10s)</p> <p>1 Slightly irregular (performs < 10s)</p> <p>2 Clearly irregular, single movements difficult to distinguish or relevant interruptions, but performs < 10s</p> <p>3 Very irregular, single movements difficult to distinguish or relevant interruptions, performs > 10s</p> <p>4 Unable to complete 10 cycles</p> <p>Score</p> <p>mean of both sides (R+L)/2</p>	<p>8) Heel-shin slide Rated separately for each side Proband lies on examination bed, without sight of his legs. Proband is asked to lift one leg, point with the heel to the opposite knee, slide down along the shin to the ankle, and lay the leg back on the examination bed. The task is performed 3 times. Slide-down movements should be performed within 1 s. If proband slides down without contact to shin in all three trials, rate 4.</p> <p>0 Normal</p> <p>1 Slightly abnormal, contact to shin maintained</p> <p>2 Clearly abnormal, goes off shin up to 3 times during 3 cycles</p> <p>3 Severely abnormal, goes off shin 4 or more times during 3 cycles</p> <p>4 Unable to perform the task</p> <p>Score</p> <p>mean of both sides (R+L) / 2</p>		

Anhang 1: Fragebogen des Scale of the Assessment and Rating of Ataxia

Rater: _____ date: _____ Patient code: _____

Inventory of Non-Ataxia Signs (INAS)

NA: not assessed / no information available Mod: moderate

Part one: clinical findings
Please report the (undoubted) occurrence of signs also if abnormal findings occur only on one side

Reflexes	<input type="radio"/> normal	<input type="radio"/> hyperreflexia	<input type="radio"/> areflexia	<input type="radio"/> NA
1. Biceps (BTR)	<input type="radio"/> normal	<input type="radio"/> hyperreflexia	<input type="radio"/> areflexia	<input type="radio"/> NA
2. Patellar (PTR)	<input type="radio"/> normal	<input type="radio"/> hyperreflexia	<input type="radio"/> areflexia	<input type="radio"/> NA
3. Achilles (ATR)	<input type="radio"/> normal	<input type="radio"/> hyperreflexia	<input type="radio"/> areflexia	<input type="radio"/> NA
4. Extensor plantar reflex	<input type="radio"/> none	<input type="radio"/> unilateral	<input type="radio"/> bilateral	<input type="radio"/> NA
Motor symptoms				
5. Spasticity	None	Mild	Mod	Severe
Upper Limbs	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Lower Limbs	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
6. Paresis	None	Mild	Mod	Severe
Face/tongue	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
UL proximal	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
UL distal	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
UL proximal	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
UL distal	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
LL proximal	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
LL distal	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
7. Muscle atrophy	None	Mild	Mod	Severe
Face/tongue	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
UL proximal	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
UL distal	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
UL proximal	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
UL distal	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
LL proximal	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
LL distal	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
8. Fasciculations	None	Mild	Mod	Severe
Face/tongue	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Upper Limbs	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Lower Limbs	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
9. Myoclonus	None	Mild	Mod	Severe
Face/tongue	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Trunk	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Upper Limbs	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Lower Limbs	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
10. Rigidity (should be obvious without movement of opposite limb)	None	Mild	Mod	Severe
Avial	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Upper Limbs	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Lower Limbs	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
11. Chorea/Dyskinesia	None	Mild	Mod	Severe
Face/tongue	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Neck	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Trunk	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Upper Limbs	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Lower Limbs	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
12. Dystonia	None	Mild	Mod	Severe
Face/tongue	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Neck	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Trunk	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Upper Limbs	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Lower Limbs	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
13. Resting tremor	None	Mild	Mod	Severe
	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Sensory symptoms

14. Impaired vibration sense (tested at malleolus ext)

Right foot	None (8/8)	Mild (>5/8)	Mod (2-5/8)	Severe (<2/8)	NA
Left foot	<input type="radio"/>				

Ophthalmological findings

Testing of fixation and smooth pursuit

15. Broken up smooth pursuit	No	Yes	NA
16. Square wave jerks on fixation	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
17. Downbeat-nystagmus on fixation	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
18. Gaze evoked-nystagmus on horizontal testing	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
19. Gaze evoked-nystagmus on vertical testing	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
20. Ophthalmoparesis on horizontal gaze	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
21. Ophthalmoparesis on vertical gaze	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Testing of fast saccades

22. Slowing of saccades	No	Yes	NA
23. Hypometric saccades	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
24. Hypermetric saccades	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Testing of visual function

25. Impaired visual acuity (loss of visual acuity <0.6 for binocular sight in distance testing)

	No	Yes	NA
	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

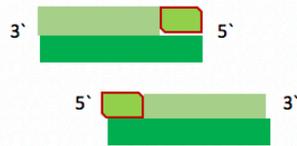
Part Two: reported abnormalities

26. Double vision	None	Mild	Mod	Severe/constant	NA
	<input type="radio"/>				
27. Dysphagia	None	Mild	Mod	Severe/tube feeding	NA
	<input type="radio"/>				
28. Urinary dysfunction	None	Mild	Mod	Severe/catheter	NA
	<input type="radio"/>				
29. Cognitive impairment (according to examiner)	None	Mild	Mod	Severe	NA
	<input type="radio"/>				
30. Other clinical findings or reported abnormalities	(free text) _____				

