

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

**Parkin und Ataxin-3 als potenzielle Biomarker in der  
Spinozerebellären Ataxie Typ 3 (SCA3)**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Pelz, Patrik

2022

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. O. Rieß

2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. K. Brockmann

Tag der Disputation: 05.10.2022

*Für meinen Opa Horst  
Ruhe in Frieden*

Inhaltsverzeichnis	
Abbildungsverzeichnis	2
Tabellenverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung	7
1.1 Die Spinozerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3)	7
1.2 Proteine	12
1.3 Biomarker und klinische Tests	16
1.4 Hochsensitive Messverfahren zur Proteinbestimmung in humanen Biomaterialien	19
1.5 Genetische Variationen in den zu untersuchenden Genen <i>ATXN3</i> und <i>PARK2</i>	23
1.6 <i>European Spinocerebellar Ataxia Type 3/ Machado-Joseph Disease Initiative (ESMI)</i>	26
1.7 Ziel der Arbeit	27
2 Material und Methoden	29
2.1 Statement zum Ethikvotum	29
2.2 Material	29
2.2.1 Geräte und Softwares	29
2.2.2 Verbrauchsmaterialien	30
2.2.3 Kits	31
2.2.4 Puffer, Lösungen und Chemikalien	32
2.2.5 Antikörper	34
2.2.6 Primer	34
2.3 Methoden	35
2.3.1 Blut	35
2.3.2 DNA-Methoden	37
2.3.3 Proteine	42
2.4 Statistische Auswertung	50
3 Ergebnisse	51

3.1	Ziel der Studie _____	51
3.2	Etablierung des TR-FRET-Assays _____	52
3.2.1	Etablierung des TR-FRET-Assays für das lösliche <i>full-length</i> Ataxin-3 Protein _____	52
3.2.2	Etablierung des TR-FRET-Assays für das lösliche Parkin Protein _____	56
3.2.3	Etablierung des TR-FRET-Assays in CSF _____	60
3.2.4	TR-FRET-Assay in anderen Biomaterialien _____	67
3.3	Ergebnisse der statistischen Auswertung _____	69
3.3.1	Übersicht der ESMI-Kohorte _____	69
3.3.2	Vergleich der klinischen Parameter mit den Messergebnissen für das lösliche <i>full-length</i> Ataxin-3 Protein _____	83
3.3.3	Vergleich der klinischen Parameter mit den Messergebnissen für das lösliche Parkin Protein _____	89
3.3.4	Ergebnisse der Sequenzierung der <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (SNP) _____	97
4	Diskussion _____	103
4.1	Etablierung des TR-FRET-Assays _____	103
4.1.1	Etablierung des TR-FRET-Assays für die Proteinbestimmung in PBMCs _____	103
4.1.2	TR-FRET-Assays zur Proteinbestimmung in CSF und anderen Biomaterialien _____	110
4.2	Analyse der klinischen Parameter mit den Messergebnissen _____	117
4.2.1	Analyse der klinischen Parameter _____	117
4.2.2	<i>Full-length</i> Ataxin-3 als möglicher Biomarker in der SCA3 _____	122
4.2.3	Parkin als möglicher Biomarker in der SCA3 _____	125
4.2.4	Einfluss von SNPs in <i>ATXN3</i> und <i>PARK2</i> auf die SCA3 _____	129
5	Zusammenfassung und Fazit _____	133
6	Literaturverzeichnis _____	135
7	Erklärung zum Eigenanteil _____	145
8	Veröffentlichungen _____	147
9	Danksagung _____	149

## Abbildungsverzeichnis

Nummer	Titel	Seite
1.1	Schematische Darstellung des Ataxin-3 Proteins	12
1.2	Modell der Proteinspaltung durch Calpain II	13
1.3	Schematische Darstellung des Parkin Proteins	15
1.4	Darstellung unterschiedlicher Biomarker Kategorien mit Anwendungsbeispielen	16
1.5	Schematische Darstellung der Antikörperinteraktion bei der Proteinbestimmung mittels TR-FRET	21
1.6	Schematische Darstellung des Energietransfers von Donor auf Akzeptor, modifiziert nach Cui et al., 2014	22
1.7	Formeln zur Berechnung von $\Delta F$ und $\Delta F_c$	22
1.8	Der genetische Code	24
3.1.1	Ablauf der Studie	52
3.2.1	Analyse des linearen Messbereiches von Ataxin-3	54
3.2.2	Verteilungsmuster der Proben auf der 384-Well-Platte für den Intraplattentest	55
3.2.3	Intraplattentest für das lösliche Ataxin-3	56
3.2.4	Interplattentest für das lösliche Ataxin-3	56
3.2.5	Linearer Messbereich des Parkin TR-FRET Assays	57
3.2.6	Intraplattentest für das lösliche Parkin	59
3.2.7	Interplattentest für das lösliche Parkin	59
3.2.8	Vergleich Parkin V380 und L380 in den Konzentrationen 5 und 50 pg/ $\mu$ l	60
3.2.9	Messergebnisse der unterschiedlichen Ansätze	63
3.2.10	Ergebnisse für die Kalibrationsmatrix 1	65
3.2.11	Ergebnisse für die Kalibrationsmatrix 2	66
3.2.12	Ergebnisse für die Kalibrationsmatrix 3	66
3.2.13	<i>full-length</i> Ataxin-3 in anderen Biomaterialien	68
3.2.14	Parkin in anderen Biomaterialien	69
3.3.1	Alter bei Probenentnahme bei unterschiedlichem Erkrankungsstatus	71
3.3.2	Verschiedene klinische Parameter bei unterschiedlichem Geschlecht	72
3.3.3	Verschiedene klinische Parameter bei unterschiedlichen erfassenden Zentren	73
3.3.4	SARA-Score bei unterschiedlichem Erkrankungsstatus	74
3.3.5	INAS-Score bei unterschiedlichem Erkrankungsstatus	75
3.3.6	Vergleich SARA-Score mit Alter bei Erkrankungsbeginn	76
3.3.7	Vergleich INAS-Score mit Alter bei Erkrankungsbeginn eingeteilt in AAO $\leq$ 30, 31-40, 41-50 und $>$ 50 Jahren	76
3.3.8	Vergleich SARA-Score mit der mutCAG-Anzahl eingeteilt in mutCAG-Anzahl $\leq$ 65, 66-70 und $>$ 70	77
3.3.9	Vergleich INAS-Score mit der mutCAG-Anzahl eingeteilt in mutCAG-Anzahl $\leq$ 65, 66-70 und $>$ 70	77
3.3.10	Vergleich AAO mit der mutCAG-Anzahl	78

3.3.11	Vergleich AAO mit mutCAG-Anzahl eingeteilt in Gruppen mit mutCAG-Anzahl ≤65, 66-70 und >70	79
3.3.12	Vergleich CSDP mit der mutCAG-Anzahl	80
3.3.13	Vergleich CSDP mit der mutCAG-Anzahl eingeteilt in mutCAG-Anzahl ≤65, 66-70 und >70	81
3.3.14	Vergleich CSDP mit AAO	82
3.3.15	Lösliches <i>full-length</i> Ataxin-3 bei unterschiedlichem Geschlecht und unterschiedlichen erfassenden Zentren	84
3.3.16	Lösliches <i>full-length</i> Ataxin-3 bei unterschiedlichem Erkrankungsstatus	85
3.3.17	Vergleich lösliches <i>full-length</i> Ataxin-3 mit SARA-Score	86
3.3.18	Vergleich lösliches <i>full-length</i> Ataxin-3 mit INAS-Score	87
3.3.19	Vergleich lösliches <i>full-length</i> Ataxin-3 mit dem Alter bei Erkrankungsbeginn	87
3.3.20	Vergleich lösliches <i>full-length</i> Ataxin-3 mit der mutCAG-Zahl	88
3.3.21	Vergleich lösliches <i>full-length</i> Ataxin-3 mit CSDP-Score	89
3.3.22	Parkin bei unterschiedlichem Geschlecht und unterschiedlichen erfassenden Zentren	91
3.3.23	Parkin bei unterschiedlichem Erkrankungsstatus	93
3.3.24	Vergleich Parkin mit SARA-Score	94
3.3.25	Vergleich Parkin mit INAS-Score	94
3.3.26	Vergleich Parkin mit dem Alter bei Erkrankungsbeginn	95
3.3.27	Vergleich Parkin mit der mutCAG-Anzahl	96
3.3.28	Vergleich Parkin mit CSDP-Score	96
3.3.29	SNPs im <i>ATXN3</i> -Gen	99
3.3.30	SNPs im <i>PARK2</i> -Gen	101
4.1.1	Erwartete Proteinmenge von Ataxin-3 in verschiedenen Blutbestandteilen	109
4.1.2	Gen-Expression von <i>ATXN3</i> in ausgewählten Biomaterialien	114
4.1.3	Gen-Expression von <i>PARK2</i> in ausgewählten Biomaterialien	115

## Tabellenverzeichnis

Nummer	Titel	Seite
1.1	Zusammenfassende Informationen zu den bekannten Polyglutamin-Erkrankungen	8
1.2	Übersicht der analysierten SNPs	25
2.1	Übersicht der verwendeten Geräte	29
2.2	Übersicht der verwendeten Softwares	30
2.3	Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien	30
2.4	Übersicht der verwendeten Kits	31
2.5	Übersicht der verwendeten Puffer und Lösungen	32
2.6	Übersicht der verwendeten Chemikalien und Biomaterialien	32
2.7	Übersicht der verwendeten Antikörper	34
2.8	Übersicht der verwendeten Primer	34
2.9	PCR-Ansatz zur Fragmentlängenanalyse	38
2.10	Programm des G-Strom Thermocyclers für die PCR zur Fragmentlängenanalyse	38
2.11	Übersicht der PCR-Ansätze für die unterschiedlichen SNPs	40
2.12	Übersicht der Programme des G-Strom Thermocyclers	40
2.13	Grundgerüst des Ansatzes für die Kettenabbruchsynthese nach Sanger	41
2.14	Übersicht der verwendeten Primer für die Kettenabbruchsynthese nach Sanger	41
2.15	Programm des G-Storm Thermocyclers für die Kettenabbruchsynthese nach Sanger	42
3.1	Beschreibung der Ansätze	61
3.2	Unterschiede in der Durchführung des Verfahrens zur Herstellung einer CSF-Kalibrationsmatrix	64
3.3	Übersicht über die Kohorte	70
3.4	Übersicht über die Anzahl der Probanden eingeteilt nach erfassenden Zentren	72
3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse aus Abschnitt 3.3.1	82
3.6	Zusammenfassung der Ergebnisse aus Abschnitt 3.3.2	89
3.7	Anzahl der Probanden, bei denen ein Messergebnis für das lösliche Parkin vorlag, aufgeteilt nach erfassendem Zentrum und Geschlecht	92
3.8	Zusammenfassung der Ergebnisse aus Abschnitt 3.3.3	97
3.9	Zusammenfassung der Ergebnisse aus Abschnitt 3.3.4	102



## Abkürzungsverzeichnis

AAO	Alter bei Erkrankungsbeginn ( <i>age at onset</i> )
ADCA	Autosomal dominant vererbte, zerebelläre Ataxien
AS	Aminosäuren
CSDP	<i>cross-sectional disease progression</i>
CSF	<i>Cerebrospinal fluid</i>
ESMI	<i>European Spinocerebellar Ataxia Type 3/Machado-Joseph Disease Initiative</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GST	Glutathion-S-Transferasen
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
INAS	<i>Inventory of Non-Ataxia Signs</i>
IPSC	Induzierte pluripotente Stammzellen
MJD	Machado-Joseph-Erkrankung
MSD	<i>meso scale discovery</i>
NfL	Neurofilament Leichtkette
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
rcf	relative Zentrifugalbeschleunigung ( <i>relative centrifugal force</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
SARA	<i>Scale for the assessment and rating of ataxia</i>
SCA3	Spinozerebelläre Ataxie Typ 3
Simoa	<i>single molecule array</i>
SMC	<i>single molecule counting</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TR-FRET	<i>Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>



# 1 Einleitung

## 1.1 Die Spinozerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3)

Die Spinozerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3) ist eine neurodegenerative Erkrankung und wird auch Machado-Joseph-Erkrankung (MJD) genannt. Diese Bezeichnung der Erkrankung kommt von den beiden Familien Machado und Joseph, die beide von den portugiesischen Azoren stammen und bei denen die Symptome der SCA3 erstmals beschrieben wurden (Nakano et al., 1972, Rosenberg et al., 1976, Woods and Schaumburg, 1972). Die SCA3 wird autosomal dominant vererbt und zählt zum Formenkreis der Ataxie-Krankheiten. Sie ist weltweit die häufigste Form der autosomal dominant vererbten, zerebellären Ataxie (ADCA) und macht in Deutschland ca. 40% dieser Erkrankungsgruppe aus (Bird, 1993, Paulson, 2007, Whaley et al., 2011).

Der SCA3 liegt eine Expansion von CAG-Wiederholungen im *ATXN3*-Gen auf Chromosom 14q32.1 zu Grunde. Bei Trägern dieser Mutation ist dieser Bereich mit 55-86 CAG-Wiederholungen deutlich länger als der des üblichen 13-36 Basentriplets (Adegbuyiro et al., 2017, Kawaguchi et al., 1994). Darüber hinaus gibt es einen Intermediär-Bereich von 45-54 CAG-Wiederholungen. Bei Personen in diesem Bereich zeigt sich nicht immer eine Manifestation der Erkrankung (Riess et al., 2008). Aufgrund der autosomal dominanten Vererbung ist die Mutation auf einem Allel ausreichend, um an der SCA3 zu erkranken. Fast alle SCA3-Patienten sind somit nur heterozygote Mutationsträger. Homozygote Mutationsträger sind sehr selten, daher gibt es nur wenige Fall-Berichte (Lysenko et al., 2010). Shang et al. haben in ihrer Metaanalyse von 14 homozygoten Mutationsträgern aus unterschiedlichen Kohorten zeigen können, dass homozygote Mutationsträger im Vergleich zu heterozygoten Mutationsträgern früher erkranken und eine stärkere Progredienz der Erkrankung aufweisen (Shang et al., 2018). Generell zeigt sich bei Mutationsträgern ein Effekt, den man Antizipation nennt. Das bedeutet, dass die Anzahl der CAG-Wiederholungen in der DNA eines SCA3-Patienten proportional mit der Ausprägung der Erkrankung und umgekehrt proportional mit dem Alter bei Erkrankungsbeginn (*age at onset*, AAO) korreliert (Durr et al., 1996).

Diese Korrelationen wurden ebenfalls bei anderen Erkrankungen wie beispielsweise Chorea Huntington, weiteren spinocerebellären Ataxien (SCA1, 2, 6, 7 und 17) und der Spinobulbären Muskelatrophie Typ Kennedy festgestellt.

**Tabelle 1.1:** Zusammenfassende Informationen zu den bekannten Polyglutamin-Erkrankungen

Erkrankung	Betroffenes Gen/Protein	Expandierte Polyglutamin-Anzahl *	Typische Symptome
Chorea Huntington	<i>HTT</i> Huntingtin	36 - 121	Psychiatrische Auffälligkeiten, kognitive Einschränkungen, Chorea, Dystonie
Spinobulbäre Muskelatrophie Typ Kennedy	<i>AR</i> Androgen Rezeptor	38 - 62	Muskelschwäche, Faszikulationen, Dysarthrie, Dysphagie, Gynäkomastie
SCA1	<i>ATXN1</i> Ataxin-1	39 - 82	Ataxie, Sprachstörungen, Spastik, kognitive Einschränkungen
SCA2	<i>ATXN2</i> Ataxin-2	32 - 200	Ataxie, Polyneuropathie, verminderte Reflexe, Retinopathie bei Kindern
SCA3	<i>ATXN3</i> Ataxin-3	55 - 86	Ataxie, Parkinsonismus, Dysphagie, Depressionen, Spastik, Schlafstörungen
SCA6	<i>CACNA1A</i> <i>CACNA1A</i>	21 - 33	Ataxie, Dysarthrie, Nystagmus, Tremor
SCA7	<i>ATXN7</i> Ataxin-7	37 - 306	Ataxie, Blindheit, Herzfehler bei Kindern
SCA17	<i>TBP</i> TATA-Box bindendes Protein	47 - 63	Ataxie, Krampfanfälle, kognitive Einschränkungen, psychiatrische Auffälligkeiten

\* variiert je nach Literatur  
SCA: Spinozerebelläre Ataxie

Mit Ausnahme der Spinobulbären Muskelatrophie Typ Kennedy, die X-chromosomal vererbt wird, werden diese Erkrankungen autosomal dominant vererbt. Da bei all diesen Erkrankungen eine Expansion des Basentriplet CAG zu Grunde liegt und dieses Basentriplet CAG bei der Synthese von Proteinen für Glutamin kodiert, fasst man sie als Polyglutamin-Erkrankungen (polyQ)

zusammen. Aufgrund der Mutation zeigen diese Erkrankungen vergleichbare Pathomechanismen. Dabei wird das für die Erkrankung spezifische Protein durch Glutamin, je nach Ausmaß der Expansion des Basentriplets CAG im betroffenen Gen, verlängert (Tabelle 1.1). Dadurch kommt es zu einer fehlerhaften Funktion und Interaktion des Proteins und zur Bildung von unlöslichen Aggregaten. Diese Aggregate können dabei in unterschiedlichen Formen (z.B. fibrillär oder ringförmig, aber auch amorph) vorliegen (Adegbuyiro et al., 2017) und bilden letztlich die für die jeweilige Polyglutamin-Erkrankung charakteristischen zytoplasmatischen oder intranukleären Einschlüsse (Legleiter et al., 2010). Wie genau fehlgefaltete Proteine und Aggregate die Entstehung der Erkrankungen beeinflussen, ist noch unklar. Es wird sogar über eine protektive Wirkung von Aggregaten diskutiert (Taylor et al., 2003).

Auch wenn die Polyglutamin-Erkrankungen einige Gemeinsamkeiten aufweisen, führen die unterschiedlichen Funktionen und Lokalisationen der jeweils betroffenen Proteine zu unterschiedlichen, krankheitsspezifischen Symptomen. Bei der SCA3, welche in dieser Dissertation untersucht wurde, kommt es durch diesen Pathomechanismus zur Degeneration im Bereich des Zerebellums, des Hirnstamms, der Basalganglien, des Rückenmarks und des peripheren Nervensystems (Murata et al., 1998, Rub et al., 2004, Rub et al., 2002a, Rub et al., 2002b). Da die Aufgaben der betroffenen Bereiche stark variieren, können SCA3-Patienten unterschiedliche Symptome in unterschiedlicher Intensität ausprägen. SCA3-Patienten leiden an Bewegungsstörungen der Extremitäten mit Problemen beim Gehen, Stehen und sogar Sitzen (Ataxie = griechisch für „das Fehlen von Ordnung“). Störungen der Augenmotilität, Dysarthrie, Dysphagie und Spastiken gehören ebenfalls zu den häufig beobachteten motorischen Störungen (Coutinho and Andrade, 1978, Schols et al., 1996). Ebenso können einige nicht-motorische Störungen wie Schlafstörungen (z.B. das *Restless-Leg-Syndrom*) (Schols et al., 1998), chronische Schmerzen (Franca et al., 2007), Depressionen, vermindertes Sprechvermögen und Gedächtnisstörungen bei den Patienten auftreten (D'Abreu et al., 2010, Kawai et al., 2004, Zawacki et al., 2002). Anhand der Symptomatik eines Patienten und des AAOs kann zwischen verschiedenen Subtypen der Erkrankung unterschieden werden. In Schols et al.,

1996 werden drei dieser Subtypen beschrieben. Dabei definiert sich Subtyp 1 durch ein frühes AAO (10-30 Jahre), ausgeprägter Rigidität, Dystonie, Ataxie und Spastiken. Bei Subtyp 2, dem häufigsten Subtyp, liegt das AAO zwischen 20 und 45 Jahren. Diese Patienten weisen vor allem schwere Ataxien und Spastiken auf. Patienten, die dem Subtyp 3 zugeordnet werden, sind bei Erkrankungsbeginn 40 Jahre oder älter. Sie leiden vor allem unter verschiedenen Polyneuropathien, Sensibilitätsstörungen und Muskelkrämpfen. Die Progredienz der Erkrankung wird von Subtyp 1 zu Subtyp3 langsamer. Beim Subtyp 4, welcher später zusätzlich beschrieben wurde, zeigen Patienten einen ausgeprägten Parkinsonismus (Paulson, 2007). Dabei spielt das AAO keine entscheidende Rolle.

Um die Symptomatik besser und vor allem auch objektiver beurteilen zu können, werden bei der klinischen Untersuchung von SCA3-Patienten verschiedene klinische Tests durchgeführt. Zur Beurteilung der Ataxie wird vorrangig der *Scale of the Assessment and Rating of Ataxia* (SARA) verwendet. Dabei werden das Gangbild, die Haltung beim Stehen und Sitzen, die Motorik der oberen und unteren Extremitäten und auch die Sprachbildung untersucht und nach klaren Vorgaben bewertet (Subramony, 2007). Zur Überprüfung der nicht-ataktischen Symptome wird der *Inventory of Non-Ataxia Signs* (INAS) verwendet. Hierbei geht es unter anderem um Symptome wie Lähmungen, Spastiken oder Muskelzuckungen (Jacobi et al., 2013a).

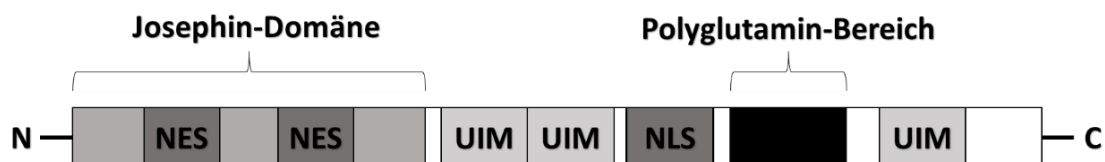
Neben der klinischen Untersuchung sollte bei der Diagnostik der SCA3 auf eine ausgiebige Familienanamnese geachtet werden. Des Weiteren zählt die Magnet-Resonanz-Tomografie (MRT) zur Basisdiagnostik (van de Warrenburg et al., 2014). In einer Zusammenfassung von 18 Studien von 1995 bis 2016 wurden signifikante Atrophien in den zerebellaren Hemisphären, dem Vermis cerebelli, dem gesamten Hirnstamm, dem Striatum, dem Thalamus und dem Rückenmark der Halswirbelsäule beschrieben, die bei SCA3-Patienten nachgewiesen werden konnten (Klaes et al., 2016). Diagnostisch wird die SCA3 durch eine genetische Untersuchung bestätigt, welche die Anzahl der CAG-Wiederholungen auf DNA-Ebene bestimmt. Dabei sollte zusätzlich auf die gängigsten Ataxie-Formen (SCA1, 2, 3, 6, 7) gescreent werden (van de Warrenburg et al., 2014).

Die Therapie der SCA3 besteht bisher lediglich aus dem Eindämmen und Verlangsamen der Symptome, da zurzeit keine kausale Therapie existiert. Mit Medikamenten, aber auch physiotherapeutischen und logopädischen Interventionen werden die Patienten behandelt (Wang, 2018). In verschiedenen Studien wurden Substanzen wie Amantadin, Riluzol und Vareniclin zur symptomatischen Behandlung getestet, jedoch konnten keine eindeutigen Ergebnisse festgestellt werden (Botez et al., 1991, Ristori et al., 2010, Zesiewicz et al., 2012). Versuche, eine kausale Therapie zu etablieren, blieben bislang erfolglos. Beispielweise kam es im Maus-Modell durch die Gabe von Riluzol zwar zu einer Verringerung des löslichen Ataxin-3, jedoch blieb die Verbesserung der Symptomatik aus (Schmidt et al., 2016).

Ein interessanter und wichtiger Angriffspunkt für eine kausale Therapie ist das sogenannte „*Disease protein lowering*“. Ein vielversprechender Ansatz dafür ist der Einsatz von Antisense-Oligonukleotiden (ASO) und miRNA. In Maus-Modellen zeigten sich dabei erste Erfolge (Evers et al., 2013, Moore et al., 2017, McLoughlin et al., 2020, Martier et al., 2019). Jedoch ist bisher nicht geklärt, ob durch die verringerte Menge an Ataxin-3 das Gleichgewicht der Körperfunktionen nachhaltig gestört wird. In Zellmodellen kam es durch fehlendes Ataxin-3 zur Desorganisation des Zytoskeletts und zu vermehrtem Zelltod (Rodrigues et al., 2010). Dahingegen konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, dass die Fruchtbarkeit und Vitalität der Mäuse durch das Fehlen von Ataxin-3 nicht beeinflusst werden und sich die Krankheitssymptome bessern (Schmitt et al., 2007). In Fadenwürmern wurde sogar eine verbesserte Stress-Reaktion durch den Verlust von Ataxin-3 festgestellt (Rodrigues et al., 2011). Somit bleibt bisher unklar, welche Folgen die Reduktion von Ataxin-3 im menschlichen Körper hat. Um den Erfolg von Therapieansätzen besser evaluieren zu können, aber auch neue Ziele für einen kausalen Therapieansatz aufzuzeigen, bedarf es noch mehr Grundlagenforschung. Daher wird in dieser Arbeit das Ataxin-3 Protein und der direkte Interaktionspartner Parkin analysiert.

## 1.2 Proteine

Das Ataxin-3 Protein wird aus dem *ATXN3*-Gen translatiert und ist ca. 41 kDa schwer. Durch die Mutation im *ATXN3*-Gen kommt es zu einem polyQ expandierten Ataxin-3 Protein. Die Gesamtheit des Ataxin-3 Proteins, also sowohl das expandierte, pathologische als auch das nicht-expandierte, nicht-pathologische Protein, wird *full-length* Ataxin-3 genannt. Beide Formen des Proteins werden im gesamten Gehirn aber auch im restlichen Körper produziert. Dabei sind beide Formen größtenteils im Zytoplasma zu finden (Paulson et al., 1997). Unabhängig der Mutation kann Ataxin-3 in verschiedenen Isoformen vorliegen. Es sind 20 funktionale Isoformen bekannt, die meistens durch verschiedene *Splice*-Varianten entstehen und sich dadurch in ihrem C-terminalen Ende unterscheiden (Bettencourt et al., 2010). Der grundsätzliche Aufbau des Proteins bleibt dabei weitestgehend gleich. Der stark konservierte Bereich am N-terminalen Ende enthält die sogenannte Josephin-Domäne mit zwei Kern-Export-Signalen (NES) und der PolyQ-Bereich befindet sich zusammen mit dem Kern-Lokalisations-Signal (NLS) am eher unstrukturierten C-terminalen Ende. Zusätzlich befinden sich, je nach Isoform, zwei oder drei Ubiquitin-Interaktions-Motive (UIM) im Ataxin-3 Protein (Masino et al., 2003) (Abb. 1.1).



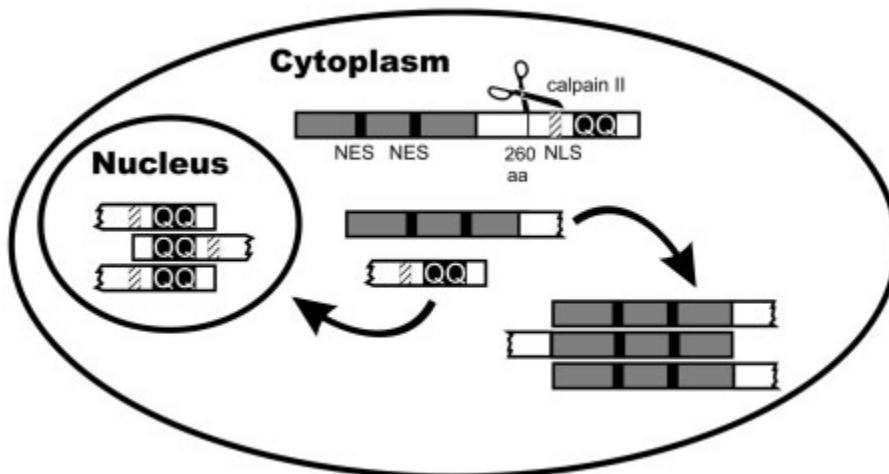
**Abbildung 1.1:** Schematische Darstellung des Ataxin-3 Proteins

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung des Ataxin-3 Proteins. In der N-terminalen Josephin-Domäne liegen zwei Kern-Export-Signale (NES). Nahe dem PolyQ-Bereich ist ein Kern-Lokalisations-Signal zu finden. Zusätzlich befinden sich je nach Isoform zwei bis drei Ubiquitin-Interaktions-Motive (UIM) im Protein.

Der Aufbau des Proteins spielt bei der sogenannten „*Toxic fragment hypothesis*“ eine wichtige Rolle. Ataxin-3 kann beispielweise durch Caspasen und Calpaine proteolytisch gespalten werden (Haacke et al., 2007, Wellington et al., 1998). Während sich die dabei entstehenden N-terminalen Fragmente aufgrund der darin liegenden nukleären Exportsignale (NES) vorwiegend im Zytoplasma



befinden, gelangen die C-terminalen Fragmente aufgrund des Kernlokalisierungssignals (NLS) in den Zellkern. Das C-terminale Fragment des expandierten Ataxin-3 Proteins kann dabei toxischere Auswirkungen haben, als das des nicht-expandierten Proteins und somit eine Rolle in der Pathogenese der SCA3 spielen (Abb. 1.2) (Hubener et al., 2011).



**Abbildung 1.2:** Modell der Proteinspaltung durch Calpain II

Die Abbildung zeigt ein theoretisches Modell der Proteinspaltung durch Calpain II. Die C-terminalen Fragmente mit dem PolyQ-Bereich gelangen in den Zellkern, die N-terminalen Fragmente verbleiben im Zytoplasma (Hubener et al., 2011).

Neben dieser Hypothese ist ein Hauptmerkmal der Pathogenese der SCA3 und auch anderer PolyQ-Erkrankungen bereits bekannt. Durch das PolyQ-expandierte Protein kommt es zur Bildung von fehlgebildeten und falsch gefalteten Proteinen, deren Funktion und Interaktion dadurch gestört wird. Diese Proteine können nicht lösliche Aggregate bilden, die wiederum zu intranukleären und zytoplasmatischen Einschlüssen führen (Zoghbi and Orr, 2000). Wie genau diese Aggregate und Einschlüsse an der Entstehung der Erkrankung beteiligt sind, ist jedoch noch unklar. Die alleinige Ursache für die Erkrankung können sie nicht sein. Der Protein-Kontext, also die Funktion, die das Protein in verschiedenen Stoffwechselwegen des Körpers einnimmt, spielt ebenfalls eine wichtige Rolle. Interaktionspartner des Ataxin-3 Proteins in den einzelnen Stoffwechselwegen liegen je nach Individuum in unterschiedlichen Isoformen vor. Bei einer Interaktion mit nicht-expandiertem Ataxin-3 spielen die

unterschiedlichen Isoformen jedoch zunächst keine Rolle. Bei einer Interaktion mit expandiertem Ataxin-3 kann es hingegen zu einer Veränderung des jeweiligen Stoffwechselweges kommen. Dies kann Auswirkungen auf den Organismus des jeweiligen Individuums haben und somit erklären, weshalb SCA3-Patienten mit der gleichen Anzahl an CAG-Wiederholungen unterschiedlich stark ausgeprägte Krankheitsverläufe vorweisen (Paulson, 2007).

Das Ataxin-3 Protein hat im Körper unterschiedliche Funktionen, die noch nicht vollständig erforscht sind. Eine bereits bekannte und wichtige Funktion hat Ataxin-3 im Ubiquitin-Proteasom-System (UPS). Im UPS fungiert Ataxin-3 als deubiquitinierendes Enzym (DUB) und erfüllt dabei zwei verschiedene Funktionen. Zum einen übernimmt Ataxin-3 mit der Josephin-Domäne eine wichtige Rolle beim Proteinabbau durch Cystein-Proteasen (Nicastro et al., 2005, Scheel et al., 2003). Zum anderen binden die UIMs des Ataxin-3 Proteins an Ubiquitin-Konjugaten und ubiquitinierten Proteinen (Burnett et al., 2003, Donaldson et al., 2003) und bringen diese so in nächste Nähe zueinander, damit die ubiquitinierten Proteine durch die Konjugate geschnitten oder modifiziert werden können (Burnett and Pittman, 2005, Scaglione et al., 2011, Winborn et al., 2008). Eine der Ubiquitin-Konjugate, mit der Ataxin-3 auf diese Weise interagiert, ist die E3-Ubiquitin-Protein-Ligase CHIP (Scaglione et al., 2011).

Ein weiterer, wichtiger Interaktionspartner ist das Parkin Protein. Das Parkin Protein ist eine E3-Ubiquitin-Protein-Ligase und wird durch das *PARK2*-Gen auf Chromosom 6q26 gebildet und besteht aus 465 Aminosäuren, wobei 6 Isoformen bekannt sind. Es wird ubiquitär exprimiert und befindet sich vorrangig im Zytosol. Grundsätzlich besteht das Protein aus einer *Ubiquitin-like-domain* (UBL) am N-terminalen Ende und drei Ring-Domänen, die sich eher zum C-terminalen Ende hin orientieren (Abb. 1.3).



**Abbildung 1.3:** Schematische Darstellung des Parkin Proteins

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung des Parkin Proteins. Am N-terminalen Ende befindet sich eine *Ubiquitin-like-domain* (UBL). Das Protein beinhaltet drei Ring-Domänen (RING), die eher am C-terminalen Ende zu finden sind.

Das Protein Parkin ist an der Entstehung der Parkinson-Erkrankung beteiligt. Verschiedene Mutationen im *PARK2*-Gen sind mit den unterschiedlichen Formen der Erkrankung assoziiert. Beispielsweise ist für das Juvenile rezessiv-vererbte Parkinson-Syndrom eine *loss-of-function*-Mutation im *PARK2*-Gen verantwortlich (Kitada et al., 1998). Die genaue Rolle des Proteins ist aber nicht bei jeder Form bekannt. Neben dem *PARK2*-Gen haben zum Beispiel auch Mutationen in anderen Genen wie dem *PINK1*- oder dem *DJ-1*-Gen einen Einfluss auf die Pathogenese der Parkinson Erkrankung.

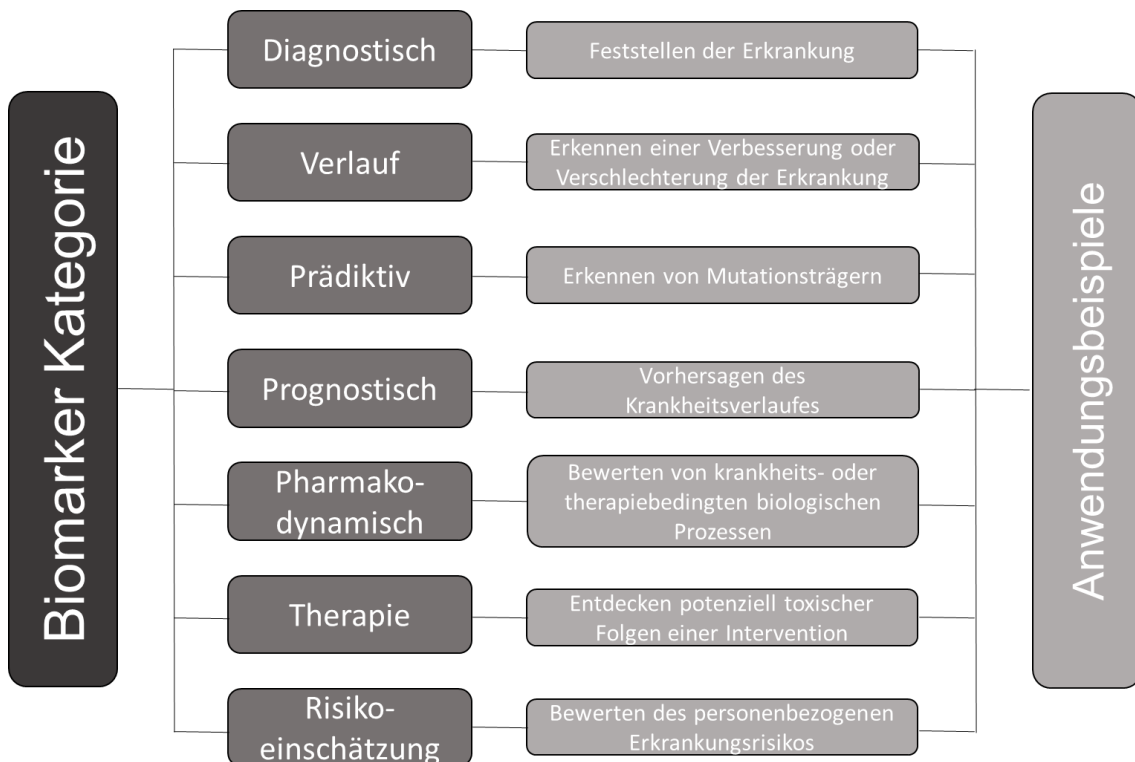
Parkin hat eine vielfältige, regulierende Funktion in neuronalen und nicht-neuronalen Zellen. Es katalysiert den Ubiquitin-Transfer von Enzymen auf verschiedene Protein-Substrate und reguliert damit dessen Ablauf (Cookson, 2003, Houlden and Singleton, 2012, Zhang et al., 2015). Als Teil eines Multiprotein-Ubiquitin-Ligase-Komplexes schützt es postmitotische Neuronen vor der Apoptose durch Excitotoxizität (Staropoli et al., 2003). Parkin kann aber auch von defekten Mitochondrien rekrutiert werden, um deren Abbau in die Wege zu leiten (Narendra et al., 2008).

Die beiden Proteine Ataxin-3 und Parkin interagieren in direkter Weise miteinander, in dem eins der UIMs am C-terminalen Ende des Ataxin-3 Proteins an die UBL im N-terminalen Ende des Parkins bindet (Bai et al., 2013). Dabei kann Ataxin-3 Parkin deubiquitiniere und dadurch den Abbau von Parkin beeinflussen. Durch expandiertes Ataxin-3 kann es zu einem vermehrten Abbau von Parkin kommen (Durcan and Fon, 2011). Diese Erkenntnis könnte eine Erklärung für den bei einigen SCA3-Patienten auftretenden Parkinsonismus sein (Durcan and Fon, 2013).

Ataxin-3 als Erkrankungsprotein und Parkin als direkter Interaktionspartner sind für die weitere Erforschung von großem Interesse. In dieser Arbeit sollen beide Proteine als potenzielle Biomarker analysiert werden.

### 1.3 Biomarker und klinische Tests

Als Biomarker werden objektiv erhobene Parameter bezeichnet, die der Beurteilung eines physiologischen oder pathologischen Prozesses dienen oder dessen Verlauf evaluieren. Biomarker sind in der Beurteilung einer Krankheit, deren Diagnostik und zur Beurteilung einer Therapie unabdingbar. Dabei unterscheidet man verschiedene Arten von Biomarkern (Abb. 1.4).



**Abbildung 1.4:** Darstellung unterschiedlicher Biomarker Kategorien mit Anwendungsbeispielen

Die Darstellung zeigt eine Übersicht unterschiedlicher Biomarker Kategorien. Dabei ist jeder Kategorie ein Anwendungsbeispiel zugeordnet. Abbildung modifiziert nach <https://www.fda.gov/drugs/biomarker-qualification-program/context-use>

Der diagnostische Biomarker der SCA3 ist die Anzahl der CAG-Wiederholungen im expandierten *ATXN3*-Gen. Dieser Biomarker kann zwar sicher bestimmen, ob jemand die Mutation trägt, jedoch lässt sich keine genaue Aussage darüber treffen, ab wann und in welcher Ausprägung diese Person an der SCA3 erkranken wird. Auch wenn im Durchschnitt festzustellen ist, dass mit steigender CAG-Anzahl im expandierten *ATXN3*-Gen das AAO sinkt, lässt sich lediglich 50-70% des Erkrankungsbeginns bei SCA3-Patienten darüber erklären (Bettencourt

and Lima, 2011). Dadurch wird deutlich, dass zur bestmöglichen Beurteilung einer Erkrankung und deren Behandlung mehrere valide Biomarker nötig sind. Biomarker unterscheiden sich nicht nur in ihrem jeweiligen Anwendungsgebiet, sondern auch in der Art und Weise, wie sie gemessen werden. Bei manchen Biomarkern reicht ein einmaliges Feststellen ihrer An- bzw. Abwesenheit. So konnten bereits einige das AAO bzw. das Ausmaß der Erkrankung modulierende Faktoren identifiziert werden. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit eines Polymorphismus im *APOE*-Gen das AAO von SCA3-Patienten senkt (Bettencourt et al., 2011). Bei anderen Biomarkern ist es nötig, sie bei einer Person mehrfach (longitudinal im Krankheitsverlauf) zu messen und die einzelnen Werte, aber auch deren Verlauf in Kontext zu anderen erkrankten Personen und gesunden Kontrollprobanden zu setzen. Faktoren wie beispielsweise die Neurofilament Leichtkette (NfL) gemessen im Blutserum beeinflussen ebenfalls das AAO, aber auch die Progression der SCA3-Erkrankung. Die NfL-Konzentration im Blutserum ist bei SCA3-Patienten im Vergleich zu gesunden, gleichaltrigen Kontrollprobanden erhöht und korreliert dabei auch mit der Schwere der Erkrankung (Wilke et al., 2018, Li et al., 2019). In neusten Studien wurde gezeigt, dass die NfL-Konzentration im Blutserum von SCA3-Patienten bereits 7,5 Jahre vor dem Erkrankungsbeginn signifikant ansteigt (Wilke et al., 2020).

Die weitere Erforschung von die SCA3 modulierenden Faktoren ist jedoch dringend erforderlich, um einerseits die Möglichkeiten zur genaueren Vorhersage des Erkrankungsbeginns und -verlaufs zu verbessern und andererseits die Aussagekraft klinischer Studien zu erhöhen, indem Teilnehmer besser *matched* in Gruppen eingeteilt und Therapieerfolge besser validiert werden können. Die in dieser Arbeit untersuchten Proteine Ataxin-3 und Parkin könnten als prognostischer oder Verlaufsbiomarker aber vor allem auch als pharmakodynamischer bzw. Therapiebiomarker eine wichtige Rolle spielen. Wie bereits in Abschnitt 1.1 erläutert, ist das „*Disease protein lowering*“, also das Verringern der Ataxin-3 Konzentration, ein wichtiger Angriffspunkt einer kausalen Therapie. Eine solche Therapie wäre durch die valide Quantifizierung des Ataxin-3 Proteins in verschiedenen Biomaterialien wie beispielsweise CSF oder

peripherem Blut und seinen Bestandteilen deutlich besser und vor allem objektiver zu beurteilen. Eine valide Messung von Parkin wiederum könnte wichtige Informationen liefern, welche Auswirkung das mutierte Ataxin-3 auf seine direkten Interaktionspartner hat. Somit könnte Parkin ein wichtiger pharmakodynamischer Biomarker bei der Erforschung der SCA3 sein, nicht zuletzt auch in Bezug auf den Parkinsonismus, der bei einigen SCA3-Patienten festzustellen ist.

In der Diagnostik und Beurteilung des Krankheitsverlaufs der SCA3 werden nicht nur molekulare Marker, sondern auch einige klinische Scores verwendet. Zwei der dabei gebräuchlichsten Scores sind der *Scale of the Assessment and Rating of Ataxia* (SARA) und der *Inventory of Non-Ataxia Signs* (INAS), die bereits in Abschnitt 1.1 näher beschrieben wurden. Diese beiden Scores sind jedoch immer nur eine Momentaufnahme des Patienten und unter anderem stark von der Tagesform des Patienten und dem erhebenden Arzt abhängig. Daher werden auch kombinierte Scores wie der *Cross-sectional (annual) disease progression* (CSDP), der Quotient aus SARA und Erkrankungsdauer, zu Rate gezogen. Im Zuge dieser Arbeit werden diese Scores (SARA, INAS und CSDP) verwendet, um die Schwere und den Verlauf der Erkrankung jedes individuellen Mutationsträgers zu beurteilen.

In Abschnitt 1.1 wurde ebenfalls erläutert, dass die MRT-Bildgebung bereits wichtige Erkenntnisse über die genauere Lokalisation der Schädigungen durch die SCA3 im Gehirn geliefert hat. Neueste Studien belegen nun auch den Zusammenhang zwischen den Schädigungen im Gehirn und der Progression der Erkrankung. Das Volumen der grauen Substanz in Kleinhirn, Pons und Mittelhirn korreliert umgekehrt proportional zum *International Cooperative Ataxia Rating Scale* (ICARS) und auch zur Anzahl der CAG-Wiederholungen des expandierten *ATXN3*-Gens (Peng et al., 2019). Auch das Volumen von spinalen Bereichen (Segment C2 und C3) und der Medulla oblongata ist bei SCA3-Patienten verringert, wenngleich das Volumen der Pons bei SCA3-Patienten die größte Verminderung aufweist (Faber et al., 2021). Des Weiteren konnten bereits bei präsymptomatischen Mutationsträgern im Vergleich zu Kontrollprobanden

Veränderungen in bestimmten Strukturen des Gehirns und des Rückenmarks identifiziert werden (Wu et al., 2017, Faber et al., 2021). Neuere MRT gestützte Techniken wie *morphometric MRI*, *diffusion tensor imaging* (DTI), *functional magnetic resonance imaging* (fMRI) und *magnetic resonance spectroscopy* (MRS) können ebenfalls zur Identifizierung von präataktischen Mutationsträgern und zur Beurteilung des Krankheitsverlaufes bzw. eines Therapieerfolges herangezogen werden. Darüber hinaus wurden durch diese Techniken die pathophysiologischen Mechanismen der Entstehung und des Verlaufes der Erkrankung besser veranschaulicht und somit verstanden (Wan et al., 2020).

Auch wenn zweifelsohne festzustellen ist, dass die klinischen Scores gut durchdacht und so objektiv wie möglich gestaltet sind, muss festgehalten werden, dass die Erhebung dieser Scores einer gewissen Subjektivität und der Erfahrung des klinischen Personals unterliegen. Wie bereits erwähnt ist die Erhebung dieser Scores zumeist nur eine Momentaufnahme eines Patienten, worauf die Tagesform des Patienten, aber auch mögliche Lerneffekte bei wiederholter Ausführung der Tests einen Einfluss haben können. Somit ist es schwer, minimale Veränderungen über einen kurzen Zeitraum zu erkennen. Ähnliches gilt auch für bildgebende Verfahren. Diese sind zwar sehr objektiv, jedoch ist es auch dabei schwierig minimale Veränderungen über einen kurzen Zeitraum zu detektieren. Dadurch wird deutlich, wie wichtig die Erforschung von anderen objektiv messbaren, schnell und einfach verfügbaren Biomarkern zur Diagnostik und Beurteilung von Therapieerfolgen ist.

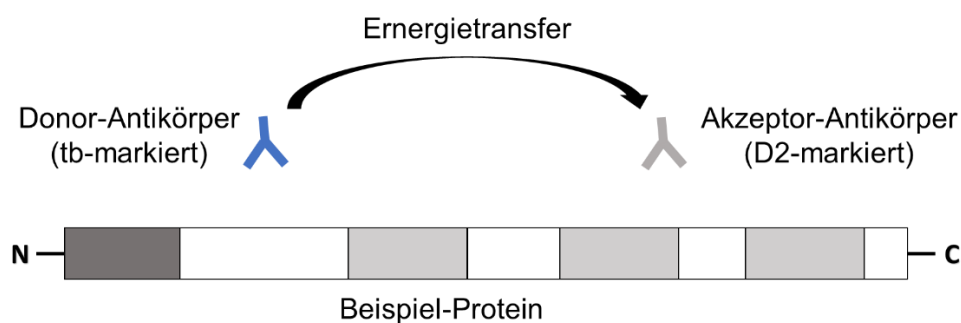
#### **1.4 Hochsensitive Messverfahren zur Proteinbestimmung in humanen Biomaterialien**

Proteine können nur dann als Biomarker von Bedeutung bei der Beurteilung von Erkrankungen sein, wenn es valide Verfahren gibt, um sie zu messen. Für solche Messverfahren sind vor allem zwei Punkte wichtig. Zum einen sollte nur das zu messende Protein detektiert und quantifiziert werden. Zum anderen sollte jedes einzelne Protein-Molekül, das sich in einer Probe befindet, erfasst werden. In den letzten Jahren wurden hierzu verschiedene Messverfahren entwickelt und auch

schon erfolgreich in der Bestimmung verschiedener Biomarker etabliert. Vor allem im onkologischen Bereich finden hochsensitive Messverfahren schon in großer Breite ihre Anwendung. Aber auch im Bereich der neurodegenerativen Erkrankungen wurden ähnliche Verfahren erfolgreich eingesetzt. Ein *meso scale discovery* (MSD) Assay wurde beispielsweise zur Quantifizierung von aggregiertem Huntingtin verwendet (Reindl et al., 2019). Auch expandiertes Ataxin-3 wurde mittels eines MSD-Assays bereits in Blutplasma und Liquor bestimmt (Prudencio et al., 2020). Ebenfalls im Liquor konnte auch Huntingtin in löslicher Form mithilfe eines *single molecule counting* (SMC) Immunoassays quantifiziert werden (Wild et al., 2015). Mit einem SMC Immunoassay wurde auch Ataxin-3 in Liquor und Blutplasma quantifiziert (Hubener-Schmid et al., 2021). Ein weiteres hochsensitives Messverfahren ist die *single molecule array* (Simoa) Methode. Diese wurde bereits verwendet um beispielsweise Neurofilamente (NFL) in der Erforschung der Parkinson-Erkrankung, aber auch der SCA3, zu quantifizieren (Hansson et al., 2017, Wilke et al., 2020). Diese Messverfahren basieren alle auf einem ähnlichen Prinzip, bei dem zunächst die zu quantifizierenden Proteine oder generell Moleküle von Antikörpern spezifisch erkannt und anschließend auf unterschiedliche Art und Weisen erfasst und gezählt werden. Das in dieser Arbeit verwendete *Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer* (TR-FRET) Verfahren zur Messung der Proteine Ataxin-3 und Parkin basiert ebenfalls auf diesem Prinzip. Das Verfahren wurde bereits genutzt, um in der Erforschung der Huntington- und der Parkinson-Erkrankung verschiedene Proteine zu quantifizieren. So konnten unter anderem bereits Huntingtin (Cui et al., 2014, Liang et al., 2014) und  $\alpha$ -Synuclein (Bidinosti et al., 2012) mittels eines TR-FRET basierten Messverfahren nachgewiesen werden. Bei der Erforschung der SCA3 wurde auch Ataxin-3 bereits mittels einer solchen Methode quantifiziert (Martier et al., 2019, Gonsior et al., 2021, Nguyen et al., 2013). Erste Versuche Parkin mittels einer TR-FRET basierten Messmethode zu bestimmen, wurden bereits von Frau Dr. med. Kathrin Gonsior im Rahmen ihrer Dissertation mit einem vielversprechenden Ergebnis durchgeführt. Die Etablierung und Validierung dieses Assays wurde in dieser Arbeit weitergeführt.



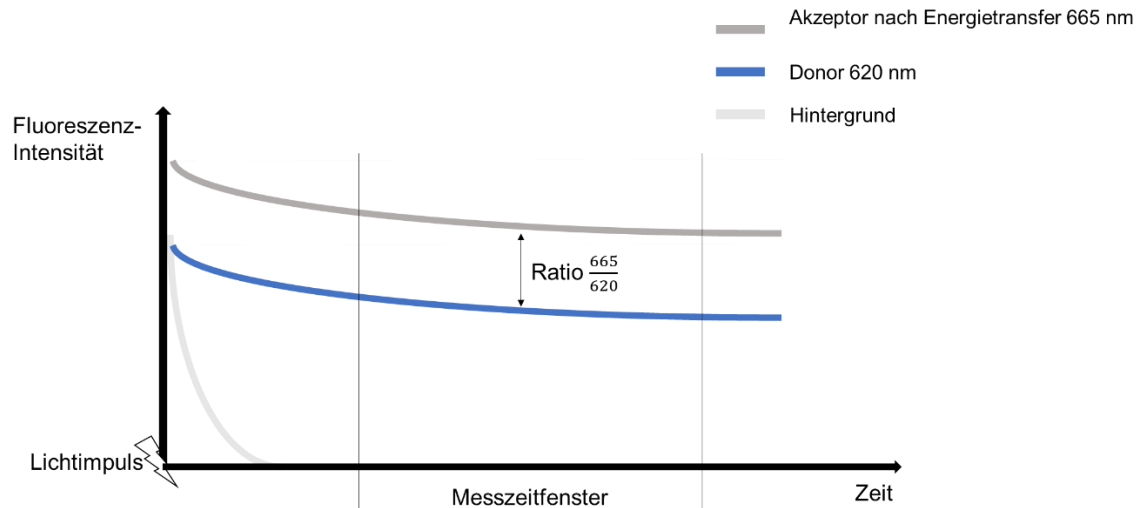
Bei der Proteinbestimmung mittels TR-FRET werden zwei Antikörper verwendet, die spezifisch an bestimmte Proteine binden. Diese Antikörper sind jeweils mit den Luminophoren Terbiumkryptat (tb) oder der D2-Linie von Cäsium (D2) (<https://www.cisbio.com/drug-discovery/tr-fret-basics>) Fluoreszenz-markiert. Binden diese beiden Antikörper nun am gleichen Protein und somit in nächster Nähe zueinander, kommt es zu einem Energietransfer zwischen dem sogenannten Donor (tb-markierter Antikörper) und dem Akzeptor (D2-markierter Antikörper) (Cui et al., 2014) (Abb. 1.5).



**Abbildung 1.5:** Schematische Darstellung der Antikörperinteraktion bei der Proteinbestimmung mittels TR-FRET

Die Donor- (blau) und Akzeptor-Antikörper (grau) binden in nächster Nähe zueinander am selben Protein. Nach Anregung des Donor-Antikörpers durch einen Lichtimpuls kommt es zum Energietransfer von Donor- auf Akzeptor-Antikörper.

Dieser Energietransfer ist messbar, indem man zunächst den Donor mit einem Lichtimpuls anregt. Dadurch entsteht ein Signal mit Höhepunkt bei 620 nm und einer Dauer von mehreren 100  $\mu$ s. Das Signal des Akzeptors wird nur dann messbar, wenn es zum Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer kommt, und besteht dann mit einem Maximum von 665 nm ebenfalls über mehrere 100  $\mu$ s. Gemessen wird die Fluoreszenz-Intensität bei den jeweiligen Wellenlängen (620 und 665 nm). Die Messung beginnt dabei um 100  $\mu$ s zeitverzögert, um die Hintergrund-Fluoreszenz, die lediglich bis 50  $\mu$ s nach Lichtimpuls besteht, zu eliminieren (Abb. 1.6).



**Abbildung 1.6:** Schematische Darstellung des Energietransfers von Donor auf Akzeptor, modifiziert nach Cui et al., 2014

Die Messung erfolgt zeitverzögert, wodurch nur die Signale des Donors (blau) und des Akzeptors nach dem Energietransfer (dunkelgrau) gemessen werden. Das Signal des Hintergrunds (hellgrau) wird dadurch eliminiert und geht nicht in die weiteren Berechnungen ein. Das Verhältnis Ratio 665/620 wird für die weiteren Berechnungen verwendet.

Das Verhältnis der resultierenden Werte wird bestimmt und anschließend durch nachfolgende Rechnung bereinigt (vgl. Abb. 1.7). Der dadurch berechnete Wert der Signalstärke  $\Delta F$  gibt die Proteinmenge in einer Probe an. Da in einer Probe in der Regel nicht nur das zu messende Protein vorliegt, kann die Signalstärke zusätzlich ins Verhältnis zur Gesamtproteinmenge gesetzt werden. Daraus resultiert der Wert  $\Delta F_c$  (vgl. Abb. 1.7).

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

$$\Delta F_c = \frac{\Delta F}{\text{Gesamtproteinmenge}}$$

**Abbildung 1.7:** Formeln zur Berechnung von  $\Delta F$  und  $\Delta F_c$

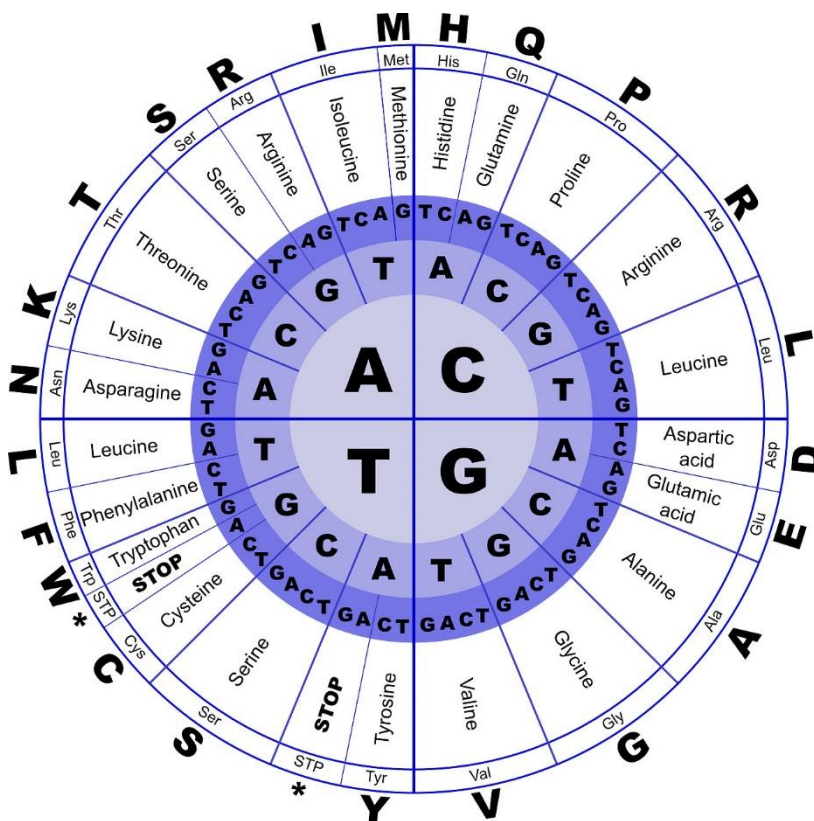
In dieser Arbeit wurden zur Bestimmung des *full-length* Ataxin-3 Proteins die Antikörper N-term und 1H9 (vgl. Abschnitt 2.2.5) verwendet. Dabei wird der polyklonale N-term Antikörper tb-markiert und fungiert folglich als Donor, während der monoklonale 1H9 Antikörper D2-markiert ist und dementsprechend

als Akzeptor dient. Beide Antikörper wurden bereits häufig vor allem in Western Blot-Analysen oder ELISA-Messverfahren verwendet und sind dementsprechend jeweils als einzelner Antikörper gut etabliert. Die Kombination aus beiden Antikörpern in einer TR-FRET basierten Proteinbestimmung in lysierten PBMCs wurde erstmals von Frau Dr. med. Kathrin Gonsior in ihrer Dissertation angewandt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieses Verfahren weiter validiert und etabliert und von unserem Arbeitskreis im Oktober 2020 erfolgreich publiziert (Gonsior et al., 2021). Frau Dr. med. Kathrin Gonsior hat in ihrer Dissertation ebenfalls erstmalig gezeigt, dass auch Parkin in lysierten PBMCs mittels einem TR-FRET basierten Verfahren gemessen werden kann. Dabei wurden die Antikörper Prk8 und Parkin2 (vgl. Abschnitt 2.2.5) verwendet. Der monoklonale Antikörper Prk8 wurde tb-markiert und als Donor verwendet, der polyklonale Antikörper Parkin2 wurde D2-markiert und diente als Akzeptor. In dieser Arbeit wurde diese Messmethode weiter validiert und verbessert.

### **1.5 Genetische Variationen in den zu untersuchenden Genen *ATXN3* und *PARK2***

Die genetische Variation zwischen menschlichen Individuen ist enorm vielfältig. Sie hat nicht nur augenscheinliche Auswirkung auf das äußere Erscheinungsbild wie beispielweise Größe, Hautfarbe, Haarfarbe oder Augenfarbe, sondern auch auf Körperfunktionen oder Verhaltensweisen. Darauf hat die zufällige Weitergabe von Erbinformation durch Vater und Mutter an ihre Kinder einen großen Einfluss. Hinzukommen aber auch unwillkürliche Veränderungen der Gene, die durch Fehler bei deren Reproduktion entstehen. Dabei gibt es massive Fehler, die zum Beispiel zu Trisomien führen, aber auch kleinere Fehler, die massive Folgen haben können. Die wohl kleinsten Fehler bei der Reproduktion sind sogenannte Punktmutationen. Punktmutationen können in zwei Formen auftreten: Zugewinn bzw. Verlust einzelner Basen im DNA-Strang oder Austausch einzelner Basen im DNA-Strang. Sofern der Austausch einzelner Basen im DNA-Strang keine pathologischen Folgen hat, wird er auch als *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) bezeichnet.

SNPs sind einzelne Abweichungen in einer Gensequenz zwischen verschiedenen Individuen. Diese Abweichungen können folgenlos bleiben, aber auch zu Veränderungen bei dem Protein führen, für welches die jeweilige Gensequenz kodiert. Die Basenabfolge einer Gensequenz bestimmt die Reihenfolge der Aminosäuren eines Proteins und somit auch die Funktion des Proteins. Zum Beispiel kodieren die Basentriplets CAG und CAA beide für die Aminosäure Glutamin, wodurch ein SNP an dieser Position ein identisches Protein zur Folge hätte. Würde es durch einen SNP jedoch zu einem der Basentriplets CAT oder CAC kommen, wäre ein Austausch der Aminosäure von Glutamin zu Histidin im fertigen Protein das Resultat (Abb. 1.8). Dadurch könnte die Funktion des Proteins verändert werden. Im schlimmsten Fall kann eine Punktmutation sogar zu einem sogenannten Stopp-Codon führen, was den Abbruch der Transkription induziert, wodurch ein verkürztes und damit oft fehlerhaftes Protein entstehen würde.