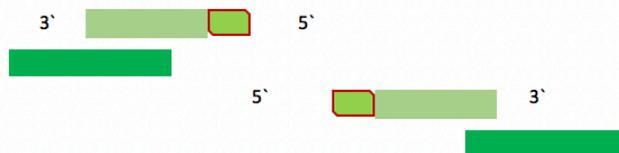
Anhang 2: Fragebogen des *Inventory of Non-Ataxia Signs*

Schematische Darstellung des Ablaufs der Sequenzierungs-PCR

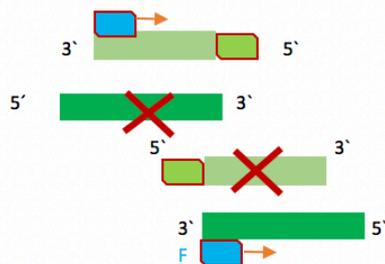
Das gereinigte PCR-Produkt entspricht den gewünschten Genabschnitten, welche den zu analysierenden Polymorphismus beinhalten:



Bei einer Temperatur von 98°C über 3 Minuten wird die DNA initial denaturiert, resultierend in getrennt vorliegenden Einzelsträngen.



Pro Ansatz wird nur 1 Primer (z.B. Forward) pro Ansatz genutzt, wodurch garantiert wird, dass jedes neue Template in derselben Ausrichtung polymerisiert und somit auch sequenziert wird.



Folglich wird nur der DNA-Strang 3'-5' repliziert, welcher zum Erhalt der Zählrichtung der Basenstellen bei jedem Produkt führt.

Die Besonderheit des PCR-Ansatzes liegt, neben dem Gebrauch von nur einer Primer-Variante darin, dass fluoreszenz-markiert (Farbe je Base) Dantes genutzt werden, welche zum Kettenabbruch führen. Da dies statistisch gesehen mindestens einmal pro Basen-Stelle passiert, kann so die Basenabfolge gemessen an der Fluoreszenz bestimmt werden.



	Primer aus vorheriger PCR		fluoreszenz-markierte Base
	Primer der Seq-PCR		Cytosin
	Keine Replikation		Adenosin
	DNA-Einzelstrang		Thymin
	Replikationsrichtung		Guanin

Anhang 3: Schematische Darstellung des Ablaufs der Sequenzierungs-PCR und anschließende Sequenz-Analyse nach Sanger

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Gabriele Anna Kaucher
 Geburtsdatum: 09.08.1992
 Geburtsort: Lörrach, BW

Schulische Laufbahn:

1999-2003: Dr. Max-Metzger-Grundschule, Schopfheim
 2003-2012: Theodor-Heuss-Gymnasium, Schopfheim
 Juni 2012: Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
 Note 1,0

Studium:

Oktober 2012-
 November 2017: Studium Zahnmedizin an der Eberhard-Karls Universität
 Tübingen
 11.09.2013: Naturwissenschaftliche Vorprüfung, Urteil *sehr gut*
 19.03.2015: Zahnärztliche Vorprüfung, Urteil *sehr gut*
 28.11.2017: Zahnärztliche Prüfung, Urteil *sehr gut*
 08.12.2017: Erhalt der Approbation als Zahnärztin
 Oktober 2015-
 Februar 2017: Studium der Human Medizin im Doppelstudium an der
 Eberhard-Karls Universität Tübingen, ohne Abschluss
 beendet

Wissenschaftliche Arbeit:

September 2016-
 November 2018: Promotion „Ataxin-3 als potenzieller Biomarker in der
 Erkrankung der Spinozerebellären Ataxie Typ 3“ bei Herrn
 Prof. Dr. Olaf Rieß in der Arbeitsgruppe SCA3 am Institut
 für medizinische Genetik und angewandte Genomik,
 Eberhard-Karls Universität Tübingen.
 Mai 2018: Teilnahme am *ESMI-Konsortium*, Ponta Delgada, Azoren
 mit Vortag *Workgroup 4*
 November 2018: Teilnahme am Kongress der „Deutschen Gesellschaft für
 Neurologie“, Berlin
 mit Posterpräsentation *Kleinhirn- und Hirnstamm-Syndrome*

Veröffentlichungen im Zuge dieser Arbeit:

Präsentation:

3. ESMI-Meeting, 24./25.05.2018, Ponta Delgada, Azoren, Portugal

Workpackage 4, Biochemical markers:
„Ataxin-3 measurements in PBMCs and biofluids“

Poster:

91. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, 30.10.-03.11.2018;
Neurowoche, Berlin

Posterpräsentation, Kleinhirn- und Hirnstamm-Syndrome:
„Ataxin-3 as a potential biomarker in the Spinocerebellar Ataxia Typ 3“