**Abbildung 1.8:** Der genetische Code

Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung des genetischen Codes. Anhand dieser Darstellung kann abgelesen werden, welche Basentriplets für welche Aminosäure kodieren. Bildquelle: [https://images.openscience-files.or.at/\\_fa/dd/fadde4ab.jpg](https://images.openscience-files.or.at/_fa/dd/fadde4ab.jpg)

Im *ATXN3*-Gen wurden bisher viele Polymorphismen untersucht. Dabei wurden bereits früh die drei Polymorphismen G<sup>669</sup>TG/A<sup>669</sup>TG (AS 212), C<sup>987</sup>GG/G<sup>987</sup>GG (AS 318) und TAC<sup>1118</sup>/TAA<sup>1118</sup> (AS 361) (vgl. Tabelle 1.2) identifiziert und festgestellt, dass diese bei SCA3-Patienten und Kontrollprobanden unterschiedlich häufig vorkommen (Goto et al., 1997). Die Polymorphismen an Basen-Position 669 und 987 führen letztlich zu einem Aminosäuren-Austausch. Die 212. Aminosäure des Ataxin-3 Proteins wird von Valin zu Methionin, die 318. Aminosäure von Glycin zu Arginin. Methionin ist im Gegensatz zu Valin schwefelhaltig und Arginin ist deutlich länger als Glycin. Beim Polymorphismus an Basen-Position 1118 entsteht das Basentriplet TAA, das für ein STOP-Codon kodiert (Abb. 1.8). Anstatt des Einbaus von Tyrosin als 361. Aminosäure kommt es dadurch sogar zum Abbruch des Proteins nach der 360. Aminosäure und einem dementsprechend kürzeren Ataxin-3 Protein. Dass solche Veränderungen oder sogar Kürzungen des Ataxin-3 Proteins eine Auswirkung auf die Interaktionsfähigkeit des Proteins hat ist durchaus denkbar. Zusätzlich hat eine Analyse mit Beteiligung von 16 Nationen gezeigt, dass bei SCA3-Patienten zu 72 % die Kombination aller drei Polymorphismen zusammen vorliegen, wohingegen diese Varianten bei gesunden Kontrollprobanden kaum vorliegen (Gaspar et al., 2001). Somit ist es naheliegend, dass Polymorphismen Auswirkungen auf den Verlauf bzw. sogar die Entstehung der SCA3 haben.

**Tabelle 1.2:** Übersicht der analysierten SNPs

Gen	Basenveränderung	AS-Veränderung
<i>ATXN3</i>	Position 669: A/G <b>GTG</b> → <b>ATG</b>	AS 212: Valin → Methionin
	Position 987*: G/C <b>CGG</b> → <b>GGG</b>	AS 318*: Glycin → Arginin
	Position 1118*: A/C <b>TAC</b> → <b>TAA</b>	AS 361*: Tyrosin → Stopp
<i>PARK2</i>	Position 601: A/G <b>AGC</b> → <b>AAC</b>	AS 167: Serin → Asparagin
	Position 1239: C/G <b>GTA</b> → <b>CTA</b>	AS 380: Valin → Leucin
	Position 1281: A/G <b>GAT</b> → <b>AAT</b>	AS 394: Asparaginsäure → Asparagin

\* Position abhängig von der Anzahl der CAG-Wiederholungen, hier 13 angenommen

Im *PARK2*-Gen sind ebenfalls Polymorphismen bekannt. Die Polymorphismen AG<sup>601</sup>C/AA<sup>601</sup>C (AS 167), G<sup>1239</sup>TA/C<sup>1239</sup>TA (AS 380) und G<sup>1281</sup>AT/A<sup>1281</sup>AT (AS 394) führen dabei jeweils zu einem Aminosäure-Austausch (vgl. Tab. 1.2). Die dadurch veränderte Proteinstruktur des Parkins kann auch hier Auswirkungen auf die Interaktionsfähigkeit des Proteins haben. Da hiervon auch die Interaktion der beiden direkten Interaktionspartner Parkin und Ataxin-3 betroffen sein kann, ist dies ein möglicher Ansatz, den Parkinsonismus, der bei einigen SCA3-Patienten beobachtet wird, zu erklären.

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

Alle in dieser Arbeit untersuchten Proben stammen aus dem ESMI-Projekt. Gefördert wurde das ESMI-Projekt international durch das *EU Joint Programme – Neurodegenerative Disease Research (JPND)* zusammen mit der Europäischen Kommission (Jpco-fuND) und auf nationaler Ebene durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung.

Das ESMI-Projekt erstreckt sich über mehrere europäischen Länder. Deutschland ist dabei mit Standorten in Bonn, Tübingen, Aachen, Essen, Heidelberg und Frankfurt vertreten. Innerhalb Europas kommen Standorte in Portugal, Großbritannien und den Niederlanden hinzu. Darüber hinaus bestehen Kooperationen mit Frankreich, der USA und Brasilien. Das Projekt wird von Prof. Thomas Klockgether, dem Direktor der Klinik und Poliklinik für Neurologie des Universitätsklinikums Bonn und der Klinischen Forschung des Deutschen Zentrums für neurodegenerative Erkrankungen (DZNE), koordiniert.

Das Projekt hat zum Ziel, eine möglichst große Kohorte aus SCA3-Patienten zu bilden. Dabei sollen auch Verwandte ersten Grades mit einbezogen werden, da diese ein 50%iges Risiko haben, ebenfalls Träger der Mutation zu sein. Sie könnten daher als präataktische Mutationsträger weitere wichtige Erkenntnisse liefern. Alle Daten sollen nach standardisierten Protokollen erhoben und in gemeinsamen Datenbanken zusammengeführt werden. Die Standardisierung umfasst sowohl die Blutentnahme in klar vorgegebene Röhrchen und ggf. eine Liquor-Entnahme als auch die Befunderhebung mit Ganganalysen, MRT-

Bildgebung und Erfassung von Bewegungsaktivitäten und der allgemeinen Gewohnheiten nach hochstandardisierten Vorgaben.

Nicht zuletzt bietet das Projekt auch ein optimales Forum zum Austausch von Wissenschaftlern, Ärzten und Patientenorganisationen über die SCA3-Erkrankung. Relevante Informationen sind auf der Internetseite [www.dzne.de/forschung/studien/klinische-studien/esmi/](http://www.dzne.de/forschung/studien/klinische-studien/esmi/) (Stand 03.02.2021 12:50) zu finden.

### **1.7 Ziel der Arbeit**

Zuverlässige Biomarker gewinnen in der heutigen Medizin mehr und mehr an Bedeutung. Durch sie ist es mittlerweile möglich, nicht nur eine bereits aufgetretene Erkrankung gezielt zu behandeln und diese Behandlung auch beurteilen zu können, sondern auch Erkrankungen bei Patienten zu erkennen, bevor sie irreversiblen Schaden angerichtet haben und deren Progression zu verlangsamen oder gar ihre Entstehung zu verhindern.

Auch für die Diagnostik, Prognose und Therapie bei der SCA3 sind zuverlässige Biomarker von großer Bedeutung. Mit ihrer Hilfe können Krankheitsverläufe besser vorausgesagt und Therapieerfolge beurteilt werden. Dabei ist neben ihrer Zuverlässigkeit auch die Verfügbarkeit sehr wichtig. Ein Biomarker sollte ohne große Belastung für den Patienten erhebbar sein. Daher spielen Marker, die durch eine einfache venöse Blutentnahme gewonnen werden können, eine große Rolle. Aufgrund dessen ist einer der Hauptpunkte dieser Arbeit die Etablierung von Protein-Messungen mittels TR-FRET in *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMC). Dabei werden die Proteine *full-length* Ataxin-3 und Parkin quantifiziert. In früheren Versuchen haben Frau Dr. rer. nat. Jeannette Hübener-Schmid und Frau Dr. med. Kathrin Gonsior bereits einen TR-FRET-Assay zur Quantifizierung von *full-length* und expandiertem Ataxin-3 und Parkin verwendet. Für die Messung von *full-length* Ataxin-3 wurde dabei eine Antikörperkombination aus 1H9-D2 und N-term-Tb etabliert, welche in dieser Arbeit modifiziert und validiert wurde. Zur Messung von Parkin wurde in früheren Versuchen von Frau Dr. med. Kathrin Gonsior eine Antikörperkombination aus Parkin2-D2 und Prk8-Tb in verschiedenen Biomaterialien getestet. Diese Antikörperkombination wurde in

dieser Arbeit aufgegriffen und für die Quantifizierung von Parkin mittels TR-FRET-Assay in PBMCs etabliert.

Die Eignung von *full-length* Ataxin-3 und Parkin als potenzielle Biomarker soll überprüft werden. Hierzu werden Korrelationen zwischen den Proteinen und klinischen Parametern, wie Erkrankungsbeginn oder bekannten, klinischen Scores (SARA, INAS und CSDP), erstellt und evaluiert.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit evaluiert, ob der TR-FRET-Assay zur Quantifizierung von *full-length* Ataxin-3 und Parkin auch in anderen Biomaterialien wie Blutplasma, Liquor, Fibroblasten, *induced pluripotent stem cells* (iPSCs) oder Gehirngewebe genutzt werden kann. Dabei sollte nicht nur die Durchführbarkeit überprüft werden, sondern auch zeitgleich die Konzentration der Proteine in den anderen Biomaterialien mit der Konzentration der Proteine in den PBMCs verglichen werden.

Darüber hinaus stellte sich weiterhin die Frage, welche Faktoren die Entstehung, den Erkrankungsbeginn, die Schwere und die Progression der SCA3-Erkrankung modulieren. In dieser Arbeit wurde der Einfluss einzelner bekannter SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) auf die Erkrankung untersucht. Die dafür notwendigen Versuche wurden größtenteils durch die Studentin Frau Annika Lambert im Rahmen eines 6-wöchigen Laborpraktikums unterstützt.

Zur besseren Vergleichbarkeit und zum Ausschluss möglicher Unterschiede bei der Bestimmung der CAG-Wiederholungen des expandierten Ataxin-3 durch unsere europäischen Partner wurden diese für sämtliche ESMI-Probanden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. med. dent. Anna Kaucher erneut bestimmt.

Zum Schluss wurde die Eignung von *full-length* Ataxin-3 und Parkin als Biomarker für die Diagnostik, den Verlauf und die Therapiebeurteilung der SCA3 bewertet. Dabei wurden der Nutzen und die Grenzen dieser Messmethode analysiert.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Statement zum Ethikvotum

Alle Arbeiten mit humanem Biomaterial wurden durch die Ethikkommission geprüft und unter der Nummer 598/2011BO1 genehmigt. Die Abnahme der Proben bei den europäischen Partnern wurde durch lokale Ethik-Behörden rechtlich geprüft und genehmigt.

### 2.2 Material

#### 2.2.1 Geräte und Softwares

**Tabelle 2.1:** Übersicht der verwendeten Geräte

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
BioPhotometer	Eppendorf Hamburg, Deutschland
Inkubationsschüttler Multitron II	Infors AG Bottmingen-Basel, Schweiz
<i>Microplate Reader Synergy HT</i>	BioTek Instruments Winooski, Vermont, USA
<i>Multimode Plate Reader EnVision 2105 mit TRF Light Unit 337 nm</i>	PerkinElmer Waltham, Massachusetts, USA
Sequencer CEQ 8000	Beckman Coulter Brea, Kalifornien, USA
Sequencer CEQ 8800	Beckman Coulter Brea, Kalifornien, USA
Sicherheitswerkbank HERA safe	Heraeus Hanau, Deutschland
SpeedVac Vakuum Trockner Typ 1008	GFL Gesellschaft für Labortechnik Burgwedel, Deutschland
Thermocycler G-Storm GS1	Alpha Metrix Biotech Rödermark, Deutschland
Thermomixer <i>compact</i>	Eppendorf Hamburg, Deutschland
Ultraschallhomogenisator Sonoplus GM 2200	Bandelin Berlin, Deutschland
Vortex Schüttler VF2	Janke & Kunkel, IKA Werke Staufen im Breisgau, Deutschland
Wasserbad 1083	GFL Gesellschaft für Labortechnik Burgwedel, Deutschland
Wasserbad Typ WB 7	Memmert Schwabach, Deutschland
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf

	Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf Hamburg, Deutschland
Zentrifuge Avanti J-30I	Beckman Coulter Brea, Kalifornien, USA

**Tabelle 2.2:** Übersicht der verwendeten Softwares

Gerät/ genutzt für	Name	Hersteller
Abbildungen	GraphPad 7	PRISM San Diego, Kalifornien, USA
Berechnungen und Abbildungen	Excel, Power Point	Microsoft Redmond, Washington, USA
<i>Microplate Reader Synergy HAT (Bradford)</i>	KC4 v3.4	BioTek Instruments Winooski, Vermont, USA
<i>Multimode Plate Reader EnVision 2105 (TR-FRET)</i>	EnVision Manager	PerkinElmer Waltham, Massachusetts, USA
Sequencer CEQ 8000 und Sequencer CEQ 8800	GenomeLab System	SCIEX Darmstadt, Deutschland
Statistische Auswertung und Abbildungen	SPSS <i>Statistics</i>	IBM Ehningen, Deutschland

## 2.2.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2.3:** Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Originalname	Hersteller
384-Well Platte	<i>CulturPlate-384 F</i>	PerkinElmer Waltham, Massachusetts, USA
6-Well Platte	<i>6-well-plate</i>	Greiner Bio-One Frickenhausen, Deutschland
96-Well Platte	<i>96-well-plate</i>	Greiner Bio-One Frickenhausen, Deutschland
CPT	<i>BD Vacutainer CPT</i>	Becton Dickinson Franklin Lakes, New Jersey, USA
<i>CryoTubes</i>	<i>TPP cryotubes polypropylene 2.0 ml</i>	Merck, Darmstadt, Deutschland
EDTA Röhrchen	<i>S-Monovette 1.8ml K3E</i>	SARSTEDT Nümbrecht, Deutschland
Falcon 15 ml	<i>Cellstar Tube 15 ml</i>	Greiner Bio-One Frickenhausen, Deutschland
Falcon 50 ml	<i>Cellstar Tube 50 ml</i>	Greiner Bio-One

		Frickenhausen, Deutschland
Magnetständer	<i>12-Tube Magnet</i>	Qiagen Hilden, Deutschland
Pipettenspitzen	<i>Pipette tip 1000 µl, Pipette tip 200 µl, Pipette tip 20 µl</i>	SARSTEDT Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß 1,5 ml	<i>Reaction Tube 1,5 ml</i>	Greiner Bio-One Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäß 200 µl	<i>0.2 ml 8-Strip PCR Tube</i>	STARLAB Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäß 2 ml	<i>Reaction Tube 2 ml</i>	Greiner Bio-One Frickenhausen, Deutschland
UV-Licht-stabiles Reaktionsgefäß	<i>Safe-Lock Tubes 1.5ml, amber</i>	Eppendorf Hamburg, Deutschland
Zellgefäß	<i>Cellstar Cell Culture Flasks</i>	Greiner Bio-One Frickenhausen, Deutschland

### 2.2.3 Kits

**Tabelle 2.4:** Übersicht der verwendeten Kits

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
<i>Amicon Ultra 10K centrifugal filter device</i>	Merck Millipore Burlington, Massachusetts, USA
<i>Attractene Transfection Reagent</i>	Qiagen Hilden, Deutschland
<i>Dynabeads Protein G Immunoprecipitation Kit</i>	Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts, USA
<i>FlexiGene DNA-Kit</i>	Qiagen Hilden, Deutschland
<i>GenomeLab DTCS – Quick Start Kit</i>	Beckman Coulter Brea, Kalifornien, USA
<i>QIAprep Spin Miniprep Kit</i>	Qiagen Hilden, Deutschland
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	Qiagen Hilden, Deutschland
<i>Size Standard Kit</i>	DNA Size Standard Kit – 600 Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA

## 2.2.4 Puffer, Lösungen und Chemikalien

**Tabelle 2.5:** Übersicht der verwendeten Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Beschreibung/Inhalt
6x Ladepuffer Orange	0,2% Orange G, 15% Ficoll 400
Detektionspuffer	50mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 400mM NaF, 0,1% BSA, 0,05% Tween-20
Dilution Puffer	50mM Trizma Base (pH 8,0)
Elution Puffer	50mM Trizma Base (pH 8,0), 10mM Glutathion
Lysepuffer	DPBS, 1% Triton X-100, 1x <i>Complete Protease Inhibitor</i>
Puffer A	100mM NaCl, 50mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 10% Glycerol, 1x <i>Complete Protease Inhibitor</i> , 1mM DTT
Puffer B	1M NaCl, 50mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 10% Glycerol, 1mM DTT, 1% Triton X-100, 1x <i>Complete Protease Inhibitor</i>
RIPA Puffer	<i>RIPA Lysis and Extraction Buffer</i> Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Stopp-Mix	7% Glycogen, 425mM Na-Acetat (pH 5,2), 14mM Na-EDTA
TBE-Puffer	45mM Tris-Borat, 1mM EDTA
TE Puffer	50mM Tris (pH 7,5), 2mM EDTA, 100mM NaCl

**Tabelle 2.6:** Übersicht der verwendeten Chemikalien und Biomaterialien

Bezeichnung	Beschreibung/Inhalt
Agarose	
Ampicillin	Ampicillin Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Betain	<i>Betaine</i> Merck, Darmstadt, Deutschland
Bradford-Reagenz	<i>Protein Assay Dye Reagent Concentrate</i> Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
BSA-Lösung	<i>Bovine Serum Albumin Fraction V</i> Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
<i>Complete Protease Inhibitor</i>	<i>cOmplete, EDTA-free</i> Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
DMEM-Medium	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
dNTPS	<i>PCR Grade Nucleotide Mix</i> Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Ethanol	<i>Ethanol absolute p.A.</i> PanReac Applichem, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	
Glutathion Sepharose 4B	<i>Glutathione Sepharose 4B</i> GE Healthcare, Chicago, Illinois, USA

IGEPAL	IGEPAL CA-630 Merck, Darmstadt, Deutschland
IPTG	IPTG Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	2-Propanol Honeywell, Bukarest, Rumänien
Kanamycin	Kanamycinsulfat Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Lysozym	<i>Lysozyme from chicken egg white</i> Merck, Darmstadt, Deutschland
Medium LB	<i>Difco LB Broth, Miller</i> Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Parkin Protein	<i>Recombinant Human Parkin</i> Boston Biochem, Cambridge, Massachusetts, USA
<i>Pooled human donor CSF</i>	<i>Cerebrospinal Fluid (CSF) – Normal – Bulk Volumes</i> Lee Biosolutions, Maryland Heights, Missouri, USA
Pwo Taq + Puffer	Pwo DNA-Polymerase und Puffer Peqlab, Erlangen, Deutschland
Q-Solution	Q-Solution Qiagen, Hilden, Deutschland
Taq + Puffer	Taq DNA-Polymerase und 10x Puffer Qiagen, Hamburg, Deutschland
Triton X-100	Triton X-100 Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin	<i>Trypsin from bovine pancreas</i> Merck, Darmstadt, Deutschland
Tween-20	<i>Tween 20 for molecular biology</i> PanReac Applichem, Darmstadt, Deutschland
Wasser	Ampuwa Kabi Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
YT-Medium	2xYT-Medium für die Molekularbiologie Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

## 2.2.5 Antikörper

**Tabelle 2.7:** Übersicht der verwendeten Antikörper

Bezeichnung	Immunogen	Hersteller	Artikelnummer des Herstellers
Prk8-Tb	AS 399-465 <i>human Parkin monoclonal</i>	abcam Cambridge, Vereinigtes Königreich	ab77924
Parkin2-D2	AS 250-350 <i>human Parkin polyclonal</i>	abcam Cambridge, Vereinigtes Königreich	ab87198
1H9-D2	AS 112-249 <i>human Ataxin-3 monoclonal</i>	Chemicon Temecula, Kalifornien, USA	MAB5360
N-term-Tb	AS 1-215 <i>human Ataxin-3 polyclonal</i>	abcam Cambridge, Vereinigtes Königreich	ab96316

## 2.2.6 Primer

**Tabelle 2.8:** Übersicht der verwendeten Primer

Gen	Bezeichnung	Sequenz 5' – 3'
<b>ATXN3</b>	P290_MJD1VSR	TACTAGAGCTTATTTGCCAG
	P291_MJD734R	CAGAGCCCTCTGCAAATCCT
	R478_MJD_Ex10-R-S	GGTACTGCTCCTTAATCCAGGG
	R479_MJD52	CCAGTGACTACTTTGATTCTG
<b>PARK2</b>	P248_SCA3_R	TGGCCTTTTACATGGATGTGAA
	P249_PolyQ_F	CCAGTGACTACTTTGATTCTG
<b>PARK2</b>	P239_Parkin_Ex4_F1	AAAGGCCCTGTCAAAGAGT
	P240_Parkin_Ex4_R2	TCATTTTCTGGCAGTCTCA
	P241_Parkin_Ex10_F1	CTGCCGGGAATGTAAAGAAG
	P242_Parkin_Ex10_R1	GGAACCTCTCCATGACCTCCA
	P243_Parkin_Ex11_F2	CCGACGTACAGGGAACATAAA
P244_Parkin_Ex11_R1	CTGCTCAGCACAGACTCACC	

Alle Primer wurden hergestellt von der Firma Metabion, Planegg/Steinkirchen, Deutschland. Je PCR wurden 10 pmol des jeweiligen Primers verwendet.

## **2.3 Methoden**

### **2.3.1 Blut**

#### **2.3.1.1 Blutentnahme**

Die Blutentnahme geschah anhand eines von ESMI vorgegebenen, standardisierten Verfahren an den unterschiedlichen klinischen Standorten der beteiligten Institute. In den verschiedenen Kliniken wurde den SCA3-Patienten, präataktische Mutationsträgern und Kontrollpersonen nach der Standardprozedur der jeweiligen Kliniken Blut entnommen. Dabei war darauf zu achten, dass die Kanüle, die zur Venenpunktion genutzt wurde, mit den im Materialteil 2.2.2 aufgeführten Röhrrchen kompatibel war. Die Röhrrchen wurden in einer fest vorgegebenen Reihenfolge befüllt. Für diese Promotions-Arbeit wurden die EDTA-Röhrrchen für die Gewinnung von DNA und die *Cell Preparation Tubes* (CPTs) für die Gewinnung von *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMCs) benötigt.

#### **2.3.1.2 Isolation der DNA aus Blut**

Zur Isolation der DNA wurden die Materialien aus dem *FlexiGene Kit* von Qiagen verwendet. In ein 15 ml Falcon wurden 2,5 ml FG1-Puffer vorgelegt und 1 ml EDTA-Blut hinzugegeben. Das Falcon wurde 5mal invertiert und anschließend 10 Minuten bei 3000 g zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurde das Falcon für 2 Minuten umgedreht offen auf einem sauberen Papiertuch stehen gelassen, damit das darin enthaltene Pellet trocknete. Dann wurden 0,5-1 ml FG2-Puffer-Protease-Gemisch auf das Pellet gegeben und direkt, bis das Pellet in Lösung übergegangen war, gevortext. Nach einer 10-minütigen Inkubation im Wasserbad bei 65°C wurden 0,5 ml 100% Isopropanol in das Falcon pipettiert. Anschließend wurde das Falcon bis zur Ausfällung der DNA mehrfach invertiert. Die ausgefällten DNA-Fäden wurde mit einer kleinen Pipettenspitze aufgenommen und in 70% Ethanol gewaschen. Danach wurde die DNA in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und dieses zum Trocknen für mindestens 5 Minuten offenstehen gelassen. Je nach Größe der DNA-Fäden wurden 100-150 µl FG3-Puffer hinzugefügt. Damit die DNA in Lösung überging, wurde das Reaktionsgefäß für 2 Stunden bei 65°C und 650 Umdrehungen pro Minute (rpm)

im Heizblock inkubiert. In manchen Fällen musste das Reaktionsgefäß sogar über Nacht im Heizblock belassen werden, bis sich das Pellet komplett aufgelöst hatte. Die Konzentration der isolierten DNA wurde in einem Photometer bestimmt. Dazu wurde ein Tropfen der gelösten DNA in ein BioPhotometer eingesetzt und die Extinktion bei 260 nm gemessen. Anschließend wurde die DNA bei -20°C eingefroren.

### **2.3.1.3 Isolation der PBMCs**

Da die weiteren Untersuchungen an PBMCs durchgeführt wurden, mussten diese zunächst aus dem Vollblut isoliert werden. Dazu wurden die CPT-Röhrchen direkt nach der Blutabnahme 8-10mal invertiert. Anschließend wurden sie in einer Zentrifuge mit Ausschwingrotor und ausgeschalteter Bremse für 30 Minuten bei 1700 relativer Zentrifugalbeschleunigung (rcf) und Raumtemperatur zentrifugiert. Aufgrund des in den CPT-Röhrchen befindlichen Dichttrennsystems befinden sich die PBMCs nach der Zentrifugation in der weißlichen Zellschicht oberhalb des Gradienten. Diese Zellschicht wurde mit einer Pasteur-Pipette aufgenommen, in ein 15 ml Falcon überführt und mit DPBS auf 15 ml aufgefüllt. Das Falcon wurde dann mit eingeschalteter Bremse für 15 Minuten bei 300 rcf und Raumtemperatur zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 15 ml DPBS resuspendiert und erneut, wie vorher beschrieben, zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde der Überstand verworfen und die PBMCs bei -80°C eingefroren. Zum Platzsparen im Gefrierschrank oder zum Verschicken von Proben wurden die PBMCs teilweise in 1,5 ml *CryoTubes* überführt. Hierzu wurde das Pellet in 1 ml DPBS aufgenommen und in ein *CryoTube* gegeben. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation mit eingeschalteter Bremse bei 300 rcf und Raumtemperatur wurde der Überstand verworfen und die PBMCs bei -80°C eingefroren. Die Proben, die nicht in Tübingen entnommen wurden, kamen entweder als Zellpellet in einem 1,5 ml *CryoTube* oder einem 15 ml Falcon bei uns im Labor an und wurden dementsprechend mit dem oben beschriebenen Protokoll weiterbearbeitet.



#### **2.3.1.4 Lyse der PBMCs**

Um weitere Untersuchungen durchführen zu können, mussten die zuvor isolierten PBMCs lysiert werden. Hierzu wurden die eingefrorenen PBMCs in einem Wasserbad mit 37°C zügig aufgetaut. Zum Waschen der PBMCs wurden in einer sterilen Werkbank die Zellpellets aus den *CryoTubes* in 1 ml DPBS aufgenommen und in 15 ml Falcons überführt. Anschließend wurden die Falcons gevortext, bis sich die Pellets vollständig aufgelöst hatten. Danach wurden die Falcons bei 500 rcf für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt zweimal wiederholt. Den gewaschenen PBMC-Pellets wurden im Anschluss je nach Größe des Pellets 50-200 µl Lysepuffer hinzugegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit auf Eis und wiederholtem Vortexen der Falcons waren die Zellen lysiert. Bei einigen Proben war es notwendig, weitere 50 µl Lysepuffer hinzu zugegeben, damit die PBMCs vollständig lysiert wurden. Durch diesen Vorgang entstanden sogenannte Homogenate, die aus dem Zellinhalt und den Resten der Zellwände bestehen. Diese PBMC-Homogenate wurden in *CryoTubes* überführt und bei -80°C eingefroren.

#### **2.3.2 DNA-Methoden**

##### **2.3.2.1 Fragmentlängenanalyse des expandierten CAG-Bereiches**

Zur einheitlichen Bestimmung des expandierten CAG-Bereiches im *ATXN3*-Gen aller ESMI-Probanden wurde eine Fragmentlängenanalyse mittels Kapillarelektrophorese vorgenommen. Bei diesem Verfahren wurde zunächst eine Polymerasekettenreaktion (PCR) mit einem Fluoreszenz-markierten Primer durchgeführt. Die PCR wurde in einem 100 µl Reaktionsgefäß im Kühlblock angesetzt (vgl. Tab. 2.9) und anschließend im *G-Storm Thermocycler* prozessiert. Dabei lief das in der Tabelle 2.10 aufgelistete Programm ab.

**Tabelle 2.9:** PCR-Ansatz zur Fragmentlängenanalyse

Menge [ $\mu$ l]	Material
12,8	Wasser
2,5	10x Puffer
0,5	dNTPS
4	Q-Solution
2	Primer P247
2	Primer P248
0,2	Taq-Polymerase
3	DNA

**Tabelle 2.10:** Programm des G-Strom Thermocyclers für die PCR zur Fragmentlängenanalyse

Zyklen	Temperatur [ $^{\circ}$ C]	Dauer [min]
1	94	5
30	94	1
	60	1
	72	2
1	72	10
1	10	$\infty$

Die Denaturierungsschritte (Schritte bei 94 $^{\circ}$ C) stellen sicher, dass die DNA nur noch in Einzelsträngen vorliegt. Bei der Primerhybridisierung (Schritte bei 60 $^{\circ}$ C) lagern sich die Primer spezifisch an die DNA an. Dabei ist die Temperatur dem Wirkungsoptimum der Primer angepasst. Während der Elongationsphasen (Schritte bei 72 $^{\circ}$ C) baut die Taq-Polymerase beginnend am 3'-Ende des angelagerten Primers die fehlenden Nukleotide an. Zwischen der PCR und der Analyse der Fragmentlänge lagen maximal 48 Stunden. Zur Überprüfung des Erfolges der PCR und zur Einschätzung der Menge des PCR-Produkts wurde eine Gelelektrophorese (2.3.2.2) durchgeführt. Anschließend wurde das PCR-Produkt im Sequenzer CEQ 8800 analysiert. Die Fluoreszenz-markierten PCR-Produkte und ein ebenfalls Fluoreszenz-markierter Größenstandard (Size-Standard s. Tab. 2.6) wurden anschließend in einer mit einem Polymer gefüllten Kapillare der Größe nach aufgetrennt. Hierfür wurde eine 96-Well-Platte verwendet. In jede Vertiefung wurden 34,5  $\mu$ l SLS-Puffer, 0,5  $\mu$ l Größen-Standard 600 und 5  $\mu$ l verdünntes PCR-Produkt pipettiert. Dabei wurden entweder 1:20- oder 1:200-Verdünnungen des PCR-Produktes verwendet. Als Verdunstungsschutz wurde in jede Vertiefung ein Tropfen Mineral-Öl gegeben.

Die Länge des CAG-Bereichs wurde im Anschluss durch den verwendeten Größenstandard berechnet.

### **2.3.2.2 Gelelektrophorese**

Die Gelelektrophorese gehört zu den Elektrophorese-Verfahren. Als Trägermedium dient ein Agarosegel. Sie wird verwendet um Gemische aus Proteinen, DNA oder RNA aufzutrennen.

Zum Auftrennen der PCR-Produkte wurde ein 1% Agarosegel aus TBE-Puffer und Agarose Pulver hergestellt und solange in der Mikrowelle erwärmt, bis sich das gesamte Agarose Pulver aufgelöst hatte. Danach wurde 0,5 mg/ml Ethidiumbromid hinzugegeben und das Gel in der gewünschten Form mit einer unterschiedlichen Anzahl an Taschen (je nach Anzahl der Proben) gegossen und danach für mindestens 20 Minuten abkühlen gelassen. Das anschließend feste Gel wurde dann in den Elektrophorese-Apparat mit 1x TBE-Puffer als Ladepuffer gelegt. Die aufzutrennenden Proben wurde 3:1 mit 6x Ladepuffer Orange gemischt und in die Taschen des Gels pipettiert. Zur Größen-Orientierung wurde in eine Tasche der Marker Lambda DNA/HindIII gegeben. Dann wurde die Elektrophorese-Kammer mit der externen Stromversorgung verkabelt und eine Spannung von 80-120 V angelegt. Nach 30-60 Minuten wurde der Strom abgeschaltet. Je nach Länge des DNA-Stranges in den Proben, läuft dieser im Gel unterschiedlich weit von der Kathode zur Anode. Anhand des Markers konnte die Größe des Produktes identifiziert werden.

### **2.3.2.3 Sequenzierung von *Single Nucleotide Polymorphism (SNP)***

In der Literatur sind sowohl für Ataxin-3 als auch für Parkin mehrere SNPs beschrieben. Voruntersuchungen haben gezeigt, dass diese SNPs Auswirkungen auf die Messbarkeit und/oder die Menge der Proteine haben können. Um diese These zu überprüfen, wurden je drei SNPs im *PARK2*- und im *ATXN3*-Gen sequenziert. Zur Sequenzierung wurden mehrere PCR-Reaktionen hintereinander durchgeführt, wobei das letzte PCR-Produkt nur noch aus Einzelsträngen bestand. Diese wurden dann im Sequenzer analysiert.

Die erste PCR war je nach untersuchtem SNP unterschiedlich. Hierzu wurden die Ansätze aus Tabelle 2.11 verwendet und die passenden Programme aus Tabelle 2.12. wurden im *G-Storm Thermocycler* durchgeführt.

**Tabelle 2.11:** Übersicht der PCR-Ansätze für die unterschiedlichen SNPs

<b>ATXN3 SNP A/G669</b>		<b>ATXN3 SNPs G/C987 &amp; C/A1118</b>		<b>PARK2 SNPs</b>	
14,3 µl	Wasser	24 µl	Wasser	13,3 µl	Wasser
2 µl	10x Puffer	3 µl	Pwo Puffer	2 µl	10x Puffer
0,5 µl	dNTPS	0,33 µl	dNTPS	0,5 µl	dNTPS
1 µl	Primer 290	0,66 µl	Primer R478	1 µl	Primer F
1 µl	Primer 291	0,66 µl	Primer R479	1 µl	Primer R
0,2 µl	Taq	0,2 µl	Pwo Taq	0,2 µl	Taq
1 µl	DNA	1,5 µl	DNA	2 µl	DNA

Zur Detektion des SNP A/G669 (rs 1048755) im *ATXN3*-Gen wurde der Ansatz in Spalte 1 genutzt. Der Ansatz in Spalte 2 wurde zur Detektion der SNPs G/C987 (rs 12895357) und C/A1118 (rs 7158733) verwendet. Die SNPs im *PARK2*-Gen (rs1801474, rs1891582 und rs1801334) wurden mit dem Ansatz in Spalte 3 amplifiziert.

**Tabelle 2.12:** Übersicht der Programme des G-Strom Thermocyclers

<b>ATXN3 SNP A/G669</b>			<b>ATXN3 SNPs G/C987 &amp; C/A1118</b>			<b>PARK2 SNPs</b>		
	94°C	5 min		94°C	5 min		95°C	5 min
30x	94°C	1 min	10x	94°C	30 sec	10x	95°C	30 sec
	56°C	1 min		65-55°C	30 sec		65-55°C	30 sec
	72°C	1 min		68°C	45 sec		72°C	30 sec
	72°C	5 min	25x	94°C	30 sec	25x	95°C	30 sec
	10°C	∞		55°C	30 sec		55°C	30 sec
				68°C	45 sec		72°C	30 sec
				68°C	5 min		72°C	7 min
				10°C	∞		10°C	∞

Da bei den SCA3-Patienten und präataktischen Mutationsträgern zwei unterschiedlich lange *ATXN3*-Allele aufgrund der unterschiedlichen Anzahl an CAG-Wiederholungen vorliegen und die SNPs Aminosäure AS987 und AS1118 hinter dem dafür verantwortlichen CAG-Bereich liegen, mussten diese PCR-Produkte mithilfe einer Gelelektrophorese (vgl. 2.3.3) aufgetrennt werden, um die beiden Allele in der anschließenden Sequenzierung separat betrachten zu können. Dazu wurden die zwei Banden, die sich aufgrund der unterschiedlichen CAG-Wiederholungen und den damit unterschiedlichen Größen des PCR-

Produktes bei der Gelelektrophorese aufgetrennt hatten, aus dem Gel ausgeschnitten. Das sich im Gel befindende PCR-Produkt wurde anschließend mittels des *QIAquick Gel Extraktion Kits* nach Angabe des Herstellers extrahiert und aufgereinigt.

Nach dieser ersten PCR folgte eine Kettenabbruchsynthese nach Sanger, bei der es durch den Einbau von Didesoxynukleotiden zum Kettenabbruch kommt. Dabei wurde das PCR-Produkt mit Wasser so verdünnt, dass es circa 50 bis 100 fmol DNA enthielt. Dies ließ sich anhand der Bandendicke im Agarosegel einschätzen. Bei dieser Methode wird das PCR-Produkt zuerst denaturiert bevor die restlichen Materialien hinzugegeben werden. Das heißt, zunächst wird nur das PCR-Produkt bei 98°C für 3 min erhitzt. Danach wurde der Thermocycler kurz gestoppt und die restlichen Materialien (s. Tab. 2.13 und 2.14) wurden hinzugefügt. Anschließend lief das Programm des G-Storm Thermocyclers, wie in Tabelle 2.15 beschrieben, weiter.

**Tabelle 2.13:** Grundgerüst des Ansatzes für die Kettenabbruchsynthese nach Sanger

Menge [µl]	Material
11	PCR-Produkt
3	Quick Start Mix
2	Betain
1,2	Primer

**Tabelle 2.14:** Übersicht der verwendeten Primer für die Kettenabbruchsynthese nach Sanger

Gen	<i>ATXN3</i>		<i>PARK2</i>		
<b>SNP</b>	AS212	AS987 +AS1118	Exon4	Exon10	Exon11
<b>Primer</b>	P291	P478	P240	P242	P244

Alle Primer sind in Tabelle 2.8 in Abschnitt 2.2.6 näher beschrieben.

**Tabelle 2.15:** Programm des G-Storm Thermocyclers für die Kettenabbruchsynthese nach Sanger

Zyklen	Temperatur [°C]	Dauer [sec]
1	98	180
Pause und Zugabe der Materialien		
31	96	20
	58	25
	60	240
1	10	∞

Die PCR-Produkte wurden anschließend gereinigt und somit die PCR vollständig zum Stillstand gebracht. Hierzu wurden 10 µl PCR-Produkt und 15,5 µl Stopp-Mix zusammen in ein UV-stabiles Reaktionsgefäß gegeben. Nach Zugabe von 60 µl eiskaltem 100% Ethanol wurde das Gemisch für 30 Minuten bei *full speed* und 4°C zentrifugiert. Dabei bildete sich am Boden des Reaktionsgefäßes ein Pellet. Die darüberstehende Flüssigkeit wurde vorsichtig abgeschüttet. Danach wurden 190 µl eiskaltes 70% Ethanol hinzugegeben und erneut für 20 Minuten bei *full speed* und 4°C zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand vorsichtig abgeschüttet. Anschließend wurden 90 µl eiskaltes 70% Ethanol hinzugegeben und für 15 Minuten bei *full speed* und 4°C zentrifugiert. Nach dem erneuten Abschütten des Überstandes wurde das Pellet im *SpeedVac* Vakuum Trockner für 12 Minuten bei 30°C getrocknet. Dann wurde das Pellet in 42 µl SLS-Puffer resuspendiert und für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur in der Dunkelheit inkubiert.

Das gereinigte PCR-Produkt wurde zum Schluss im Sequenzer CEQ 8000 nach Herstellerangaben analysiert.

### 2.3.3 Proteine

#### 2.3.3.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Gesamtproteingehalt der PBMC-Homogenate wurde mittels des Verfahrens nach Bradford bestimmt (Bradford, 1976). Dieses Verfahren ist eine schnelle und sensitive Methode, den Proteingehalt zu bestimmen und basiert auf der Bindung des Farbstoffes *Coomassie Brilliant Blue G-250* an Proteinen. Die Bindung führt

zu einer Farbveränderung, die durch eine Messung der Absorption bei 595 nm quantifiziert werden kann.

Um weniger Material zu verbrauchen, wurden einige Modifikationen am ursprünglichen Verfahren (Bradford, 1976) vorgenommen. Nachdem die Proben langsam auf Eis aufgetaut waren, wurden jeweils 1-5 µl der lysierten PBMCs in ein Well einer 96-Well-Platte pipettiert und mit Wasser auf 100 µl aufgefüllt. Für die Eichreihe wurde eine 0,25 mg/ml BSA-Lösung hergestellt und dann jeweils 0, 1, 2, 5, 10, 15 und 20 µl dieser Lösung mit Wasser auf 100 µl aufgefüllt. Zwei Teile Bradford-Reagenz wurden mit drei Teilen Wasser verdünnt und anschließend je 100 µl zu den verdünnten Proben und der Eichreihe gegeben. Nach 5 Minuten Inkubationszeit wurde die Extinktion bei 595 nm durch den *Mircoplate Reader* gemessen. Anhand der Eichkurve wurde der Gesamtproteingehalt jeder Probe berechnet.

### **2.3.3.2 Proteinbestimmung mittels TR-FRET**

In dieser Arbeit wurden die Proteinanteile von löslichem Parkin und löslichem *full-length* Ataxin-3 in verschiedenen humanen Körperflüssigkeiten bestimmt. Hierzu wurde ein TR-FRET Assay verwendet. Diese Methode basiert auf einer sehr spezifischen Bindung zweier Fluoreszenz-markierter Antikörper an ein bestimmtes Protein-Molekül, deren Fluoreszenzemission nach Anregung durch einen Laser gemessen werden kann.

In eine Vertiefung einer 384-Well-Platte wurden 5 µl PBMC-Homogenat vorgelegt. Zur Messung von Parkin wurde die Proben mit einer Gesamt-Protein-Konzentration von 0,2 bis 0,4 µg/µl eingesetzt. Bei der Messung von *full-length* Ataxin-3 zeigte sich keine Konzentrationsabhängigkeit, weshalb dafür die Proben in einer 1:4-Verdünnungen eingesetzt wurden. Anschließend wurde 1 µl eines Gemisches aus Detektionspuffer und zwei Fluoreszenz-markierter Antikörpern (vgl. Tab. 2.7) hinzugegeben. Die Antikörper wurden zuvor von der Firma Cisbio mit Terbium (Tb) und der D2-Linie von Cäsium (D2) Fluoreszenz-markiert. Für die Messungen von Ataxin-3 wurden die Antikörper N-term-Tb mit einer Konzentration von 0,5 ng/µl und 1H9-D2 mit einer Konzentration von 10 ng/µl verwendet. Für die Messungen von Parkin wurden die Antikörper Prk8-Tb mit einer Konzentration 0,3 ng/µl und Parkin2-D2 mit einer Konzentration von 10

ng/µl verwendet. Da beide Antikörper Fluoreszenz-markiert sind, sollte das Gemisch so wenig Licht wie möglich ausgesetzt werden. Nach dem Befüllen der Platte wurde diese lichtdicht in Alufolie eingepackt und bei 4°C gelagert. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden erfolgte die Messung durch einen *Multimode Plate Reader*. Dabei wurde einmal bei 620nm und einmal bei 665nm gemessen. Der dabei erhaltene Wert  $Ratio \frac{665}{620} (Probe)$  wurde wie folgt weiter verrechnet:

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

$$\Delta Fc = \frac{\Delta F}{\text{Gesamtproteingehalt}}$$

Bei jeder Messung von Proben wurden eine Negativkontrolle und eine Positivkontrolle mitgemessen. Als Negativkontrolle diente der Lysepuffer aus 2.3.1.4. Als Positivkontrolle wurde eine 1:20 Verdünnung des Proteingemisches mit dem überexprimierten GFP-Ataxin-3 70Q verwendet (Herstellung s. 2.3.3.3). Sowohl die Proben als auch die Positiv- und Negativkontrollen wurden immer im Duplikat in den Assay eingesetzt.

### **2.3.3.3 Herstellung von Zellkultur-Homogenaten mit überexprimierten GFP-Ataxin-3 15Q, 70Q und 148Q mithilfe von *Attractene Transfection Reagent* in HEK 293T-Zellen**

Bei der Proteinkonzentrations-/ oder -mengenbestimmung mittels TR-FRET ist es notwendig, bei jedem Messvorgang mindestens eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mitlaufen zu lassen. Nur so kann mit Sicherheit gesagt werden, dass die Messung aussagekräftig ist und sich die Messwerte in einem verlässlichen Bereich bewegen. Als Positivkontrolle bei der Messung von *full-length* Ataxin-3 wurden Zellkultur-Homogenate mit überexprimierten GFP-Ataxin-3 mit jeweils 15, 70 und 148Q verwendet. Diese mussten vorab in eukaryontischen Zellen exprimiert werden. Hierzu wurden HEK 293T-Zellen mit GFP-ATXN3 15, 70 oder 148Q Plasmid-DNA aus DH5 α E. coli mittels *Attractene Transfection Reagent* transfiziert. Die Glycerolstocks mit den



dementsprechenden DH5  $\alpha$  E. coli Kulturen wurden freundlicherweise von Jonasz Weber zur Verfügung gestellt.

#### **2.3.3.3.1 Umgang mit der Zellkultur**

Die HEK 293T-Zellen wurden zunächst gesplittet. Dafür wurde das DMEM-Medium, in dem die Zellen kultiviert wurden, abgesaugt und den Zellen anschließend zum Waschen 5-10 ml PBS hinzugegeben. Nach vorsichtigem Schwenken wurde das PBS wieder abgesaugt. Durch Zugabe von 1 ml Trypsin und einer nachfolgenden 2-minütigen Inkubation bei 37°C wurden die Zellen vom Boden der Flasche abgelöst. Die Zellen wurden dann in 10 ml DMEM-Medium in Lösung gebracht. 3 ml dieser Lösungen wurden behalten und mit 7 ml neuem DMEM-Medium versetzt. Danach wurden die Zellen zum Wachsen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

#### **2.3.3.3.2 Isolation der Plasmid-DNA**

Zeitgleich wurden drei unterschiedliche DH5  $\alpha$  E. coli Kulturen, die Plasmid-DNA mit jeweils GFP *ATXN3* 15Q, 70Q oder 148Q enthalten, angezüchtet. Hierzu wurden die jeweiligen Bakterien aus einem Glycerolstock entnommen und in 12 ml Medium LB mit Kanamycin in einer Konzentration von 1:1000 überführt. Die Ansätze wurden mindestens 12 Stunden bis zur sichtbaren Trübung bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mithilfe des *QIAprep Spin Miniprep Kits* aus den Bakterien isoliert. 5 ml des Bakterienansatzes wurden bei 8000 rpm und Raumtemperatur für 3 Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das entstandene Bakterienpellet in 250  $\mu$ l P1 Puffer resuspendiert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden 250  $\mu$ l P2 Puffer hinzugegeben und direkt 4-6mal invertiert. Maximal 5 Minuten später wurden dann 350  $\mu$ l N3 Puffer hinzugegeben und wieder 4-6mal invertiert. Im Anschluss folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und Raumtemperatur. Alle weiteren Zentrifugationen wurden ebenfalls bei 13000 rpm und Raumtemperatur durchgeführt. 800  $\mu$ l des entstandenen Überstandes wurden in eine *QIAprep 2.0 spin column* pipettiert. Diese wurde dann 1 Minute zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Durchflusses wurden zum Waschen 500  $\mu$ l PB Puffer hinzugegeben und anschließend erneut

1 Minute zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde mit 750 µl PB Puffer wiederholt. Danach wurde wieder 1 Minute zentrifugiert, um den restlichen Waschpuffer zu entfernen. Die *QIAprep 2.0 spin column* wurde nachfolgend in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt und 50 µl EB Puffer in die Mitte der *QIAprep 2.0 spin column* pipettiert. Nach einer Minute Inkubationszeit wurde letztmals 1 Minute zentrifugiert. Die fertig isolierte Plasmid-DNA befand sich nun im 1,5 ml Reaktionsgefäß. Der DNA-Gehalt wurde anschließend im Photometer bei 260 nm bestimmt.

#### **2.3.3.3.3 Transfektion der HEK 293T-Zellen mit der Plasmid-DNA**

Die Transfektion der HEK 293T-Zellen mit der Plasmid-DNA wurde mithilfe des *Attractene Transfection Reagent* durchgeführt. Die Plasmid DNA wurde zunächst mit TE Puffer verdünnt, sodass 100 µl Lösung eine DNA-Konzentration von 0,1 µg/µl enthielten. Danach wurden 4,5 µl *Attractene Transfection Reagent* hinzugefügt und das Gemisch für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden die zuvor erneut gesplitteten HEK 293T-Zellen gezählt und so verdünnt, dass sich in 2 ml Medium  $3,5 \times 10^5$  Zellen befanden. Diese 2 ml Zellsuspension wurden in eine Vertiefung einer 6-Well-Platte gegeben und anschließend das Transfektionsgemisch tropfenweise hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 48-72 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde die Transfektionseffizienz mittels Fluoreszenzmikroskop überprüft. In allen Ansätzen waren grün leuchtende Zellen zu erkennen. In den Ansätzen mit GFP *ATXN3* 148Q waren zusätzlich grün leuchtende Proteinablagerungen zu sehen.

#### **2.3.3.3.4 Lyse der HEK 293T-Zellen**

Im letzten Schritt wurden die Zellen lysiert. Dazu wurden die Zellen am Boden der Vertiefung mittels Zellschaber abgelöst. Die Zellen wurden zusammen mit dem Medium in ein Falcon übertragen. Die Vertiefungen wurden mit 1 ml PBS ausgespült und dieser 1 ml ebenfalls in das Falcon gegeben. Anschließend wurde das Falcon für 5 Minuten bei 1200 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und zum Waschen des Zellpellets 2 ml PBS hinzugegeben. Nach erneuter 5-minütiger Zentrifugation bei 1200 rpm und

Raumtemperatur wurde der Überstand wieder verworfen und das Falcon auf Eis gelagert. 80 µl RIPA Puffer mit 1x Complete Protease Inhibitor wurden hinzugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation und wiederholtem Vortexen waren alle Zellen lysiert. Das nun vorliegende Proteingemisch mit dem jeweiligen überexprimierten GFP-Ataxin-3 (15Q, 70Q oder 148Q) wurde in je ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C eingefroren. Die Proteinkonzentration wurde mittels der Methode nach Bradford (2.3.3.1) bestimmt.

#### **2.3.3.4 Herstellung von GST-Parkin V380- und L380- Fusionsproteinen mithilfe eines pGEX 6p1 Expressionsvektors in E. coli BL21**

Die Einzelbestimmung des Proteins Parkin mittels TR-FRET ist bisher selten durchgeführt worden. In der Literatur finden sich kaum Informationen darüber. Zur Etablierung dieser Methode für Parkin und auch als Positivkontrolle bei den TR-FRET Messungen musste daher rekombinantes Parkin hergestellt werden. Dazu wurden GST-Parkin V380- und L380-Fusionsproteine mithilfe eines pGEX 6p1 Expressionsvektors in E. coli BL21 produziert.

Zuerst wurde je eine Kultur der Bakterien für GST-Parkin V380- und L380-Fusionsproteine in 7,5 ml 2xYT-Medium mit Ampicillin (1:1000) in einem 50 ml Falcon angesetzt und über Nacht bei 37°C und 220 rpm inkubiert. Die gesamten 7,5 ml der Über-Nacht-Kulturen wurden danach in 500 ml 2xYT-Medium mit Ampicillin in einer Konzentration von 1:1000 überführt und nochmals bei 37°C im Schüttelinkubator bei 220 rpm bis zu einer optischen Dichte von  $OD_{595}=0,6$  inkubiert. Anschließend wurde IPTG in einer Konzentration von 1:1000 hinzugeben und weitere 3 Stunden bei gleichen Bedingungen inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Ansätze bei 4°C und 1500 g für 30 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Pellets bei -80°C eingefroren.

Zum Aufreinigen wurde das Bakterien-Pellet in 10 ml Puffer A unter Zugabe von 80 mg Lysozym und 100 µl Triton X-100 in einem Eisbad aufgetaut und für 30 Minuten geschüttelt. Danach wurden die Bakterien mit Ultraschall 3-mal für 30 Sekunden mit 40% Power lysiert. Es folgte eine 30-minütige Zentrifugation bei 4°C und 25.500 g, um die schweren Zellbestandteile vom löslichen Protein zu trennen. Dieser Schritt wurde mit dem Überstand wiederholt. Der nach der zweiten Zentrifugation angefallene Überstand, der die jeweiligen Fusionsproteine

enthielt, wurde in je ein frisches 15 ml Falcon übertragen und ins Eisbad gestellt. Anschließend wurde 1 ml Glutathion Sepharose 4B in einem 15 ml Falcon bei 4°C und 500 g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde mit 5 ml PBS gewaschen. Danach wurden die Sepharose-Beads durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 4°C und 500 g sedimentiert. Dieser Waschvorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt. Der zuvor ins Eisbad gestellte Überstand wurde zu den gewaschenen Sepharose-Beads gegeben. Das Gemisch wurde für 90 Minuten bei 4°C und 10 rpm im Schüttler inkubiert und anschließend für 10 Minuten bei 4°C und 500 g zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde verworfen, das Sediment mit 5 ml Puffer B gewaschen und danach für 10 Minuten bei 4°C und 500 g zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand verworfen. Dieser Waschschrift wurde 2mal mit Puffer A wiederholt. Das gewaschene Sediment wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und 500 µl Elution Puffer hinzugegeben. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur und 10 rpm wurde das Gemisch für 10 Minuten bei 4°C und 500 g zentrifugiert. Der Überstand, der nun das eluierte Protein beinhaltet, wurde vorsichtig abgenommen und in ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Diese Elution wurde insgesamt 3mal durchgeführt. Die dabei entstandenen Überstände wurde mittels *Amicon Ultra 10K device* nach Herstellerangaben aufkonzentriert und anschließend zusammengeführt. Das somit aufgereinigte Protein wurde mit Dilution Puffer auf 500 µl verdünnt und bei -80°C eingefroren. Die Proteinkonzentration wurde durch Quantifizierung gegen einen BSA-Standard mithilfe einer SYPRO Ruby Färbung bestimmt und das überexprimierte Vorliegen des V380- bzw. L380-Fusionsproteins durch eine Gelelektrophorese (vgl. 2.3.2.2) nachgewiesen.

#### **2.3.3.5 Herstellung einer CSF-Kalibrationsmatrix mithilfe von Dynabeads Protein G**

Damit die Proteinmessung mittels TR-FRET in CSF-Proben etabliert werden konnte, war eine Negativkontrolle unbedingt notwendig, da der dafür gemessene Wert für die Korrelation der Messergebnisse benötigt wird. Eine solche Negativkontrolle, wie es z.B. für die Proteinbestimmung in lysierten PBMCs der zur Lyse verwendete Lysepuffer war, fehlte jedoch für die CSF-Proben. Daher

wurde versucht, eine CSF-Probe herzustellen, die kein Ataxin-3 beinhaltet und somit als Negativkontrolle dienen könnte.

Zu 470  $\mu\text{l}$  *pooled human donor* CSF-Probe wurden zunächst 25  $\mu\text{l}$  eines Mixes aus 20x *Complete Protease Inhibitor* und 4% IGEPAL hinzugegeben. Das Gemisch wurde für 45 min bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Nach dem Auftauen wurden 5  $\mu\text{l}$  100% Triton-X 100 hinzugefügt, sodass das Gemisch letztendlich 0,2% IGEPAL, 1% Triton-X 100 und 1x *Complete Protease Inhibitor* enthielt. Diesem Gemisch wurden anschließend 350 ng 1H9-Antikörper (Tab. 2.7), der spezifisch an Ataxin-3 bindet, hinzugegeben. Es folgte eine 90-minütige Inkubation bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 14 rpm im Rotationsmischer, damit sich die Antikörper und die Proteine verbinden konnten. Währenddessen wurden die *Dynabeads Protein G* vorbereitet, indem 15  $\mu\text{l}$  *Dynabeads* in einem 2 ml Reaktionsgefäß in einen Magnetständer gestellt wurden. Die magnetischen *Dynabeads* lagerten sich an dem Magneten an und der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurde der CSF-Ansatz zu den *Dynabeads* gegeben. Damit die *Dynabeads* an den Antikörper-Proteinkomplex binden konnten, wurde das Gemisch für 30 min bei Raumtemperatur und 14 rpm inkubiert. Danach wurde das Gemisch wieder in den Magnetständer gestellt, damit die *Dynabeads*-Antikörper-Proteinkomplexe an den Magnet binden konnten. Der Überstand wurde abgenommen und mit diesem wurden die vorherigen Schritte mit neuen *Dynabeads* und einer 60-minütigen Bindungsphase wiederholt. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass das gesamte Ataxin-3 aus dem Gemisch entfernt wurde. Das entstandene Produkt wurde CSF-Kalibrationsmatrix genannt. Die beiden entstandenen *Dynabeads*-Antikörper-Proteinkomplexe wurden zusammen in 400  $\mu\text{l}$  Waschpuffer aufgenommen, kurz gevortext und in den Magnetständer gestellt. Die Komplexe lagerten sich am Magnet an und der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurden 20  $\mu\text{l}$  Elutionspuffer zu den Komplexen gegeben, das Gemisch für 2 Minuten leicht geschüttelt und wieder in den Magnetständer gestellt. Durch den Elutionspuffer lösten sich die *Dynabeads*-Antikörperkomplexe wieder vom Ataxin-3. Nachdem sich die Komplexe am Magneten angelagert hatten, wurde der Überstand vorsichtig abgenommen. In ihm befand sich das aus der CSF-Kalibrationsmatrix entfernte Ataxin-3. Dieser Überstand mit dem aus der

CSF-Kalibrationsmatrix entfernten Ataxin-3, der CSF-Kalibrationsmatrix, eine CSF-Probe (CSF pur) und die CSF-Probe mit 1% Triton X-100, 0,2% IGEPAL und 1x *Complete Protease Inhibitor* wurden mittels des TR-FRET Assays quantifiziert. Die *CSF-Kalibrationsmatrices* und das dabei isolierte Ataxin-3 wurden bei -80°C eingefroren.

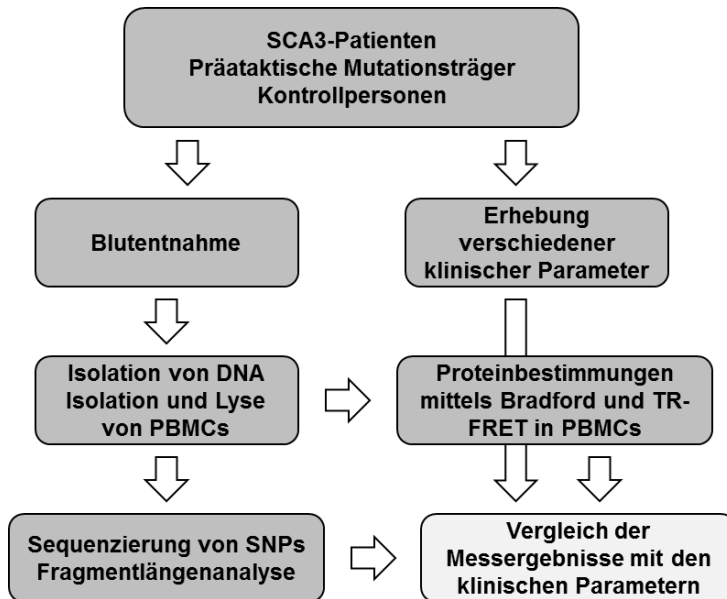
## **2.4 Statistische Auswertung**

Für die statistische Auswertung wurde das Programm *SPSS Statistics* von IBM (Ehningen, Deutschland) verwendet. Damit wurden die erhobenen und gemessenen Daten katalogisiert. Anhand dieser Daten wurden mithilfe des Programms Tabellen und Graphen erstellt. Mittelwerte, Medianwerte, Standardabweichungen und Ausreißer wurden ermittelt. Zur Überprüfung der Signifikanz wurde der t-Test für unabhängige Variablen genutzt. In den Graphen gezeigte kleine Sternchen sagen nichts, wie in anderen Darstellungen üblich, über die Signifikanz aus. Die kleinen Kreise und Sternchen stehen für Ausreißer, die über der zweifachen Standardabweichung (kleine Kreise) oder sogar über der dreifachen Standardabweichung liegen (kleine Sternchen).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Ziel der Studie

Die Analyse von Biomarkern ist für die Erkennung und Behandlung von Erkrankungen unabdingbar. Für die SCA3 sind unter anderem die Proteine Ataxin-3 als Erkrankungsprotein und Parkin als dessen direkter Interaktionspartner potenzielle Biomarker. Um dies zu analysieren, wurde SCA3-Patienten, präataktischen Mutationsträgern und Kontrollpersonen Blut abgenommen und zeitgleich die klinischen Parameter SARA-Score und INAS-Score sowie, falls gegeben, das Alter bei Erkrankungsbeginn und die Krankheitsdauer erhoben. Dies geschah im Rahmen von ESMI durch Partner an mehreren europäischen Standorten. In dieser Arbeit wurden Proben aus Bonn, Coimbra, London und Tübingen analysiert. Dafür wurden aus den Blutproben DNA und PBMCs gewonnen. Die DNA wurde verwendet, um einerseits nochmals einheitlich an einem Standort die Länge des CAG-Bereiches im *ATXN3*-Gen und andererseits bekannte SNPs im *ATXN3*- und *PARK2*-Gen zu bestimmen. In den PBMCs wurden die Proteingehalte von *full-length* Ataxin-3 und Parkin mittels der Gesamtproteinbestimmung nach Bradford und der Proteinbestimmung mit dem TR-FRET-Assay gemessen (vgl. Abb. 3.1.1). Sämtliche gemessenen und erhobenen Daten wurden im Folgenden analysiert und miteinander verglichen, um *full-length* Ataxin-3 und Parkin als potenzielle Biomarker zu überprüfen.



**Abbildung 3.1.1:** Ablauf der Studie

Von SCA3-Patienten, präataktischen Mutationsträgern und Kontrollpersonen wurde Blut entnommen und verschiedene klinische Parameter wie beispielsweise SARA-Score oder INAS-Score erhoben. Aus dem Blut wurden DNA und PBMCs isoliert. Mit der DNA wurden die Länge des CAG-Bereiches im *ATXN3*-Gen und bekannte SNPs im *ATXN3*- und *PARK2*-Gen bestimmt. In den PBMCs wurde die Menge der Proteine Ataxin-3 und Parkin durch die Gesamtproteinbestimmung nach Bradford und der Proteinbestimmung mittels TR-FRET gemessen und berechnet. Die erhobenen klinischen Parameter wurden untereinander und mit den Mengen der Proteine Ataxin-3 und Parkin verglichen.

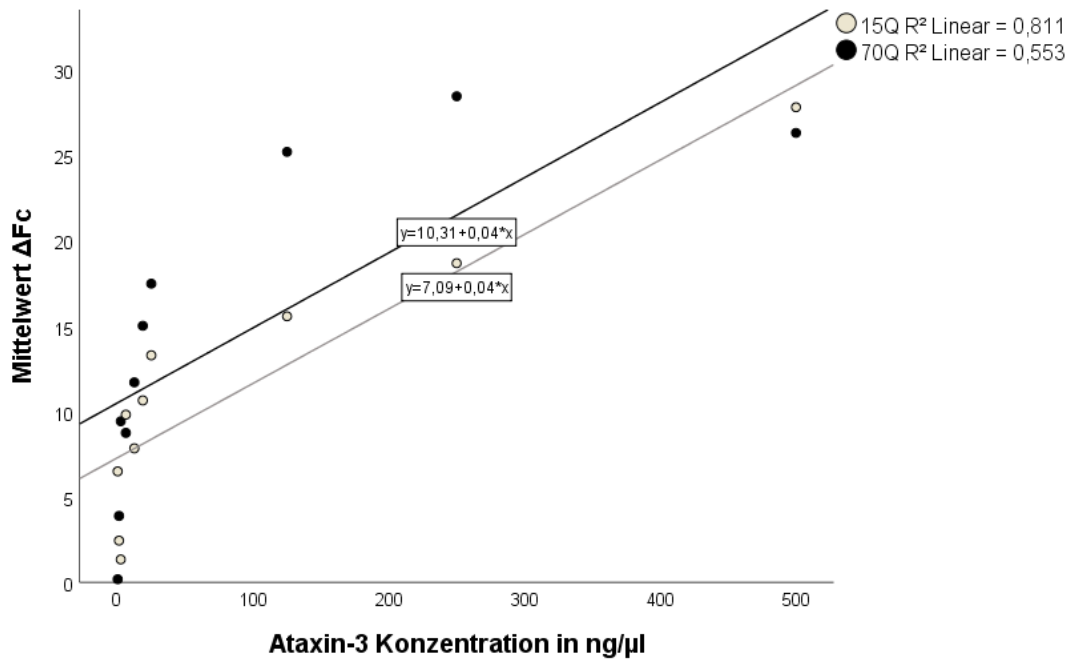
## 3.2 Etablierung des TR-FRET-Assays

### 3.2.1 Etablierung des TR-FRET-Assays für das lösliche *full-length* Ataxin-3 Protein

Lösliches Ataxin-3 Protein, unabhängig ob das normale, spezifisch das mutierte oder beide zusammen (*full-length*), wurde bisher eher selten in humanen Patientenmaterialien quantifiziert. Für die Bestimmung von Ataxin-3 Proteinlevel wurde in unserem Institut bisher ein TR-FRET-Assay verwendet (Gonsior et al., 2021, Martier et al., 2019, Nguyen et al., 2013). Für die Quantifizierung von löslichem *full-length* Ataxin-3 hatte Frau Dr. med. Kathrin Gonsior in ihrer Dissertation in einem TR-FRET-Assay die Antikörper 1H9 und N-term zur Messung in unterschiedlichen Biomaterialien verwendet. Dabei wurde der N-term-Antikörper mit Terbium (Tb) und der 1H9-Antikörper mit der D2-Linie von Cäsium (D2) Fluoreszenz-markiert. Diese Antikörperkombination wurde in dieser Arbeit für die sichere Quantifizierung in PBMCs validiert und weiterentwickelt.



Für eine sichere Quantifizierung ist eine lineare Korrelation zwischen den Messwerten für das lösliche Ataxin-3 und der Ataxin-3 Konzentrationen unabdingbar. Um dies zu überprüfen, wurden zunächst Zellkultur-Homogenate hergestellt, in denen jeweils Ataxin-3 15Q, 70Q oder 148Q überexprimiert waren (s. 2.3.3.3). Diese Homogenate wurden dann als Kontrollreihen in verschiedenen Konzentrationen gemessen, um einen linearen Messbereich für die nachfolgenden Analysen zu bestimmen. Dabei stellte sich der Bereich zwischen den Konzentrationen von 0,25 bis 500 ng/µl Ataxin-3 Protein als optimal dar. Um dies zu bestätigen, wurden die Homogenate mit jeweils Ataxin-3 15Q oder 70Q in den Konzentration 0,25; 1,25; 2,5; 6,25; 12,5; 18,75; 25; 125; 250 und 500 ng/µl in zweifacher Ausführung gemessen. Danach wurde für jede Konzentration der Mittelwert errechnet. Die Mittelwerte wurden dann mit den eingesetzten Konzentrationen verglichen (Abb. 3.2.1). Dabei zeigten sich für beide Homogenate (15Q  $r^2=0,811$ ; 70Q  $r^2=0,553$ ) lineare Korrelationen zwischen den beiden Messgrößen. Zugleich konnte überprüft werden, ob die Expansion des CAG-Bereiches im *ATXN3* Gen für die Messungen des *full-length* Ataxin-3 Proteins eine Rolle spielte. Die  $\Delta Fc$ -Werte für das mutierte Ataxin-3 (70Q) lagen im Durchschnitt 3,22 Punkte über den  $\Delta Fc$ -Werte für das nicht-pathologische Ataxin-3 (15Q). Die Steigung der beiden Regressionsgeraden war gleich (Abb. 3.2.1).



**Abbildung 3.2.1:** Analyse des linearen Messbereiches von Ataxin-3

Auf der X-Achse ist die Ataxin-3 Konzentration, auf der Y-Achse der Mittelwert  $\Delta F_c$  der Messergebnisse aufgetragen. Es ergab sich sowohl für das Homogenat mit dem überexprimierten Ataxin-3 15Q als auch für das mit dem überexprimierten Ataxin-3 70Q eine lineare Korrelation zwischen den beiden Messgrößen.

Für eine solide Messung war die Reproduzierbarkeit der Messungen ebenfalls sehr wichtig. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurden zwei unterschiedliche Tests durchgeführt: der Intra- und Interplattentest. Für den Intraplattentest wurden zwei verschiedene Proben an verschiedenen Positionen einer 384-Well-Platte gemessen (Abb.3.2.2).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A	Probe 1	Probe 1																					Probe 2	Probe 2
B	Probe 2	Probe 2																					Probe 1	Probe 1
C								Probe 2	Probe 2															
D								Probe 1	Probe 1															
E															Probe 2	Probe 2								
F															Probe 1	Probe 1								
G	Probe 1	Probe 1																					Probe 2	Probe 2
H	Probe 2	Probe 2										DPBS	DPBS										Probe 1	Probe 1
I																								
J								Probe 2	Probe 2															
K								Probe 1	Probe 1															
L															Probe 2	Probe 2								
M															Probe 1	Probe 1								
N																								
O	Probe 1	Probe 1																					Probe 2	Probe 2
P	Probe 2	Probe 2																					Probe 1	Probe 1

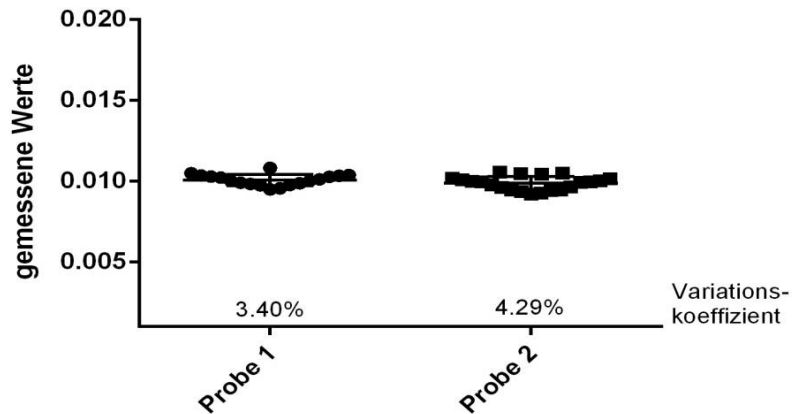
**Abbildung 3.2.2:** Verteilungsmuster der Proben auf der 384-Well-Platte für den Intraplattentest

Probe 1 entspricht dem selbst hergestellten Ataxin-3 148Q 1:4 verdünnt, Probe 2 dem selbst hergestellten Ataxin-3 148Q 1:16 verdünnt. DPBS steht für die Negativkontrolle.

Beim Interplattentest wurden zwei verschiedene Proben auf 14 unterschiedlichen 384-Well-Platten im Duplikat gemessen. Bei beiden Tests wurde als Probe 1 das Homogenat mit dem überexprimierten Ataxin-3 148Q 1:4 verdünnt und als Probe 2 das gleiche Homogenat 1:16 verdünnt verwendet. Verglichen wurden bei beiden Tests die direkt vom Platten-Reader gemessenen Werte *Ratio 665/620*. Dadurch wurden Veränderung der Resultate, die möglicherweise durch das Verrechnen der Werte mit der Gesamtprotein-Konzentration entstehen könnten, ausgeschlossen.

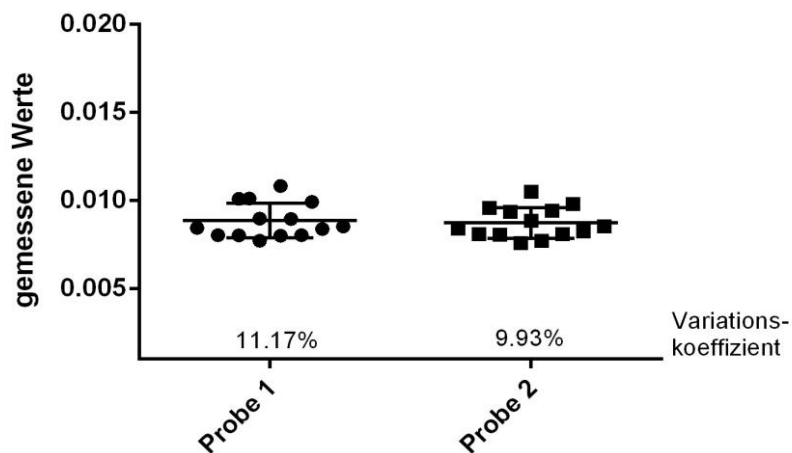
Beim Intraplattentest für das lösliche Ataxin-3 ergab sich für Probe 1 ein Variationskoeffizient von 3,40% (Abb. 3.2.3). Für Probe 2 zeigte sich ein Variationskoeffizient von 4,29%. Damit lagen beide Variationskoeffizienten in einem sehr akzeptablen Bereich.

Beim Interplattentest für das lösliche *full-length* Ataxin-3 zeigte sich für Probe 1 ein Variationskoeffizient von 11,17% (Abb. 3.2.4). Für Probe 2 lag der Variationskoeffizient bei 9,93%. Somit waren beide Variationskoeffizienten etwas höher als die Variationskoeffizienten beim Intraplattentest. Dennoch lagen beide in einem akzeptablen Bereich.



**Abbildung 3.2.3:** Intraplattentest für das lösliche Ataxin-3

Probe 1 entsprach dem Homogenat mit überexprimiertem Ataxin-3 148Q 1:4 verdünnt, Probe 2 dem gleichen Homogenat 1:16 verdünnt. Für beide Proben wurden 20 Messwerte auf der gleichen 384-Well-Platte erhoben. Die Messwerte für beide Proben variieren dabei zwischen 3 und 4,5%.



**Abbildung 3.2.4:** Interplattentest für das lösliche Ataxin-3

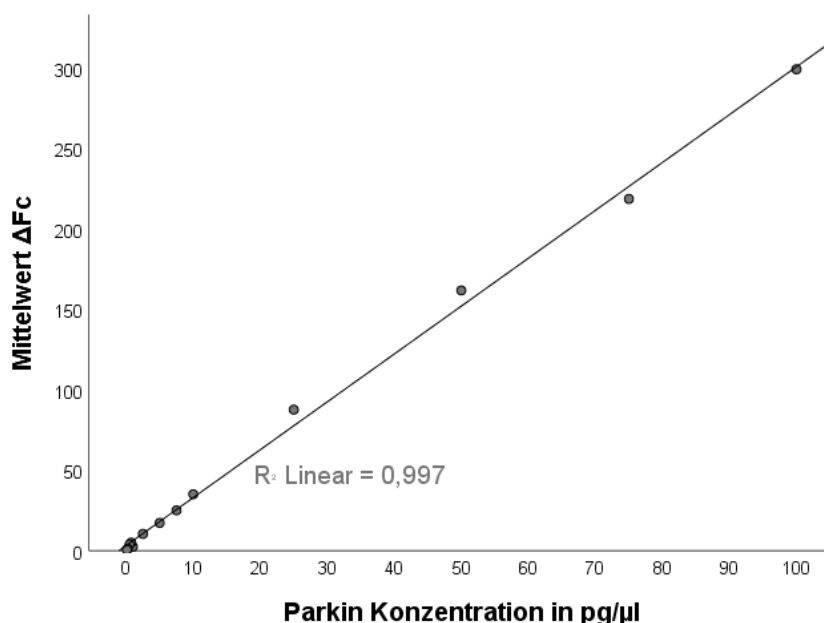
Probe 1 entsprach dem Homogenat mit überexprimiertem Ataxin-3 148Q 1:4 verdünnt, Probe 2 dem gleichen Homogenat 1:16 verdünnt. Beide Proben wurden im Duplikat auf 14 unterschiedlichen Platten gemessen. Die Variationskoeffizienten lagen zwischen 9 und 11,5%.

### 3.2.2 Etablierung des TR-FRET-Assays für das lösliche Parkin Protein

Ein TR-FRET-Assay zur Quantifizierung von löslichem Parkin wurde bisher sehr selten verwendet. Dementsprechend war in der Literatur dazu kaum etwas zu finden. Frau Dr. med. Kathrin Gonsior hatte in ihrer Dissertation im Rahmen des Neuromics-Projekts (ein Vorläufer der ESMI) unter anderem auch lösliches Parkin in verschiedenen Biomaterialien gemessen und dabei die Antikörper Prk8 und Parkin2 (s. 2.2.5 Tab. 2.6) genutzt. Dafür wurde der Prk8-Antikörper mit Terbium (Tb) und der Parkin2-Antikörper mit der D2-Linie von Cäsium (D2)

Fluoreszenz-markiert. Diese Antikörperkombination galt es in dieser Arbeit für die Quantifizierung von löslichem Parkin in PMBCs zu validieren und weiterzuentwickeln.

Zunächst wurde überprüft, ob die für eine sichere Quantifizierung notwendige, lineare Korrelation zwischen den Messwerten  $\Delta Fc$  und der Konzentration des löslichen Parkin Proteins vorliegt. Dazu wurde zunächst kommerziell erworbenes, rekombinantes Parkin Protein (s. 2.2.4 Tab. 2.6) in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Dabei stellte sich der Bereich zwischen 0,1 und 100  $\text{pg}/\mu\text{l}$  als optimaler Messbereich heraus. Zur Bestätigung wurde Parkin in den Konzentrationen 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 25; 50; 75 und 100  $\text{pg}/\mu\text{l}$  in vierfacher Ausführung gemessen. Anschließend wurde der Mittelwert der vier Messungen für jede Konzentration errechnet. Die errechneten Mittelwerte wurden dann mit den eingesetzten Konzentrationen verglichen (Abb. 3.2.5). Es zeigte sich eine sehr starke, lineare Korrelation ( $r^2=0,997$ ) zwischen den beiden Messgrößen.

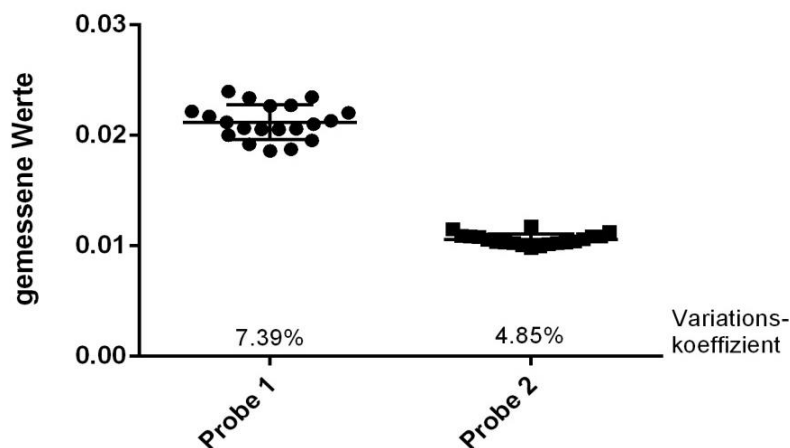


**Abbildung 3.2.5:** Linearer Messbereich des Parkin TR-FRET Assays

Auf der X-Achse ist die Parkin Konzentration in  $\text{pg}/\mu\text{l}$ , auf der Y-Achse der Mittelwert  $\Delta Fc$  der Messergebnisse aufgetragen. Es zeigte sich eine sehr starke, lineare Korrelation zwischen den beiden Messgrößen.

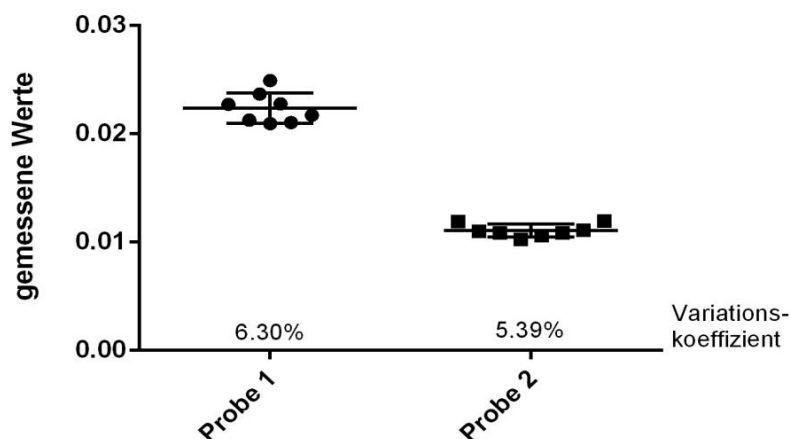
Des Weiteren war es wichtig, die Reproduzierbarkeit des Assays zu gewährleisten. Dazu wurden zwei verschiedene Tests durchgeführt: der Intra-

und Interplattentest. Für den Intraplattentest wurden zwei unterschiedliche Proben auf einer 384-Well-Platte an verschiedenen Positionen gemessen (vgl. Abb. 3.2.2). Für den Interplattentest wurden zwei unterschiedliche Proben auf acht verschiedenen 384-Well-Platten im Duplikat gemessen. Bei beiden Tests wurde als Probe 1 das kommerziell erworbene, rekombinante Parkin in der Konzentration 75 pg/µl und als Probe 2 das kommerziell erworbene Parkin in der Konzentration 5 pg/µl verwendet. Verglichen wurden bei den Tests diesmal nicht der errechnete  $\Delta F_c$ -Wert, sondern der direkt vom Platten-Reader gemessene Wert *Ratio 665/620*. Somit konnten sämtliche Veränderungen der Resultate durch verschiedene Rechenschritte ausgeschlossen werden. Beim Intraplattentest für das lösliche Parkin zeigte sich für Probe 1 ein Variationskoeffizient von 7,39% (Abb. 3.2.6). Für Probe 2 ergab sich ein etwas geringerer Variationskoeffizient von 4,85%. Damit lagen die Variationskoeffizienten für beide Proben in einem sehr akzeptablen Bereich. Ähnliches galt für den Interplattentest für das lösliche Parkin (Abb. 3.2.7). Für Probe 1 ergab sich ein Variationskoeffizient von 6,30%. Der Variationskoeffizient für Probe 2 lag bei 5,39%. Somit waren auch die Variationskoeffizienten für beide Proben beim Interplattentest in einem sehr akzeptablen Bereich. Die Ergebnisse der beiden Tests ließen darauf schließen, dass Proben mit einer geringeren Parkin-Konzentration (im zuvor als optimal festgestellten Bereich) etwas zuverlässiger bestimmt werden konnten als Proben mit einer höheren Parkin-Konzentration.



**Abbildung 3.2.6:** Intraplattentest für das lösliche Parkin

Probe 1 entspricht dem kommerziell erworbenen Parkin in der Konzentration 75 pg/μl, Probe 2 dem kommerziell erworbenen Parkin in der Konzentration 5 pg/μl. Für beide Proben wurden 20 Messwerte auf derselben 384-Well-Platte erhoben. Die Messergebnisse für beide Proben variierten dabei zwischen 4,8 und 7,9%.

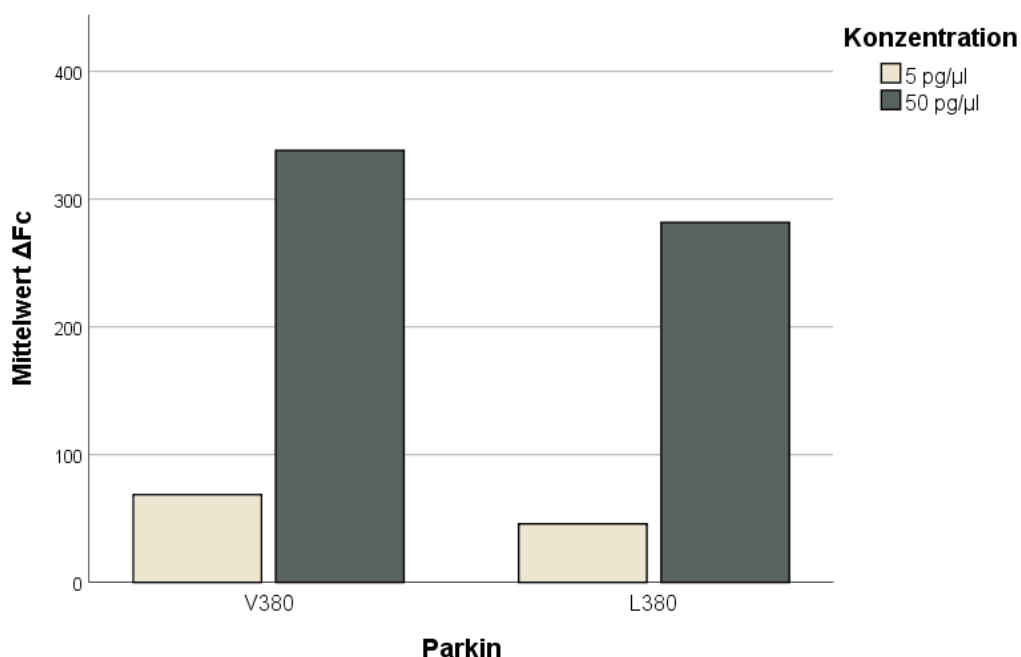


**Abbildung 3.2.7:** Interplattentest für das lösliche Parkin

Probe 1 entspricht dem kommerziell erworbenen Parkin in der Konzentration 75 pg/μl, Probe 2 dem kommerziell erworbenen Parkin in der Konzentration 5 pg/μl. Beide Proben wurden jeweils im Duplikat auf 8 verschiedenen 384-Well-Platten gemessen. Beide Variationskoeffizienten lagen zwischen 5 und 6,5%.

Die Bindung der Antikörper an das Protein ist für diesen Assay essenziell. Daher wurde überprüft, ob in der Literatur bekannte SNPs im *PRK2*-Gen (Diplomarbeit von J.J. Weber) eine Auswirkung auf die Bindungsfähigkeit der Antikörper und somit auf die Messergebnisse haben könnten. Der SNP G<sup>1239</sup>TA/C<sup>1239</sup>TA im *PRK2*-Gen sorgt dafür, dass bei der Translation ein Parkin Protein entsteht, bei dem die Aminosäure an Stelle 380 von Valin zu Leucin geändert wird (vgl. Abschnitt 1.5). Da sich diese Aminosäure zwischen den Bindungsstellen der beiden Antikörper Prk8-Tb (AS 399-465) und Parkin2-D2 (AS 250-350) (s. 2.2.5 Tab. 2.7) befindet, könnte eine mögliche Änderung der 3D-Struktur des Proteins,

zu einem Unterschied in der Bindungsfähigkeit der Antikörper am Parkin Protein führen. Um dies zu überprüfen, wurden Homogenate mit GST-Parkin V380- und L380-Fusionsproteinen hergestellt (s. 2.3.3.4). Diese Proteingemische wurden in den Konzentrationen 5 und 50 pg/μl im Duplikat in den TR-FRET-Assay eingesetzt. Dabei zeigten sich für das Parkin V380 (ohne den SNP) bei beiden Konzentrationen höhere Messwerte  $\Delta Fc$  als für das Parkin L380 (mit dem SNP) (Abb. 3.2.8). Bei einer Konzentration von 50 pg/μl erreichte das Parkin L380 nur 83,3% des Messwertes des Parkins V380. Bei einer Konzentration von 5 pg/μl waren es sogar nur 66,8%.



**Abbildung 3.2.8:** Vergleich Parkin V380 und L380 in den Konzentrationen 5 und 50 pg/μl

Das Parkin V380 mit der wildtypischen Variante zeigte in beiden untersuchten Konzentrationen höhere Messwerte  $\Delta Fc$  als das Parkin L380 mit dem SNP.

### 3.2.3 Etablierung des TR-FRET-Assays in CSF

Um ein solides Messverfahren zu entwickeln und etablieren, bedarf es einiger Gegebenheiten. Eine der Grundvoraussetzungen sind dabei Negativ- und Positivkontrollen, um sicher zu gehen, dass auch tatsächlich das gesuchte Protein detektiert wird. Beim TR-FRET-Assay zur Quantifizierung von Ataxin-3 und Parkin in PBMCs diente der Lysepuffer, mit dem die PBMCs lysiert wurden, als Negativkontrolle und eigens hergestellte Homogenate mit überexprimiertem Ataxin-3 bzw. kommerziell erworbenes Parkin als Positivkontrolle. Für die



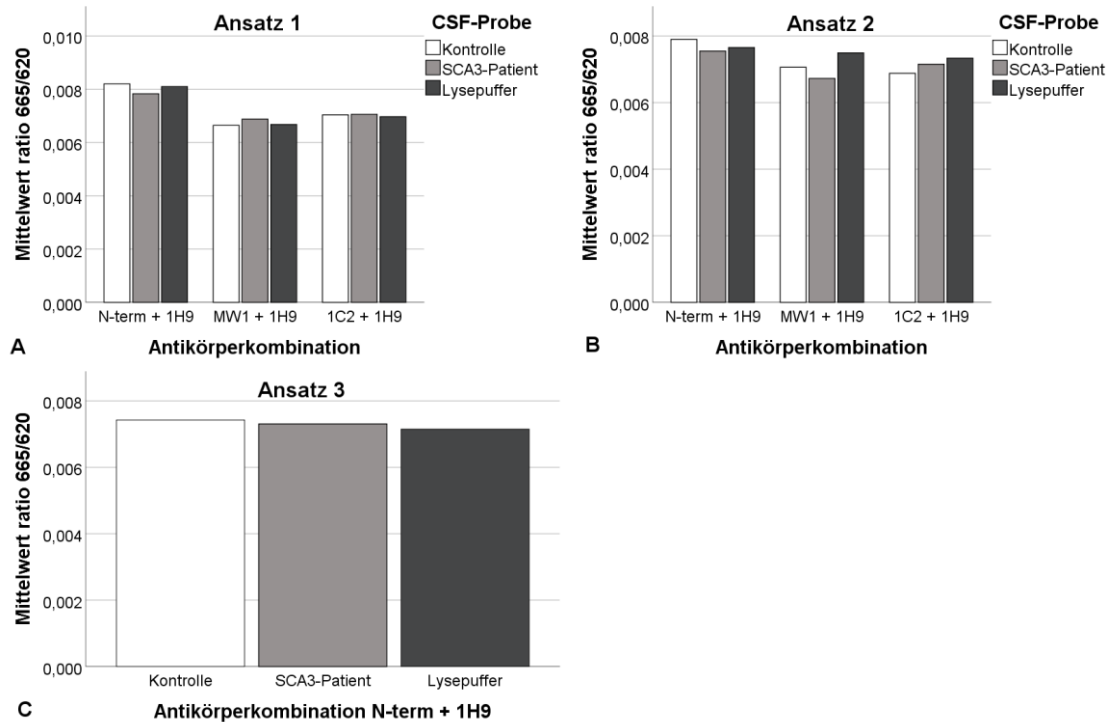
Messung der Proteine in CSF-Proben könnten die gleichen Positivkontrollen genutzt werden. Jedoch benötigte man eine andere Negativkontrolle, da die CSF-Proben nicht so vorbehandelt werden können wie die PBMCs. Ähnlich zu gefundenen Publikationen (Bidinosti et al, 2012; Wild et al., 2015) wurde versucht den CSF-Proben verschiedene Substanzen hinzuzufügen, um Zellen, die sich im CSF befanden, aufzuschließen und somit die zu messenden Proteine zugänglicher zu machen. Analog zum Lysepuffer bei den lysierten PBMCs könnten diese Substanzen danach als Negativkontrolle genutzt werden. Den CSF-Proben wurden IGEPAL, Triton-X 100, Tween 20 und *Complete Protease Inhibitor* in unterschiedlichen Kombinationen und Konzentrationen zugefügt. In Tabelle 3.1 wurden die drei unterschiedlichen Ansätze beschrieben.

**Tabelle 3.1:** Beschreibung der Ansätze

Ansatz	Menge	Material
1	0,2 %	IGEPAL
	1 %	Triton X-100
	1x	<i>Complete Protease Inhibitor</i>
2	10 %	Tween 20
	1x	<i>Complete Protease Inhibitor</i>
3	1 %	Tween 20
	1x	<i>Complete Protease Inhibitor</i>

Um zu überprüfen, ob diese Ansätze eine TR-FRET Messung im CSF von Patienten und Kontrollprobanden ermöglicht, wurden zunächst nur Messungen für Ataxin-3 durchgeführt. Dabei wurde die Antikörperkombination zur Bestimmung von *full-length* Ataxin-3 (N-term-Tb + 1H9-D2) und die beiden Antikörperkombinationen MW1-D2 + 1H9-Tb und 1C2-D2 und 1H9-Tb, die Frau Anna Kaucher in ihrer Dissertation zur Bestimmung des mutierten Ataxin-3 etablierte, verwendet. Die Ansätze wurden mit je einer CSF-Probe eines Kontrollprobanden und eines manifest erkrankten SCA3-Patienten hergestellt. Zusammen mit dem Lysepuffer, der bei den Messungen in PBMCs als Negativkontrolle genutzt wurde, wurden dann für die Ansätze 1 und 2 (Tab. 3.1) Messungen mit allen drei Antikörperkombinationen durchgeführt. Für den Ansatz 3 (Tab. 3.1) wurden lediglich mit der Antikörperkombination für das *full-length* Ataxin-3 Messungen durchgeführt. Hierbei wurde der vom Platten-Reader direkt

gemessene Wert *Ratio 665/620* angegeben, da der zur weiteren Berechnung notwendige Messwert (vgl. 2.3.3.2) einer Negativkontrolle nicht vorlag. Gemessen wurde jeweils zu sechs unterschiedlichen Zeitpunkten: direkt nach dem Pipettieren, nach 1 Stunde bei 4°C, nach 4,5 Stunden bei 4°C, nach 22 Stunden bei 4°C, nach 24 Stunden bei 4°C und nach einer weiteren Stunde bei Raumtemperatur (insgesamt also 25 Stunden) (analog zu den Studien in Daldin et al., 2017). Mit den unterschiedlichen Messzeitpunkten wurde überprüft, ob die Inkubationszeit zur Bindung der Antikörper am Protein oder die dabei herrschende Temperatur eine Auswirkung auf die Bindungsfähigkeit der Antikörper und damit auf die Messergebnisse hatten. Gezeigt werden die Ergebnisse der Messung nach 24 Stunden bei 4°C (Abb. 3.2.9). Die restlichen Messungen zeigten sehr ähnliche Ergebnisse, aus diesem Grund wurden diese Analysen hier nicht weiter aufgeführt. Bei keiner der beschriebenen Zugaben (Tab. 3.1) bzw. durchgeführten TR-FRET-Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Messergebnissen für die CSF-Proben und dem Lysepuffer, der kein Protein enthält, festgestellt werden. Teilweise waren die Messwerte für den Lysepuffer höher als die der CSF-Proben.



**Abbildung 3.2.9:** Messergebnisse der unterschiedlichen Ansätze

Bei keinem der Ansätze und bei keiner der Antikörperkombinationen konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den CSF-Proben und dem Lysepuffer, der kein Protein enthält, festgestellt werden. Teilweise war sogar der Messwert des Lysepuffers höher als der der CSF-Proben.

Daraufhin sollte eine passende Negativkontrolle etabliert werden. Wie bereits ähnlich in Bidinosti et al., 2012 durchgeführt, wurde versucht, einer *pooled human donor* CSF-Probe das zu messende Protein Ataxin-3 zu entfernen. Dabei wurden die Materialien des *Dynabeads Protein G Kits* und passende Antikörper verwendet, um gezielt Ataxin-3 aus der CSF-Probe zu entfernen. Dies wurde mit dem Ataxin-3 spezifischen Antikörper 1H9 versucht (s. 2.3.3.5). Das entstandene Produkt sollte danach als Negativkontrolle genutzt werden. Das Verfahren wurde insgesamt dreimal durchgeführt, da es keine Literatur hierzu gab und daher unklar war, welche Antikörper-Mengen, Inkubationszeiten zur Bindung der Antikörper an den Proteinen und Bindungsphasen der *Dynabeads* an den Antikörper-Protein-Komplexen am besten geeignet waren. Die Unterschiede in der drei Durchgänge wurden in Tabelle 3.2 aufgeführt.

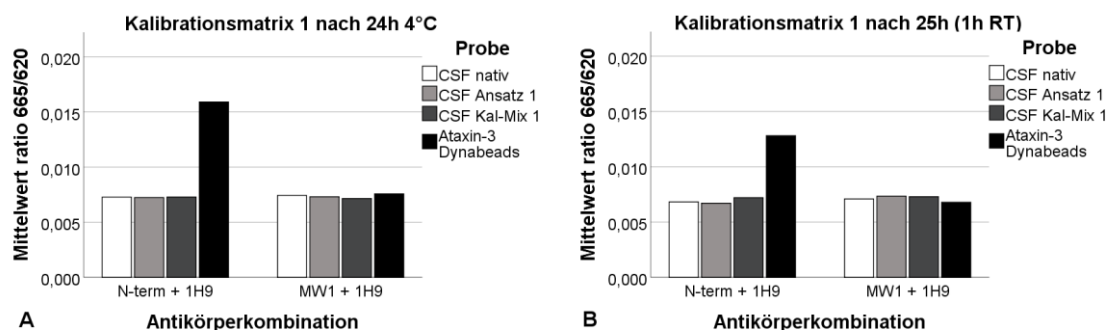
**Tabelle 3.2:** Unterschiede in der Durchführung des Verfahrens zur Herstellung einer CSF-Kalibrationsmatrix

Durchgang	Änderung
1	350 ng Antikörper 1H9
	90 min Inkubation zur Bindung der Antikörper
	15 µl <i>Dynabeads</i>
	30 min und 1 h Inkubation bei RT zur Bindung der <i>Dynabeads</i>
2	2 µg Antikörper 1H9
	120 min Inkubation zur Bindung der Antikörper
	50 µl <i>Dynabeads</i>
	30 min und 1 h Inkubation bei RT zur Bindung der <i>Dynabeads</i>
3	2 µg Antikörper 1H9
	24 h Inkubation zur Bindung der Antikörper
	50 µl <i>Dynabeads</i>
	4 h und 20 h Inkubation bei 4°C zur Bindung der <i>Dynabeads</i>

Die Produkte der drei Durchgänge werden im Folgenden Kalibrationsmatrix 1-3 genannt. Um zu überprüfen, ob einer dieser Kalibrationsmatrizes als Negativkontrolle im TR-FRET-Assay für CSF-Proben genutzt werden könnte, wurden verschiedene Messungen mit dem Platten-Reader durchgeführt. Es kamen, wie bei den Messungen der ersten drei Ansätze (Abb. 3.2.9), drei unterschiedliche Antikörperkombinationen zum Einsatz. Für die Kalibrationsmatrix 1 wurden Messungen mit den Antikörperkombinationen N-term + 1H9 (für *full-length* Ataxin-3) und MW1 + 1H9 (für expandiertes Ataxin-3) durchgeführt. Für die Messungen der Kalibrationsmatrizes 2 und 3 wurde noch die Antikörperkombination 1C2 + 1H9 (ebenfalls für expandiertes Ataxin-3) hinzugenommen. Es wurden 4 verschiedene Proben im Duplikat eingesetzt: eine native CSF-Probe, eine CSF-Probe, die wie Ansatz 1 (Tab. 3.1) behandelt wurde, die jeweilige Kalibrationsmatrix und das Ataxin-3, das beim jeweiligen Durchgang (Tab. 3.2) entfernt und anschließend aufkonzentriert wurde. Letzteres wurde mit in die Messungen aufgenommen, um nachzuweisen, dass in den CSF-Proben Ataxin-3 enthalten war und entfernt wurde. Die Messungen mit dem Platten-Reader wurden dabei zu mehreren Zeitpunkten durchgeführt. Für die Kalibrationsmatrix 1 wurde direkt nach der Zugabe der Antikörperkombinationen zu den verschiedenen Proben, nach 1 Stunde, 4,5 Stunden, 22 Stunden und 24 Stunden Inkubation bei 4°C sowie nach 1 weiteren Stunde bei Raumtemperatur (insgesamt 25 Stunden) gemessen. Für die Kalibrationsmatrizes 2 und 3 wurde

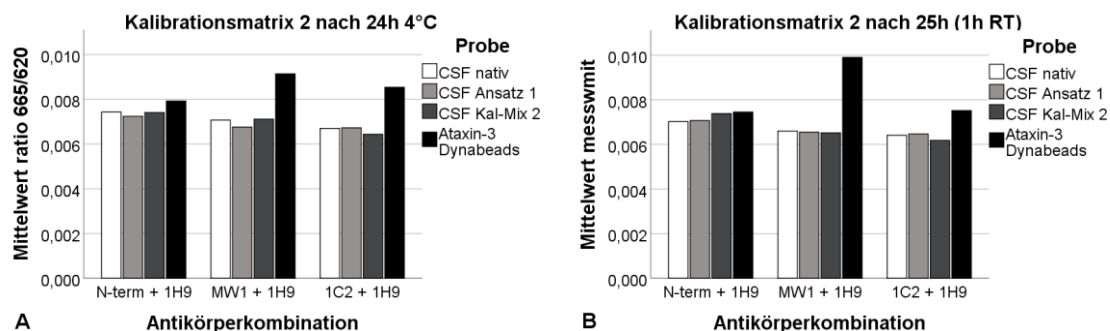
zusätzlich nach 3 weiteren Stunden bei Raumtemperatur (insgesamt 27 Stunden) gemessen

Gezeigt werden die Ergebnisse der Messung nach 24 Stunden Inkubation bei 4°C und der Messungen nach 1 weiteren Stunde bei Raumtemperatur (insgesamt 25 Stunden). Da die Messungen zu den anderen Zeitpunkten ähnliche Ergebnisse zeigten, wurde auf deren Darstellung verzichtet. Bei den Ergebnissen für die Kalibrationsmatrix 1 war unabhängig des Messzeitpunktes kein Unterschied zwischen den Messwerten der nativen CSF-Probe, der CSF-Probe, die wie Ansatz 1 (Tab. 3.1) behandelt wurden und der Kalibrationsmatrix 1 festzustellen (Abb. 3.2.10 A+B). Lediglich der Wert der Messung mit der Antikörperkombination N-term + 1H9 für das Ataxin-3, das mithilfe der *Dynabeads* aus der CSF-Probe entfernt wurde, war deutlich höher als der Messwert der anderen Proben. Dabei war der Messwert nach 24 Stunden wiederum etwas höher als der Messwert nach 25 Stunden mit einer Stunde bei Raumtemperatur. Die Ergebnisse für die Kalibrationsmatrizes 2 und 3 zeigten ein sehr ähnliches Bild (Abb. 3.2.11 und 3.2.12). Teilweise war der Messwert für die Kalibrationsmatrix, die als Negativkontrolle dienten und daher den geringsten Wert aufzeigen sollte, sogar höher als der Messwert für die native CSF-Probe bzw. die CSF-Probe, die wie Ansatz 1 (Tab. 3.1) behandelt wurde.



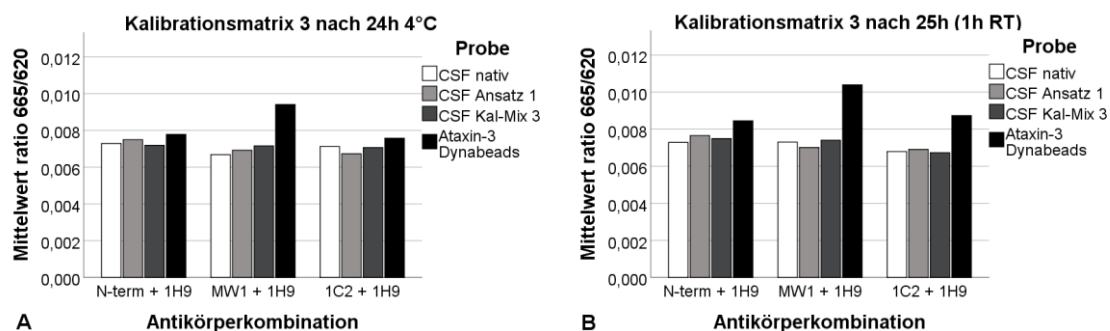
**Abbildung 3.2.10:** Ergebnisse für die Kalibrationsmatrix 1

Bei der Messung mit der Antikörperkombination N-term + 1H9 zeigte sich unabhängig des Messzeitpunktes ein deutlich höherer Messwert für das Ataxin-3, das mithilfe der *Dynabeads* aus der CSF-Probe entfernt wurde, als für die anderen Proben (CSF nativ, CSF behandelt wie Ansatz 1 (Tab. 3.1), CSF Kalibrationsmatrix 1). Dabei war der Messwert nach 24 Stunden Inkubation bei 4°C höher als der nach 1 weiteren Stunde bei Raumtemperatur (insgesamt 25 Stunden). Zwischen allen weiteren Messwerten ergaben sich keine Unterschiede.



**Abbildung 3.2.11: Ergebnisse für die Kalibrationsmatrix 2**

Der Messwert für das Ataxin-3, das mithilfe der *Dynabeads* aus der CSF-Probe entfernt wurde, war unabhängig des Messzeitpunktes und der Antikörperkombination am höchsten. Zwischen den Messergebnissen für die native CSF-Probe, die CSF-Probe, die wie Ansatz 1 (Tab. 3.1) behandelt wurde und die Kalibrationsmatrix 2 ergaben sich kaum Unterschiede. Teilweise war der Messwert der Kalibrationsmatrix 2, die als Negativkontrolle dienen sollte, höher als die Messwerte der anderen CSF-Proben.



**Abbildung 3.2.12: Ergebnisse für die Kalibrationsmatrix 3**

Zwischen den Messwerten für die native CSF-Probe, die CSF-Probe, die wie Ansatz 1 (Tab. 3.1) behandelt wurden und die Kalibrationsmatrix 3 waren keine Unterschiede festzustellen. Teilweise war der Messwert für die Kalibrationsmatrix 3, die als Negativkontrolle dienen und daher den geringsten Wert aufweisen sollte, sogar höher als der Messwert der nativen CSF-Probe. Der höchste Wert zeigte unabhängig des Messzeitpunktes und der Antikörperkombination die Probe mit dem Ataxin-3, das mittels der *Dynabeads* aus der CSF-Probe entfernt wurde.

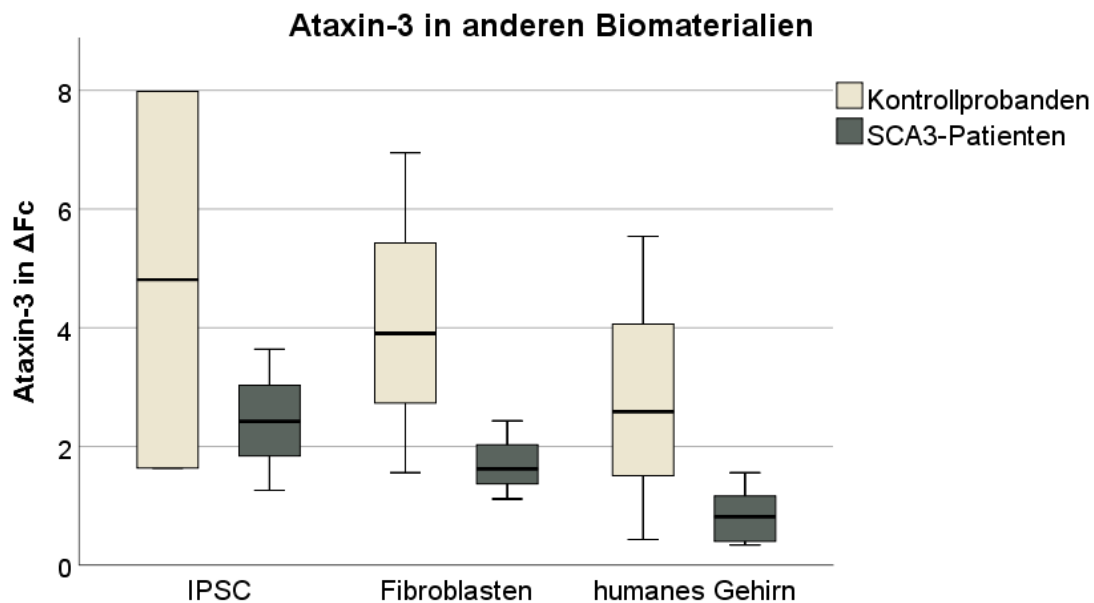
Diese Messergebnisse zeigten, dass keine der Kalibrationsmatrizes als Negativkontrolle für den TR-FRET-Assay dienen kann. Die teilweise deutlich höheren Messwerte für das Ataxin-3, das mithilfe der *Dynabeads* aus der CSF-Probe entfernt wurde, zeigten aber auch, dass Ataxin-3 aus der CSF-Probe entfernt wurde und dementsprechend in CSF enthalten sein muss. Jedoch scheint die Menge an löslichem Ataxin-3 in CSF-Proben zu gering zu sein, als dass sie mit dem TR-FRET-Assay in der bestehenden Form gemessen werden konnte.

### 3.2.4 TR-FRET-Assay in anderen Biomaterialien

Am Ende der Etablierungsarbeiten wurde überprüft, ob der TR-FRET-Assay grundsätzlich auch in anderen Biomaterialien anwendbar wäre. Dazu wurden *full-length* Ataxin-3 und Parkin in drei weiteren Biomaterialien (Induzierten pluripotenten Stammzellen (IPSC), Fibroblasten und humanem Hirngewebe) quantifiziert. Die Biomaterialien stammten nicht von Probanden des ESMI-Kollektivs, sondern von Probanden aus vorgehenden Studien, die im Institut durchgeführt wurden. Die Verfügbarkeit dieser Biomaterialien an unserem Institut war ein Grund, weshalb die Wahl auf diese drei Biomaterialien fiel. Es gab aber auch andere Gründe, weshalb diese Biomaterialien interessant für die Quantifizierung der beiden Proteine sein könnten. IPSCs könnten eine Rolle in möglichen Therapiekonzepten spielen. Fibroblasten sind zwar recht invasiv, aber auch einfach zu gewinnen und könnten somit als Biomaterial für Verlaufskontrollen genutzt werden. Dahingegen kann humanes Hirngewebe im Regelfall nur *post mortem* gewonnen werden. Jedoch könnte die Quantifizierung der Proteine in humanem Hirngewebe wichtige Erkenntnis über die Erkrankung liefern und dadurch mögliche Therapieansätze aufzeigen. Für die Messungen in IPSCs und Fibroblasten standen Proben von jeweils drei Kontrollprobanden und drei SCA3-Patienten zur Verfügung (Zur Verfügung gestellt von Prof. Ludger Schöls und Dr. Stefan Hauser, Neurologische Universitätsklinik, Tübingen). Für die Messungen in humanem Hirngewebe waren es drei Proben von Kontrollprobanden und sechs von SCA3-Patienten (Zur Verfügung gestellt von Eleonora Aronica, *Department of (Neuro-)Pathology, University of Amsterdam*). Die Proben wurden zunächst analog zu den PBMC-Proben mit Lysepuffer (2.2.4) versetzt, um die Zellen zu lysieren und die löslichen Proteine zugänglich zu machen. Dadurch konnte der Lysepuffer als Negativkontrolle verwendet werden. Die TR-FRET-Assays für die Quantifizierungen von *full-length* Ataxin-3 und Parkin wurden so angewendet, wie sie für die Messungen in PBMCs etabliert wurden.

*Full-length* Ataxin-3 konnte in IPSCs, Fibroblasten und humanem Hirngewebe nachgewiesen werden (Abb.3.2.13). Dabei war auffällig, dass der Proteingehalt in den drei Biomaterialien bei Kontrollprobanden höher war und stärker streute

als bei den SCA3-Patienten. Hierbei wurden diese Abweichungen nicht auf ihre Signifikanz geprüft, da die Anzahl der gemessenen Proben zu gering war.

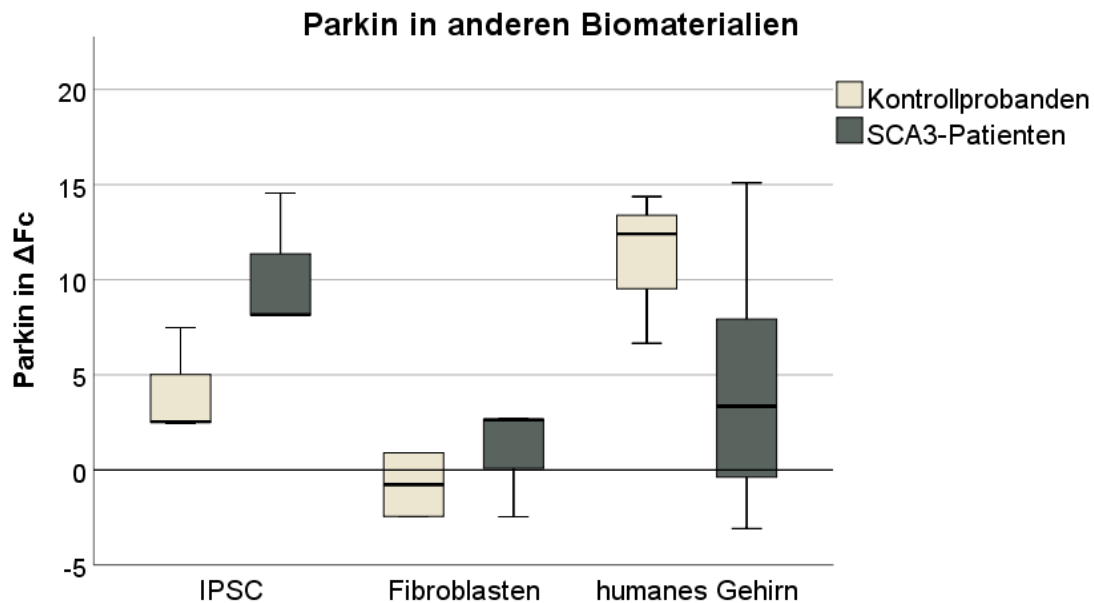


**Abbildung 3.2.13:** *full-length* Ataxin-3 in anderen Biomaterialien

In den drei aufgeführten Biomaterialien konnte *full-length* Ataxin-3 nachgewiesen werden. Dabei ergaben sich bei allen drei Biomaterialien höhere Messwerte für Kontrollprobanden als für SCA3-Patienten.

Bei der Quantifizierung von Parkin zeigten die Ergebnisse ein anderes Bild (Abb.3.2.14). Parkin konnte nur in IPSCs klar nachgewiesen werden. Dabei lagen die Messwerte für SCA3-Patienten über denen für Kontrollprobanden. Mit dem TR-FRET-Assay war es nicht möglich Parkin in Fibroblasten eindeutig zu detektieren. Die Messwerte lagen sowohl für Kontrollprobanden als auch für SCA3-Patienten nur knapp über null bzw. waren sogar negativ. In humanem Hirngewebe konnte Parkin bei Kontrollprobanden klar nachgewiesen werden. Bei den SCA3-Patienten gab es eine große Streuung der Messwerte von teilweise negativen bis hin zu deutlich positiven Werten.





**Abbildung 3.2.14:** Parkin in anderen Biomaterialien

Parkin konnte in iPSCs klar nachgewiesen werden. Dabei lagen die Messwerte für SCA3-Patienten über den für Kontrollprobanden. In Fibroblasten konnte Parkin nicht eindeutig detektiert werden. Sowohl für SCA3-Patienten als auch für Kontrollprobanden ergaben sich teilweise sogar negative Werte. In humanem Hirngewebe von Kontrollprobanden konnte Parkin klar nachgewiesen werden. Bei SCA3-Patienten ergaben sich klar positive, aber auch teilweise negative Werte.

Aufgrund der geringen Anzahl an gemessenen Proben wurde bei diesen Untersuchungen keine statistische Analyse durchgeführt. Jedoch wurden vor allem für die Messungen von löslichem *full-length* Ataxin-3 in allen drei Biomaterialien und für die Messungen von löslichem Parkin in iPSCs interessante Tendenzen und Ansätze gezeigt, die in weiterführenden Arbeiten aufgegriffen werden könnten.

### 3.3 Ergebnisse der statistischen Auswertung

#### 3.3.1 Übersicht der ESMI-Kohorte

Für diese Arbeit konnte von 98 Probanden aus vier verschiedenen Zentren (Bonn, Coimbra, London und Tübingen) ein vollständiger Datensatz (mit allen benötigten klinischen Parametern) und Probenmaterial gesammelt werden. Zusätzlich konnte durch die Hilfe der Universitätsklinik Heidelberg ein homozygoter Patient in die Studie aufgenommen werden. In der Tabelle 3.3 ist eine Übersicht über die Kohorte dargestellt, aus der die Mittelwerte (M) (mit Standardabweichung (SD)) der Gruppen (Kontrollen, präataktische

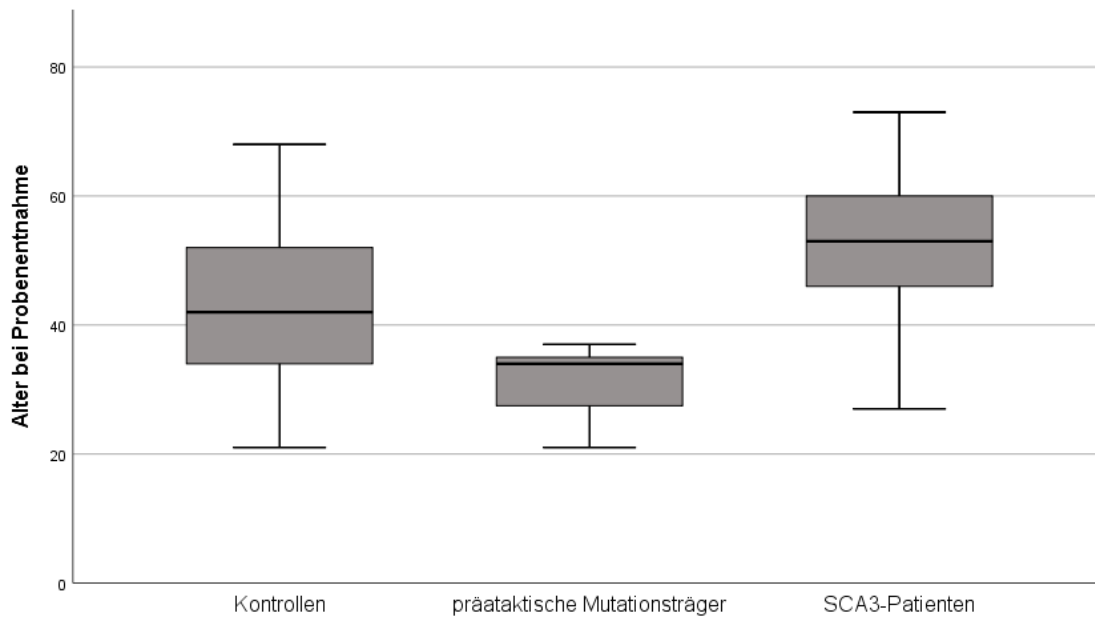
Mutationsträger und SCA3-Patienten) für die erhobenen klinischen Parameter hervorgehen. Dabei wurde der homozygote Patient in einer separaten Spalte aufgeführt.

**Tabelle 3.3:** Übersicht über die Kohorte

Bei Alter bei Probenentnahme, Alter bei Erkrankungsbeginn, CAG-Wiederholungen, SARA-Score, INAS-Score und CSDP-Score ist jeweils der Mittelwert der Gruppen und in Klammern die Standardabweichung angegeben.

	Kontrollen	Präataktische Mutationsträger	SCA3-Patienten	Homozygoter Patient
Anzahl	29	8	60	1
Anzahl nach Geschlecht	♀12 ♂17	♀6 ♂2	♀34 ♂26	♂
Alter bei Probenentnahme in Jahren	42 (12,3)	31 (5,8)	52 (10,1)	46
Alter bei Erkrankungsbeginn in Jahren	-	-	40 (10,1)	30
CAG-Wiederholungen normal / mutiert	24 (3,6) / -	20 (6,6) / 70 (1,4)	22 (5,1) / 69 (4,1)	60/66
SARA-Score	0,5 (0,6)	1 (0,8)	16 (8,4)	23
INAS-Score	1 (0,8)	2 (1,6)	6 (2,5)	8
CSDP-Score	-	-	1,47 (0,74)	1,44

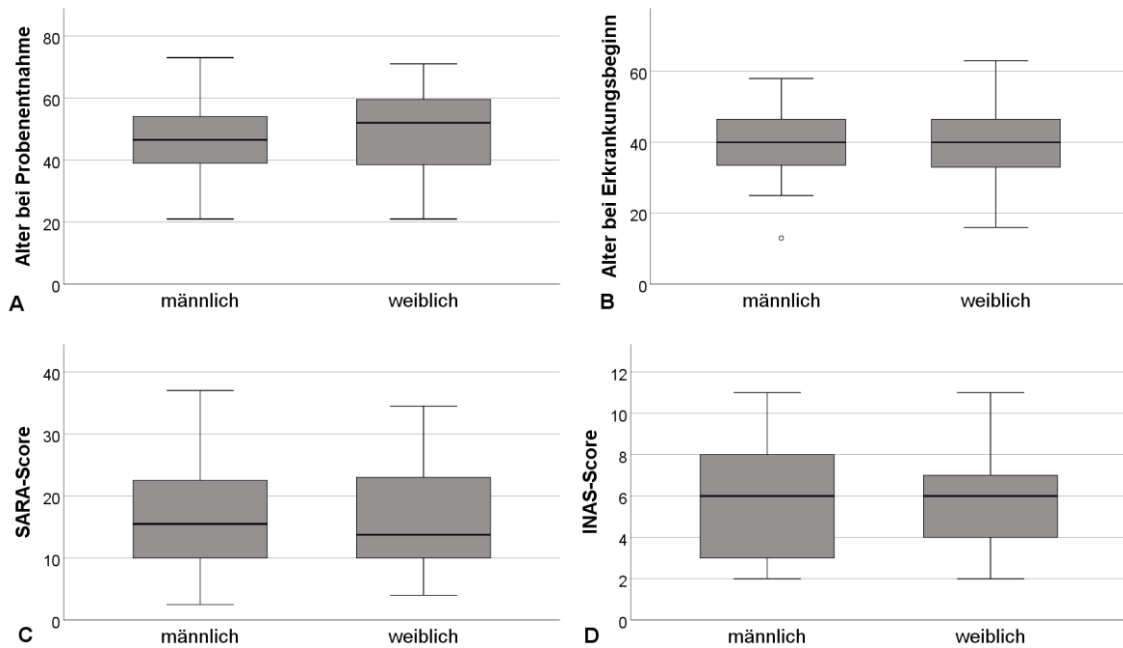
Die Kontrollprobanden waren im Durchschnitt signifikant 10 Jahre jünger als die SCA3-Patienten ( $p < 0,0001$ ). Die präataktischen Mutationsträger waren wiederum durchschnittlich signifikant 11 Jahre jünger als die Kontrollprobanden ( $p = 0,02$ ) und wurden größtenteils als direkte Verwandte von erkrankten Personen rekrutiert. Die Abweichung von 21 Jahren zwischen den SCA3-Patienten und den präataktischen Mutationsträgern war ebenfalls statistisch signifikant ( $p < 0,0001$ ) (Tab. 3.3, Abb. 3.3.1).



**Abbildung 3.3.1:** Alter bei Probenentnahme bei unterschiedlichem Erkrankungsstatus

Die SCA3-Patienten waren bei der Probenentnahme im Durchschnitt mit 52 Jahren am ältesten. Der Unterschied von SCA3-Patienten zu den Kontrollprobanden (M=42) und den präataktischen Mutationsträgern (M=31) war dabei statistisch signifikant (beide  $p < 0,0001$ ). Zwischen den Kontrollen und den präataktischen Mutationsträgern war die Abweichung ebenfalls signifikant ( $p = 0,02$ ). M=Mittelwert

Um auszuschließen, dass grundlegende Gegebenheiten wie das Geschlecht oder das Zentrum, das die Probanden erfasst hatte, einen Einfluss auf die erhobenen klinischen Parameter hatten, wurden die Daten zunächst dahingehend analysiert. Es gab keine signifikanten Unterschiede beim Alter bei Probenentnahme zwischen weiblichen und männlichen Probanden (Abb. 3.3.2 A). Das Gleiche galt für das Alter bei Erkrankungsbeginn (Abb. 3.3.2 B). Bei den Ergebnissen der klinischen Tests SARA und INAS gab es ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Geschlechtern (Abb. 3.3.2 C+D). Bei den Diagrammen zu Alter bei Erkrankungsbeginn, SARA- und INAS-Score wurden nur die Werte von manifest erkrankten SCA3-Patienten in die Auswertung einbezogen. Demzufolge konnten die erhobenen klinischen Parameter in den folgenden Analysen vom Geschlecht unabhängig miteinander verglichen werden.



**Abbildung 3.3.2:** Verschiedene klinische Parameter bei unterschiedlichem Geschlecht

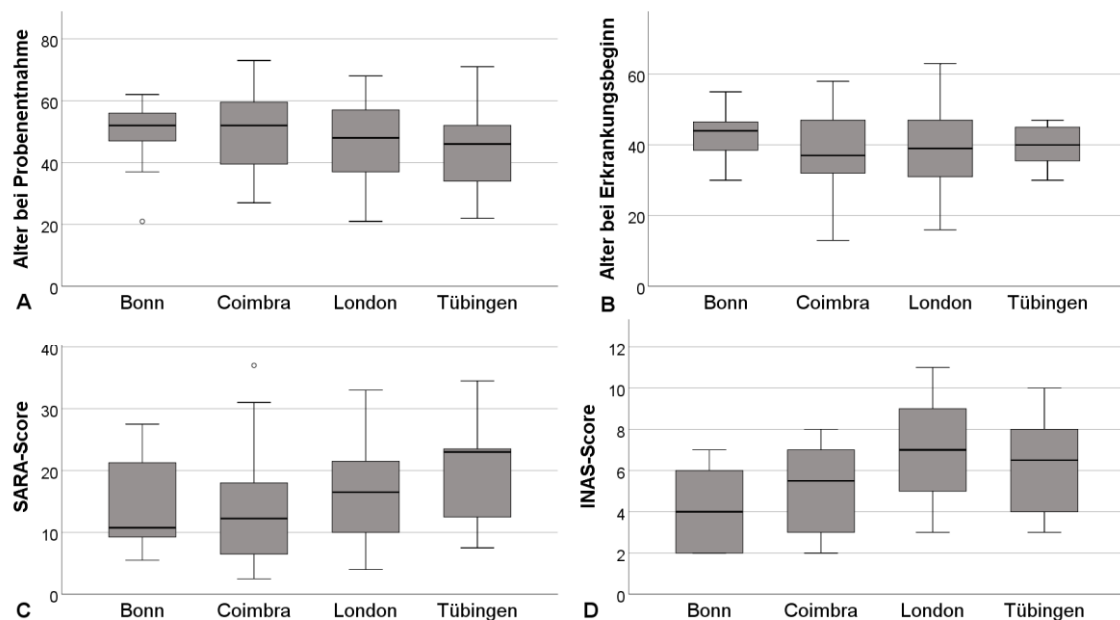
Das Geschlecht hatte in dieser Kohorte keinen Einfluss auf die erhobenen klinischen Parameter. Der Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Probanden beim Alter bei Probenentnahme (A) und bei Erkrankungsbeginn (B) war nicht signifikant. Ebenfalls gab es keine signifikanten Abweichungen zwischen den Geschlechtern bei den klinischen Tests SARA (C) und INAS (D).

**Tabelle 3.4:** Übersicht über die Anzahl der Probanden eingeteilt nach erfassenden Zentren

	Kontrollen	Präataktische Mutationsträger	SCA3-Patienten	gesamt
Bonn	5	2	12	19
Coimbra	1	0	18	19
London	12	3	24	39
Tübingen	11	3	7	21
gesamt	29	8	61	98

Die Übersicht aus Tabelle 3.4 zeigte die Aufteilung der Probandenanzahl nach in ESMI beteiligten und Patienten rekrutierenden Zentren. In London wurden die meisten Probanden rekrutiert (n=39). In Bonn (n=19), Coimbra (n=19) und Tübingen (n=21) wurden, zum Zeitpunkt dieser Arbeit, deutlich weniger Probanden erfasst. Die Probanden aus Bonn und London zeigten ein ähnliches Verteilungsmuster auf die Gruppen Kontrollen, präataktische Mutationsträger und SCA3-Patienten. In Tübingen überwiegen die Kontrollen, wohingegen in Coimbra, abgesehen von einer Kontrolle, nur SCA3-Patienten erfasst wurden.

Bei der Analyse der erhobenen klinischen Parameter eingeteilt nach den erfassenden Zentren gab es signifikante Unterschiede bei einem klinischen Score. Beim Vergleich des INAS-Scores eingeteilt nach den erfassenden Zentren (Abb. 3.3.3 D) zeigten die SCA3-Patienten aus London signifikant höhere Werte als die Patienten aus Bonn ( $p=0,001$ ) und Coimbra ( $p=0,01$ ). Die Abweichung beim INAS-Score zwischen den SCA3-Patienten aus London und Tübingen war nicht signifikant. Ebenfalls nicht signifikant waren die Unterschiede beim Alter bei Probenentnahme, bei Erkrankungsbeginn und beim SARA-Score eingeteilt nach den erfassenden Zentren (Abb. 3.3.3 A-C). Aufgrund der relativ kleinen Kohortenstärke ( $n=98$ ) gab es auch eine dementsprechend geringe Anzahl an SCA3-Patienten ( $n=61$ ).



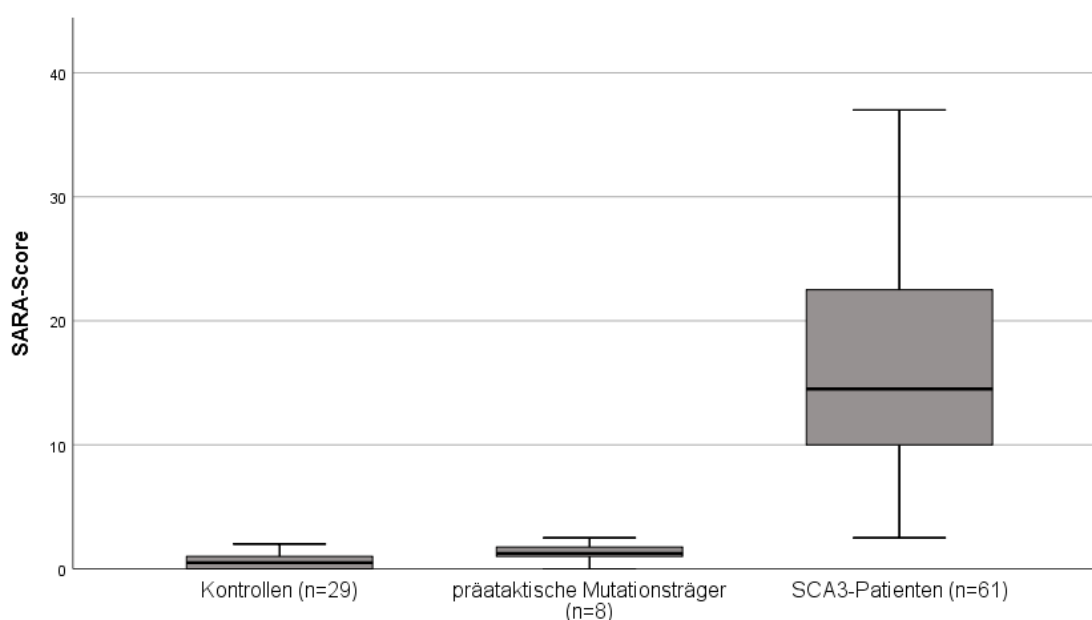
**Abbildung 3.3.3:** Verschiedene klinische Parameter bei unterschiedlichen erfassenden Zentren

Bei Alter bei Probenentnahme (A), Alter bei Erkrankungsbeginn (B) und SARA-Score (C) gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den erfassenden Zentren. Beim INAS-Score zeigten sich jedoch Unterschiede. SCA3-Patienten, erfasst in London, hatten einen signifikant höheren INAS-Score als Patienten, erfasst in Bonn ( $p=0,001$ ) und in Coimbra ( $p=0,01$ ). Die Abweichung beim INAS-Score zwischen den SCA3-Patienten aus London und Tübingen war nicht signifikant.

Durch den weiteren Vergleich der verschiedenen klinischen Parameter untereinander ließen sich bereits in der Literatur bekannte Zusammenhänge bestätigen, aber auch neue Korrelationen herleiten.

Der Erkrankungsbeginn der SCA3 wird zurzeit am Symptombeginn und den Einschränkungen, die der Patient dadurch empfindet, festgemacht. Daher spielt

der klinische Test SARA dabei eine große Rolle. Ab einem SARA-Score von 3 oder höher gilt eine Person als manifest erkrankt. Erwartungsmäßig zu bestätigen war daher der Zusammenhang zwischen SARA-Score und dem Erkrankungsstatus der Probanden (Abb. 3.3.4). Der SARA-Score bei manifest erkrankten SCA3-Patienten ( $M=16$  ( $SD=8,4$ )) zeigte signifikant höhere Werte sowohl im Vergleich zu den Werten der Kontroll-Gruppe ( $M=0,5$  ( $SD=0,6$ )) als auch zu den der präataktischen Mutationsträger ( $M=1$  ( $SD=0,8$ )) (beide  $p<0,0001$ ). Es konnte auch gezeigt werden, dass in unserer analysierten Kohorte der Unterschied zwischen dem SARA-Score der Kontroll-Gruppe und der präataktischen Mutationsträger ebenfalls signifikant war ( $p=0,005$ ).

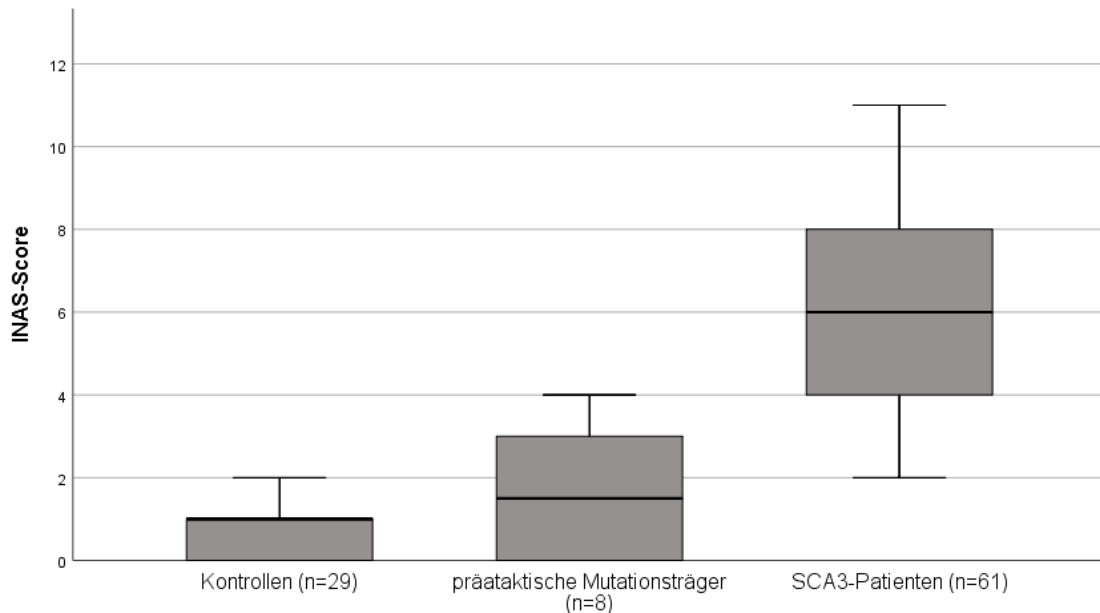


**Abbildung 3.3.4:** SARA-Score bei unterschiedlichem Erkrankungsstatus

Der SARA-Score bei ataktischen SCA3-Patienten zeigte signifikante Abweichungen zum SARA-Score der Kontrollen und der präataktischen Mutationsträger (beide  $p<0,0001$ ). Auch der SARA-Score der Kontrollen war signifikant kleiner als der der untersuchten präataktischen Mutationsträger ( $p=0,005$ ).

Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der Betrachtung des klinischen Test INAS eingeteilt in Kontrollen, präataktischen Mutationsträgern und SCA3-Patienten (Abb. 3.3.5). Auch hier war die Abweichung des INAS-Scores der SCA3-Patienten zu den der Kontrollen und präataktischen Mutationsträgern signifikant höher (beide  $p<0,0001$ ). Hier zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied

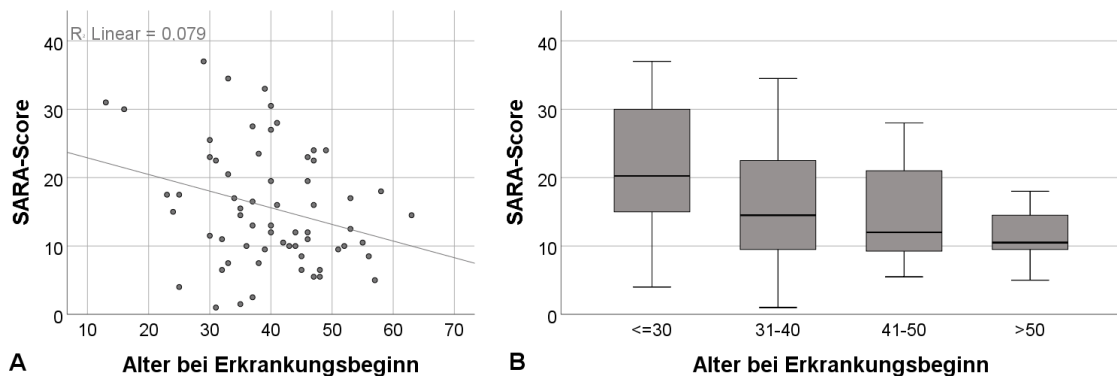
zwischen den Score-Werten der Kontrollen und den Score-Werten der präataktischen Mutationsträger ( $p=0,062$ ).



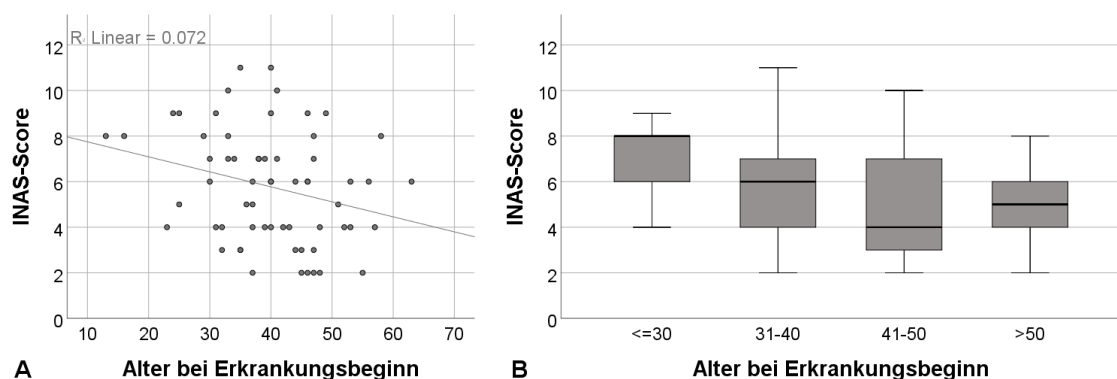
**Abbildung 3.3.5:** INAS-Score bei unterschiedlichem Erkrankungsstatus

Manifest erkrankte SCA3-Patienten zeigten einen signifikant höheren INAS-Score als Kontrollprobanden und präataktische Mutationsträger (beide  $p<0,0001$ ). Der Unterschied zwischen dem INAS-Score bei Kontrollen und präataktischen Mutationsträgern zeigte eine Tendenz zu höheren INAS Scores in präataktischen Mutationsträgern über Kontrollen ( $p=0,062$ ).

Betrachtete man die ataktischen SCA3-Patienten genauer, ließen sich weitere Zusammenhänge und Tendenzen darstellen. So konnte der Vergleich des SARA-Scores mit dem Alter bei Erkrankungsbeginn (AAO) zeigen, dass früher erkrankte SCA3-Patienten tendenziell stärker betroffen waren. Die Steigung der Regressionsgeraden ( $r^2=0,079$ ) deutete dabei jedoch nur eine schwache inverse Korrelation an (Abb. 3.3.6 A). Eingeteilt in Alter bei Erkrankungsbeginn  $\leq 30$ , 31-40, 41-50 und  $>50$  Jahre waren die Unterschiede beim SARA-Score in dieser Kohorte aber nicht signifikant (Abb. 3.3.6 B). Diese Tendenz ließ sich durch den Vergleich des INAS-Score mit dem Alter bei Erkrankungsbeginn zusätzlich bestätigen. Die inverse Korrelation ( $r^2=0,072$ ) war ähnlich schwach zwischen diesen Parametern (Abb. 3.3.7 A). Auch hier waren bei der gleichen Gruppeneinteilung wie beim Vergleich von SARA-Score mit AAO keine signifikanten Abweichungen festzustellen (Abb. 3.3.7 B).



**Abbildung 3.3.6:** Vergleich SARA-Score mit Alter bei Erkrankungsbeginn  
 Beim Vergleich des SARA-Score mit dem Alter bei Erkrankungsbeginn ergab sich eine schwache Tendenz für eine inverse Korrelation zwischen den beiden Messgrößen (A). Eingeteilt in Alter bei Erkrankungsbeginn  $\leq 30$ , 31-40, 41-50 und  $> 50$  Jahren (B) zeigte sich, dass früher erkrankte SCA3-Patienten tendenziell stärker betroffen waren. Jedoch gab es keine signifikanten Unterschiede.

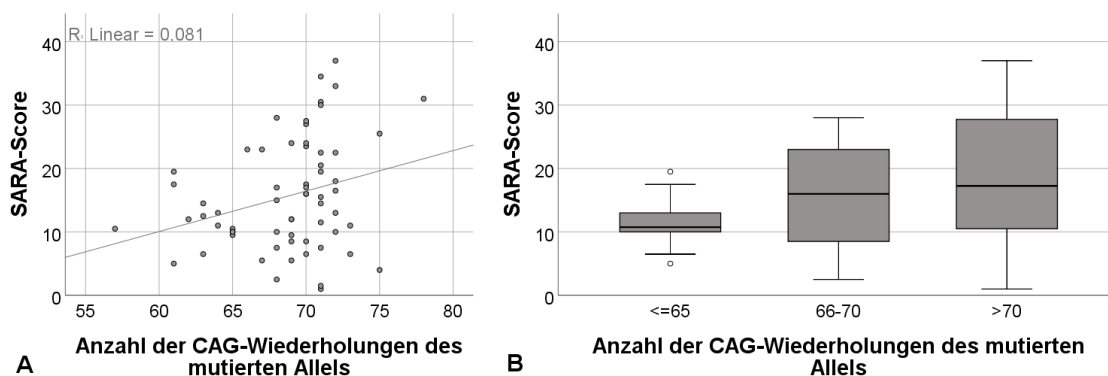


**Abbildung 3.3.7:** Vergleich INAS-Score mit Alter bei Erkrankungsbeginn  
 eingeteilt in AAO  $\leq 30$ , 31-40, 41-50 und  $> 50$  Jahren  
 Beim Vergleich des INAS-Score mit dem Alter bei Erkrankungsbeginn zeigte sich eine schwache inverse Korrelation zwischen den beiden Parametern (A). Eingeteilt in AAO  $\leq 30$ , 31-40, 41-50 und  $> 50$  Jahren zeigte sich ebenfalls die Tendenz, dass frühzeitig erkrankte SCA3-Patienten höhere INAS-Scores aufwiesen. Diese Abweichungen waren nicht statistisch signifikant.

Des Weiteren zeigte sich beim Vergleich des SARA-Scores und des INAS-Scores mit der Anzahl an CAG-Wiederholungen im mutierten Allel (mutCAG-Anzahl), dass SCA3-Patienten mit einer höheren mutCAG-Anzahl schwerer erkrankt waren als SCA3-Patienten mit einer niedrigeren mutCAG-Anzahl. Die Steigung der Regressionsgeraden ( $r^2=0,081$ ) zeigte eine schwache lineare Korrelation zwischen dem SARA-Score und der mutCAG-Anzahl (Abb. 3.3.8 A). Eine stärkere aber dennoch schwache lineare Korrelation zwischen dem INAS-Score und der mutCAG-Anzahl wurde durch die Steigung der Regressionsgeraden ( $r^2=0,105$ ) in Abbildung 3.3.9 A festgestellt. Eingeteilt in

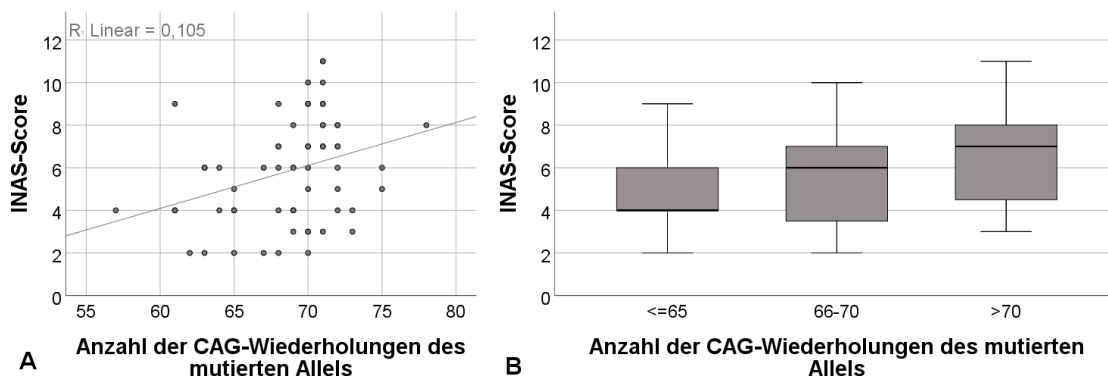


Gruppen nach der mutCAG-Anzahl in mutCAG-Anzahl  $\leq 65$ , 66-70 und  $>70$  waren die Tendenzen für den SARA- und den INAS-Score ebenfalls zu erkennen (Abb. 3.3.8 B + 3.3.9 B). Jedoch waren in beiden Vergleichen keine signifikanten Unterschiede nachweisbar.



**Abbildung 3.3.8:** Vergleich SARA-Score mit der mutCAG-Anzahl eingeteilt in mutCAG-Anzahl  $\leq 65$ , 66-70 und  $>70$

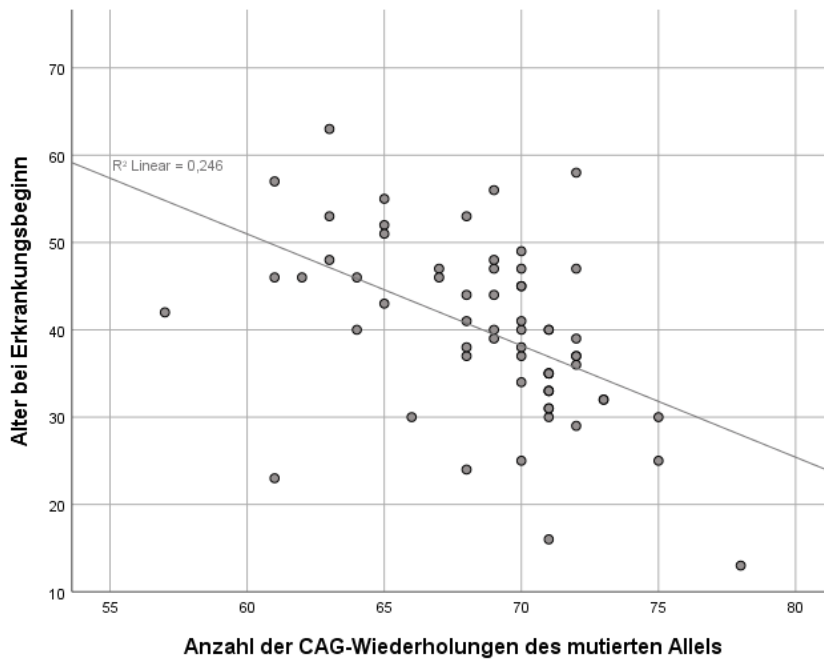
Der SARA-Score stieg tendenziell mit ebenfalls steigender mutCAG-Anzahl an. Jedoch konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen nachgewiesen werden. Die kleinen Kreise in der Abbildung stehen für Ausreißer, die außerhalb des Zweifachen der Standardabweichung liegen.



**Abbildung 3.3.9:** Vergleich INAS-Score mit der mutCAG-Anzahl eingeteilt in mutCAG-Anzahl  $\leq 65$ , 66-70 und  $>70$

Bei steigender mutCAG-Anzahl stieg auch der INAS-Score tendenziell an. Die Unterschiede waren nicht statistisch signifikant.

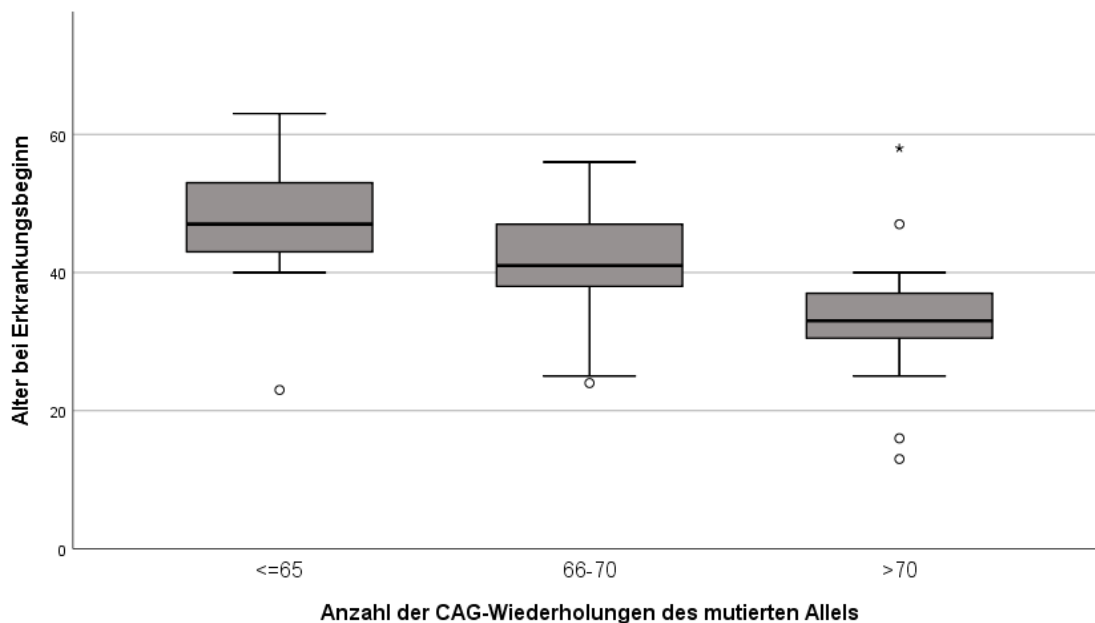
Ein weiterer Zusammenhang war beim Vergleich des Alters bei Erkrankungsbeginn (AAO) mit der jeweiligen mutCAG-Anzahl (Abb. 3.3.10) zu finden. Es zeigte sich eine klare Tendenz dahingehend, dass Patienten mit einer höheren mutCAG-Zahl früher erkrankten als Patienten mit einer niedrigeren mutCAG-Zahl. Die Steigung der Regressionsgeraden ( $r^2 = -0,246$ ) deutete eine tendenzielle inverse Korrelation zwischen diesen beiden Messgrößen an.



**Abbildung 3.3.10: Vergleich AAO mit der mutCAG-Anzahl**

Beim Vergleich des Erkrankungsbeginns mit der mutCAG-Anzahl in allen Mutationsträgern konnte eine inverse Korrelation festgestellt werden.

Teilte man die manifest erkrankten SCA3-Patienten nach der mutCAG-Anzahl in Gruppen ein, ließ sich diese Tendenz bestätigen (Abb. 3.3.11). Patienten mit einer mutCAG-Anzahl von 65 oder weniger erkrankten im Durchschnitt im Alter von 47,5 Jahren (SD=9,46), wohingegen Patienten mit einer mutCAG-Anzahl von 66 bis 70 bei Beginn der Erkrankung im Mittel 41,4 Jahre (SD=7,72) alt waren. Die Gruppe der Patienten mit einer mutCAG-Anzahl von über 70 erkrankte sogar bereits durchschnittlich mit 33,6 Jahren (SD=8,84). Diese Unterschiede waren statistisch signifikant ( $\leq 65$  zu 66-70:  $p=0,036$ ; 66-70 zu  $>70$ :  $p=0,02$ ;  $\leq 65$  zu  $>70$ :  $p=0,0001$ ).

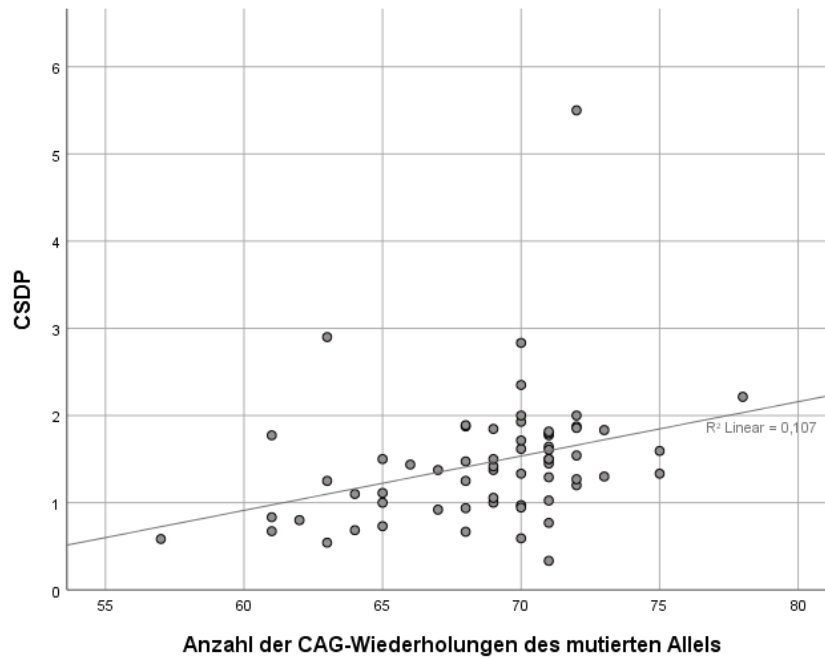


**Abbildung 3.3.11:** Vergleich AAO mit mutCAG-Anzahl eingeteilt in Gruppen mit mutCAG-Anzahl  $\leq 65$ , 66-70 und  $>70$

Es konnte festgestellt werden, dass mit steigender mutCAG-Anzahl das Alter bei Erkrankungsbeginn sank. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen waren statistisch signifikant ( $\leq 65$  zu 66-70:  $p=0,036$ ; 66-70 zu  $>70$ :  $p=0,02$ ;  $\leq 65$  zu  $>70$ :  $p=0,0001$ ). Die kleinen Kreise stehen für Ausreißer außerhalb des Zweifachen, die kleinen Sterne für Ausreißer außerhalb des Dreifachen der Standardabweichung.

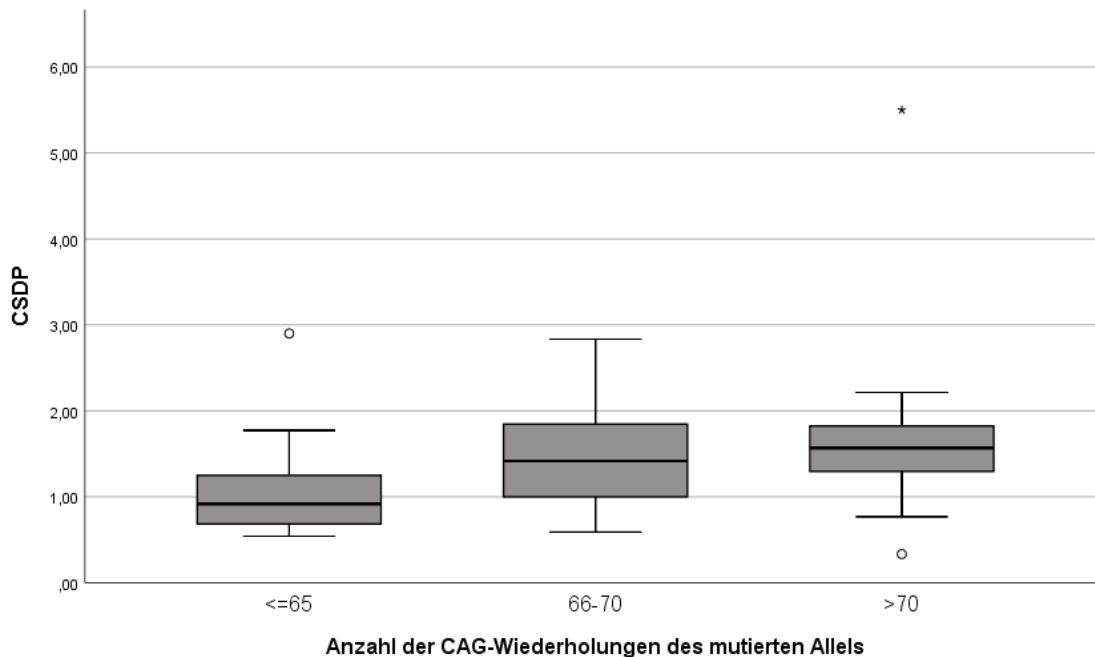
Ein umgekehrtes Bild erhielt man, wenn man den *cross-sectional diseases progress* (CSDP), also den individuellen Erkrankungsfortschritt pro Jahr, mit der mutCAG-Zahl verglich. Der CSDP wurde errechnet, indem der SARA-Score durch die Erkrankungsdauer in Jahren geteilt wurde. Die individuellen Werte dieses Parameters betrachtet, zeigten eine Steigerung des CSDP-Scores bei steigender mutCAG-Anzahl (Abb. 3.3.12), was bedeutete, dass SCA3-Patienten mit einer höheren Anzahl an CAG-Wiederholungen im mutierten Allel einen schnelleren Krankheitsprogress zeigten. Die Regressionsgerade ( $r^2=0,107$ ) zeigte eine tendenziell lineare Korrelation beim Vergleich von CSDP und der mutCAG-Anzahl. Der Blick auf die gleiche Gruppeneinteilung wie beim Vergleich von AAO und mutCAG-Anzahl lieferte mit einer steigenden mutCAG-Anzahl eine schnellere jährliche Krankheitsprogression (Abb. 3.3.13), jedoch war dabei nur die Abweichung zwischen der Patientengruppe mit einer mutCAG-Anzahl von  $\leq 65$  und der mit einer mutCAG-Anzahl von  $>70$  statistisch signifikant ( $p=0,049$ ). Die Mittelwerte (M) des CSDP-Scores waren für die einzelnen Gruppen

M(mutCAG-Anzahl  $\leq 65$ )=1,11 (SD=0,63), M(mutCAG-Anzahl 66-70)=1,45 (SD=0,53) und M(mutCAG-Anzahl  $>70$ )=1,67 (SD=0,91).



**Abbildung 3.3.12: Vergleich CSDP mit der mutCAG-Anzahl**

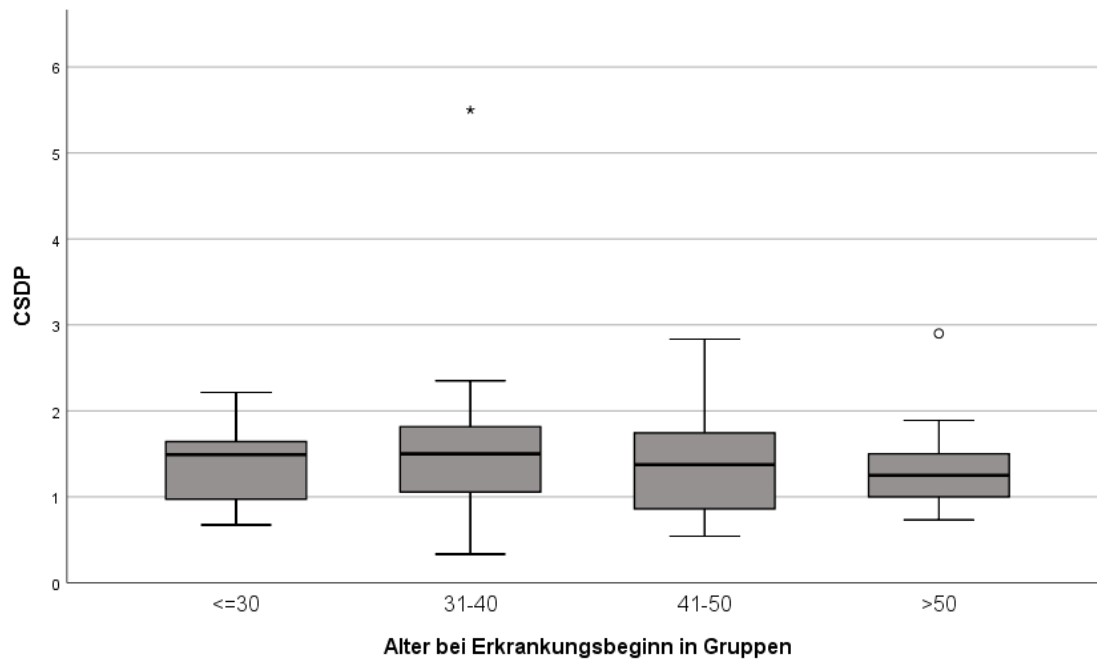
Die Analyse der individuellen Progression in Bezug auf die Anzahl der CAG-Wiederholungen im mutierten Allel zeigte, dass bei steigender mutCAG-Zahl auch der CSDP-Score anstieg.



**Abbildung 3.3.13:** Vergleich CSDP mit der mutCAG-Anzahl eingeteilt in mutCAG-Anzahl  $\leq 65$ , 66-70 und  $> 70$

Je höher die mutCAG-Anzahl, desto schneller war die individuelle jährliche Krankheitsprogression und damit der errechnete CSDP-Score. Der Unterschied zwischen den Gruppen mit einer mutCAG-Anzahl von  $\leq 65$  und  $> 70$  war statistisch signifikant ( $p=0,049$ ). Die kleinen Kreise stehen für Ausreißer außerhalb des Zweifachen, die kleinen Sterne für Ausreißer außerhalb des Dreifachen der Standardabweichung.

Der Vergleich von CSDP und AAO (Abb. 3.3.14) ergab bei der statistischen Auswertung keine Veränderungen zwischen den analysierten Gruppen. Vergleicht man den CSDP-Score mit dem AAO eingeteilt in  $\leq 30$ , 31-40, 41-50 und  $> 50$  Jahre, zeigten sich keine Unterschiede. Damit konnte ein Einfluss des AAO auf den CSDP-Score in dieser Kohorte ausgeschlossen werden.



**Abbildung 3.3.14: Vergleich CSDP mit AAO**

Auf der X-Achse ist das AAO, auf der Y-Achse der CSDP-Score aufgetragen. Zwischen den analysierten Gruppen zeigten sich keine Unterschiede. Die kleinen Kreise stehen für Ausreißer außerhalb des Zweifachen, die kleinen Sterne für Ausreißer außerhalb des Dreifachen der Standardabweichung.

**Tabelle 3.5: Zusammenfassung der Ergebnisse aus Abschnitt 3.3.1**

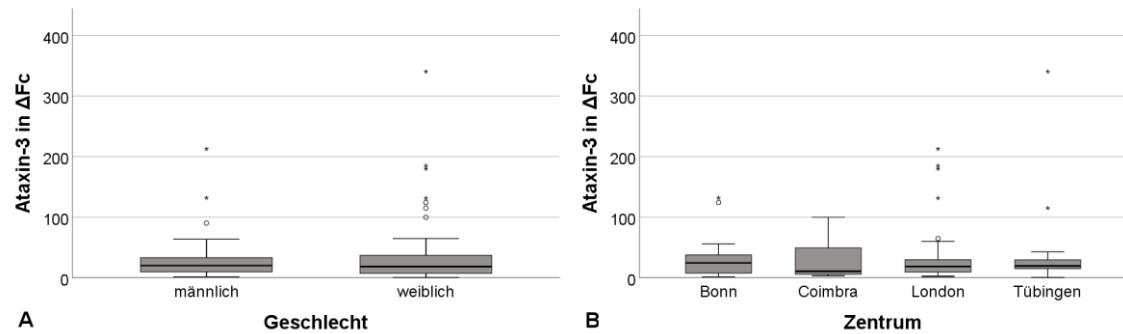
Klinische Parameter	Ergebnis
Alter bei Probenentnahme	Präataktische Mutationsträger durchschnittlich 11 Jahre jünger als Kontrollprobanden, Kontrollprobanden im Durchschnitt 10 Jahre jünger als ataktische SCA3-Probanden
Geschlecht	Kein geschlechtsspezifischer Einfluss auf erhobene klinische Parameter
Erfassende Zentren	INAS-Score bei ataktischen SCA3-Patienten aus London signifikant höher als bei ataktischen SCA3-Patienten aus Bonn und Coimbra
SARA-Score	SARA-Score bei ataktischen SCA3-Patienten signifikant höher als bei Kontrollprobanden und präataktischen Mutationsträgern, SARA-Score bei präataktischen Mutationsträgern signifikant höher als bei Kontrollprobanden
INAS-Score	INAS-Score bei ataktischen SCA3-Patienten signifikant höher als bei Kontrollprobanden und präataktischen Mutationsträgern
SARA-Score vs. AAO	Sehr schwache inverse Korrelation, keine signifikanten Unterschiede
INAS-Score vs. AAO	Sehr schwache inverse Korrelation, keine signifikanten Unterschiede
SARA-Score vs. mutCAG-Anzahl	Sehr schwache lineare Korrelation, keine signifikanten Unterschiede

INAS-Score vs. mutCAG-Anzahl	Sehr schwache lineare Korrelation, keine signifikanten Unterschiede
AAO vs. mutCAG-Anzahl	Inverse Korrelation, bei Gruppeneinteilung signifikant fallendes AAO bei steigender mutCAG-Anzahl
CSDP vs. mutCAG-Anzahl	Schwache lineare Korrelation, bei Gruppeneinteilung signifikant steigender CSDP-Score bei steigender mutCAG-Anzahl
CSDP vs. AAO	Keine Unterschiede zwischen den analysierten Gruppen

### 3.3.2 Vergleich der klinischen Parameter mit den Messergebnissen für das lösliche *full-length* Ataxin-3 Protein

Um das lösliche *full-length* Ataxin-3 Protein als möglichen Biomarker zu überprüfen, wurden die Messergebnisse für das Protein mit den erhobenen klinischen Parametern verglichen. Für 97 der 98 Probanden konnte das lösliche *full-length* Ataxin-3 Protein quantifiziert werden. Von einer Probe konnten trotz mehrfacher Messungen nur negative  $\Delta Fc$ -Werte gemessen werden. Diese Probe wurde von den folgenden Analysen ausgeschlossen.

Zunächst wurde überprüft, ob das Geschlecht oder das erfassende Zentrum einen Einfluss auf die Messergebnisse hatten. Dies konnte in dieser Kohorte jedoch ausgeschlossen werden. Die Messergebnisse für das lösliche *full-length* Ataxin-3 zeigten keine geschlechtsabhängigen Unterschiede (Abb. 3.3.15 A). Auch das erfassende Zentrum hatte in dieser Kohorte keinen Einfluss auf die Messergebnisse für das lösliche *full-length* Ataxin-3 (Abb. 3.3.15 B). Auffällig war jedoch, dass sich in beiden Analysen mehrere Ausreißer zeigten. Diese wurden für die weitere statistische Auswertung nicht ausgeschlossen und gegebenenfalls gesondert betrachtet.

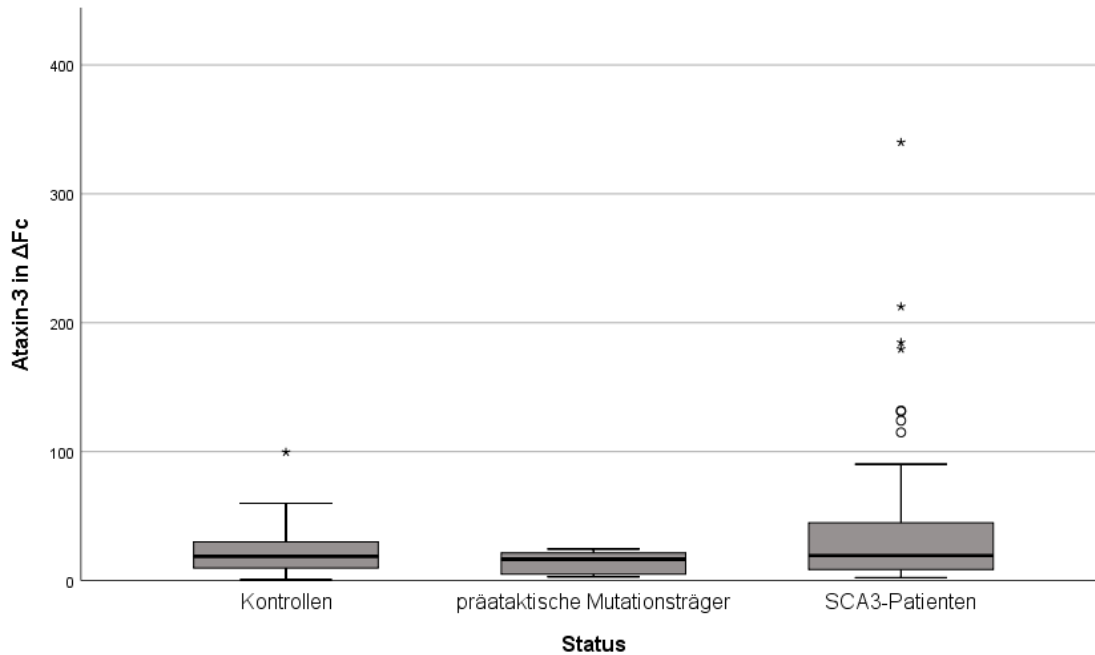


**Abbildung 3.3.15:** Lösliches *full-length* Ataxin-3 bei unterschiedlichem Geschlecht und unterschiedlichen erfassenden Zentren

Die Messergebnisse für das lösliche *full-length* Ataxin-3 zeigten weder geschlechtsabhängige Unterschiede (A) noch Abweichungen, die auf ein erfassendes Zentrum zurückzuführen wären (B). In beiden Auswertungen zeigten sich mehrere Ausreißer. Die kleinen Kreise stehen für Ausreißer außerhalb des Zweifachen, die kleinen Sternchen für Ausreißer außerhalb des Dreifachen der Standardabweichung.

Betrachtete man die Messergebnisse für das lösliche *full-length* Ataxin-3 eingeteilt nach Kontrollen, präataktischen Mutationsträgern und SCA3-Patienten, zeigte sich, dass sämtliche Ausreißer über einem Messwert von  $\Delta Fc=100$ , den SCA3-Patienten zuzuordnen waren (Abb. 3.3.16). Die Streuung der Messergebnisse für das lösliche *full-length* Ataxin-3 bei den ataktischen SCA3-Patienten war im Vergleich zu den Kontrollen und präataktischen Mutationsträgern deutlich größer. Es ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Anhand der Messergebnisse für das lösliche *full-length* Ataxin-3 ließen sich die SCA3-Patienten nicht von den Kontrollen oder den präataktischen Mutationsträgern unterscheiden.



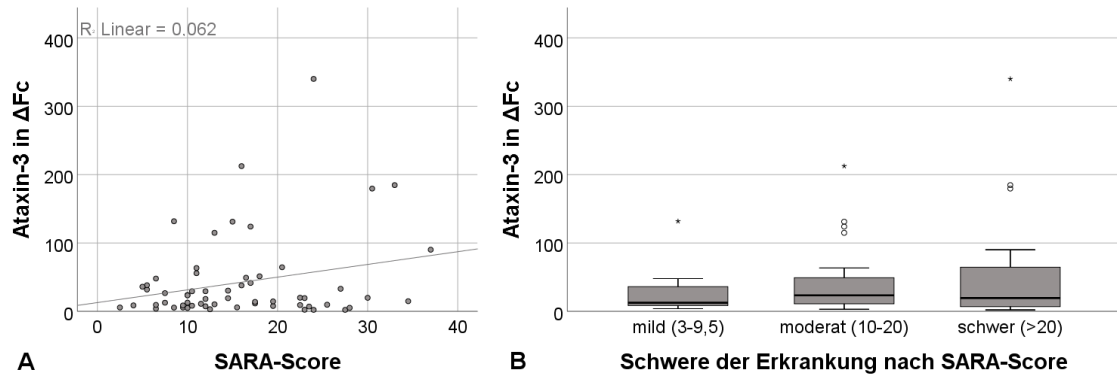


**Abbildung 3.3.16:** Lösliches *full-length* Ataxin-3 bei unterschiedlichem Erkrankungsstatus

Die Messergebnisse für das lösliche *full-length* Ataxin-3 der SCA3-Patienten zeigten bei den SCA3-Patienten eine größere Streuung als bei den Kontrollen oder den präataktischen Mutationsträgern. Alle Ausreißer über einem Messwert von  $\Delta Fc=100$  sind den SCA3-Patienten zuzuordnen. Zwischen den Messergebnissen der Gruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Die kleinen Kreise stehen für Ausreißer außerhalb des Zweifachen, die kleinen Sternchen für Ausreißer außerhalb des Dreifachen der Standardabweichung.

Die Abbildung 3.3.17 zeigt den Vergleich der Messergebnisse für lösliches *full-length* Ataxin-3 der manifest erkrankten SCA3-Patienten mit dem jeweils parallel zum Biomaterial erhobenen SARA-Score. Es zeigte sich eine große Streuung der Ataxin-3 Messwerte unabhängig des SARA-Scores. Die steigende Regressionsgerade zeigte zwar tendenziell eine schwache lineare Korrelation, die jedoch mit  $r^2=0,062$  nicht statistisch signifikant war (Abb. 3.3.17 A). Teilte man die ataktischen SCA3-Patienten anhand ihres individuellen SARA-Scores in mild (3-9,5), moderat (10-20) und schwer (>20) betroffen ein und verglich die Messergebnisse für lösliches *full-length* Ataxin-3 mit diesen Gruppen (Abb. 3.3.17 B), erhielt man ein ähnliches Bild. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Man konnte lediglich eine tendenziell stärkere Streuung der  $\Delta Fc$ -Werte für Ataxin-3 von mild zu schwer betroffenen SCA3-Patienten feststellen. Mit steigender Schwere der Betroffenheit zeigten sich mehr und

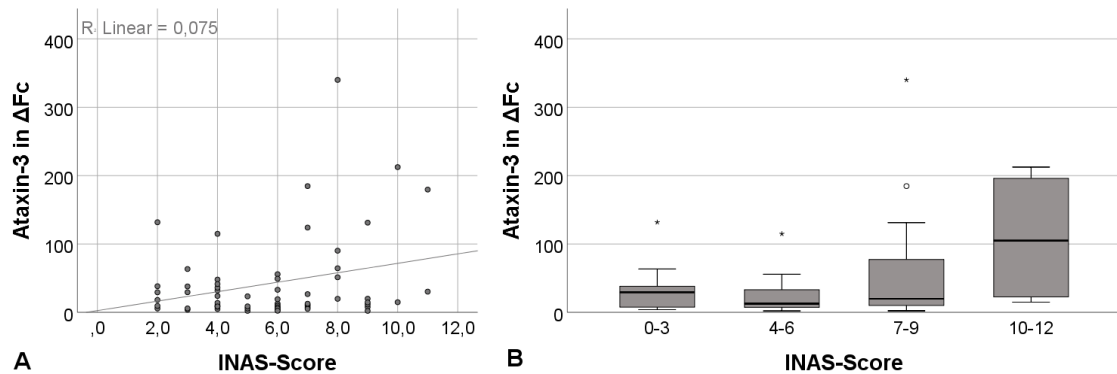
höhere Ausreißer der zweifachen und dreifachen Standardabweichung vom Mittelwert.



**Abbildung 3.3.17:** Vergleich lösliches *full-length* Ataxin-3 mit SARA-Score

Die Regressionsgerade zeigte eine schwache lineare Korrelation zwischen den beiden Messgrößen (A). Eingeteilt nach Schwere der Erkrankung in mild (SARA 3-9,5), moderat (SARA 10-20) und schwer (SARA >20) betroffenen Patienten, zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei den  $\Delta Fc$ -Werten für das lösliche *full-length* Ataxin-3 (B). Lediglich die Streuung der  $\Delta Fc$ -Werte nimmt bei steigender Schwere der Erkrankung tendenziell zu. Die kleinen Kreise stehen für Ausreißer außerhalb des Zweifachen, die kleinen Sternchen für Ausreißer außerhalb des Dreifachen der Standardabweichung.

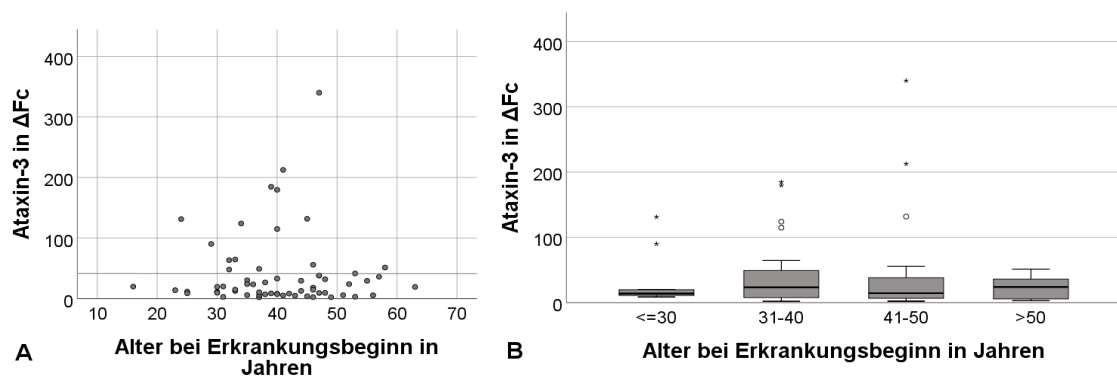
Der Vergleich der Messergebnisse für das lösliche *full-length* Ataxin-3 von den manifest erkrankten SCA3-Patienten mit dem INAS-Score zeigte ein ähnliches Bild. Auch hier war eine große Streuung der  $\Delta Fc$ -Werte für Ataxin-3, die mit steigendem INAS-Score zunahm, festzustellen. Die Steigung der Regressionsgeraden ( $r^2=0,075$ ) deutete eine schwache lineare Korrelation zwischen beiden Parametern an (Abb. 3.3.18 A). Teilte man die ataktischen SCA3-Patienten anhand des INAS-Scores in Gruppen mit INAS-Score 0-3, 4-6, 7-9 und 10-12 ein, konnte man diese Tendenz bestätigen (Abb. 3.3.18 B). Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren jedoch nicht signifikant.



**Abbildung 3.3.18:** Vergleich lösliches *full-length* Ataxin-3 mit INAS-Score

Die Regressionsgerade in Abbildung A zeigte eine Tendenz für eine schwache lineare Korrelation zwischen den beiden Messgrößen. Diese Tendenz ließ sich durch die Einteilung des INAS-Scores in Gruppen (0-3, 4-6, 7-9 und 10-12) bestätigen. Es ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Streuung der  $\Delta Fc$ -Werte für das lösliche *full-length* Ataxin-3 nahm mit steigendem INAS-Score zu. Die kleinen Kreise stehen für Ausreißer außerhalb des Zweifachen, die kleinen Sternchen für Ausreißer außerhalb des Dreifachen der Standardabweichung.

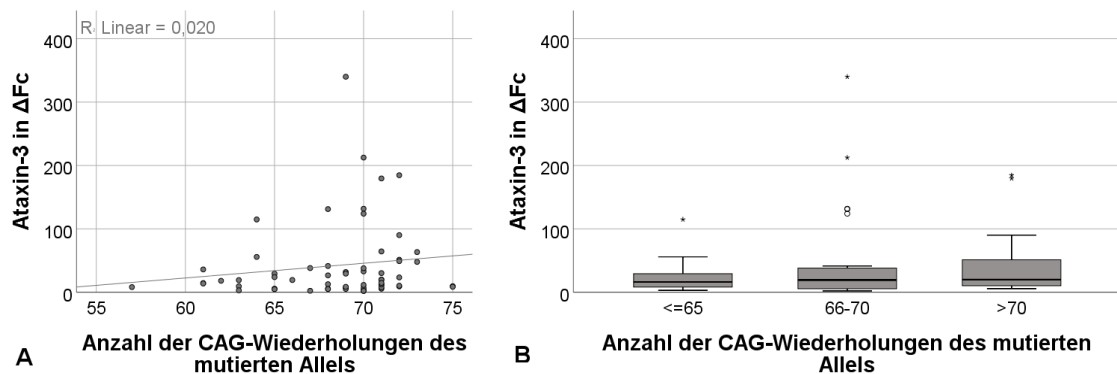
Verglich man die Messergebnisse für lösliches *full-length* Ataxin-3 mit dem individuellen Alter bei Erkrankungsbeginn, zeigte sich, dass das Alter bei Erkrankungsbeginn stark schwankte. Es gab ataktische SCA3-Patienten, die bei Feststellung der Erkrankung weniger als 20 Jahre alt waren, aber auch Patienten, die bereits älter als 60 waren. Die Messergebnisse für lösliches *full-length* Ataxin-3 zeigten keine Veränderungen in Abhängigkeit des Alters bei Erkrankungsbeginn (Abb. 3.3.19 A+B).



**Abbildung 3.3.19:** Vergleich lösliches *full-length* Ataxin-3 mit dem Alter bei Erkrankungsbeginn

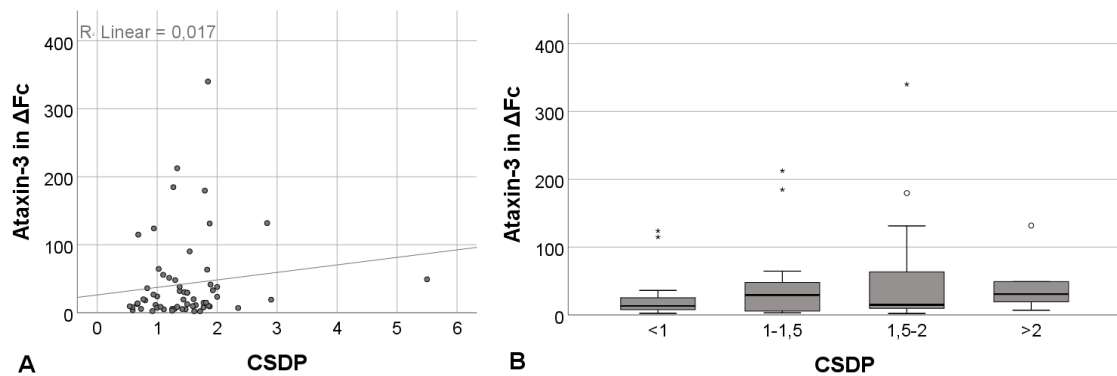
Auf der X-Achse ist das Alter bei Erkrankungsbeginn, auf der Y-Achse die dazu passenden Messergebnisse für Ataxin-3 aufgetragen. Es zeigten sich weder Tendenzen noch signifikante Steigungen (A). Zwischen den Gruppen gab es keine signifikanten Unterschiede (B). Die kleinen Kreise stehen für Ausreißer außerhalb des Zweifachen, die kleinen Sternchen für Ausreißer außerhalb des Dreifachen der Standardabweichung.

Betrachtete man die Messergebnisse für lösliches *full-length* Ataxin-3 der manifest erkrankten SCA3-Patienten im Vergleich mit der mutCAG-Anzahl, zeigte sich eine sehr schwache lineare Korrelation (Abb. 3.3.20 A). Die ataktischen SCA3-Patienten eingeteilt nach der mutCAG-Anzahl in  $\leq 65$ , 66-70 und  $>70$  bestätigte diese schwache Steigerung der  $\Delta Fc$ -Werte für das lösliche *full-length* Ataxin-3 (Abb. 3.3.20 B). Die Abweichungen zwischen den Gruppen waren jedoch nicht signifikant. Die Streuung der Messergebnisse für das lösliche *full-length* Ataxin-3 nahm mit steigender mutCAG-Anzahl zu, wobei jedoch die Gruppe mit einer mutCAG-Anzahl von 66-70 die meisten Ausreißer aufwies.



**Abbildung 3.3.20:** Vergleich lösliches *full-length* Ataxin-3 mit der mutCAG-Zahl. Auf der X-Achse ist die mutCAG-Anzahl, auf der Y-Achse die dazu passenden Messergebnisse für Ataxin-3 aufgetragen. Es zeigte sich eine sehr schwache lineare Korrelation zwischen den beiden Messgrößen (A). Diese schwache Tendenz wurde bei Betrachtung der Gruppen bestätigt (B). Es ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede. Die kleinen Kreise stehen für Ausreißer außerhalb des Zweifachen, die kleinen Sternchen für Ausreißer außerhalb des Dreifachen der Standardabweichung.

Beim Vergleich der Messergebnisse für lösliches *full-length* Ataxin-3 der ataktischen SCA3-Patienten mit dem CSDP-Score zeigte sich ein ähnliches Bild. Es ergab sich eine sehr schwache Korrelation zwischen den beiden Parametern (Abb. 3.3.21 A). Diese Tendenz konnte bei der Gruppeneinteilung (CSDP  $<1$ , 1-1,5, 1,5-2 und  $>2$ ) ebenfalls festgestellt werden (Abb. 3.3.21 B). Diese leichte Steigung der  $\Delta Fc$ -Werte für Ataxin-3 bei steigendem CSDP-Score war aber nicht signifikant.



**Abbildung 3.3.21:** Vergleich lösliches *full-length* Ataxin-3 mit CSDP-Score

Auf der X-Achse ist der CSDP-Score, auf der Y-Achse die dazu passenden Messergebnisse für Ataxin-3 aufgetragen. Es ergab sich eine sehr schwache lineare Korrelation zwischen den beiden Messgrößen (A). Eingeteilt in Gruppen nach dem CSDP-Score in CSDP <1, 1-1,5, 1,5-2, >2 zeigte sich diese schwache Tendenz ebenfalls (B). Dabei waren die Unterschiede zwischen den Gruppen aber nicht signifikant. Die kleinen Kreise stehen für Ausreißer außerhalb des Zweifachen, die kleinen Sternchen für Ausreißer außerhalb des Dreifachen der Standardabweichung.

**Tabelle 3.6:** Zusammenfassung der Ergebnisse aus Abschnitt 3.3.2

Messergebnisse für lösliches <i>full-length</i> Ataxin-3 im Vergleich zu	Ergebnis
Geschlecht	Keine geschlechtsabhängigen Unterschiede
Erfassenden Zentren	Keine Unterschiede in Abhängigkeit zum erfassenden Zentrum
Erkrankungsstatus	Kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollprobanden, präataktischen Mutationsträgern und ataktischen SCA3-Patienten
SARA-Score	Schwache, lineare Korrelation, keine signifikanten Unterschiede, größere Streuung der $\Delta Fc$ -Werte bei steigendem SARA-Score
INAS-Score	Schwache, lineare Korrelation, keine signifikanten Unterschiede, größere Streuung der $\Delta Fc$ -Werte bei steigendem INAS-Score
AAO	Keine Unterschiede in Abhängigkeit zum AAO
mutCAG-Anzahl	Schwache, lineare Korrelation, keine signifikanten Unterschiede, größere Streuung der $\Delta Fc$ -Werte bei steigender mutCAG-Anzahl
CSDP	Schwache, lineare Korrelation, keine signifikanten Unterschiede

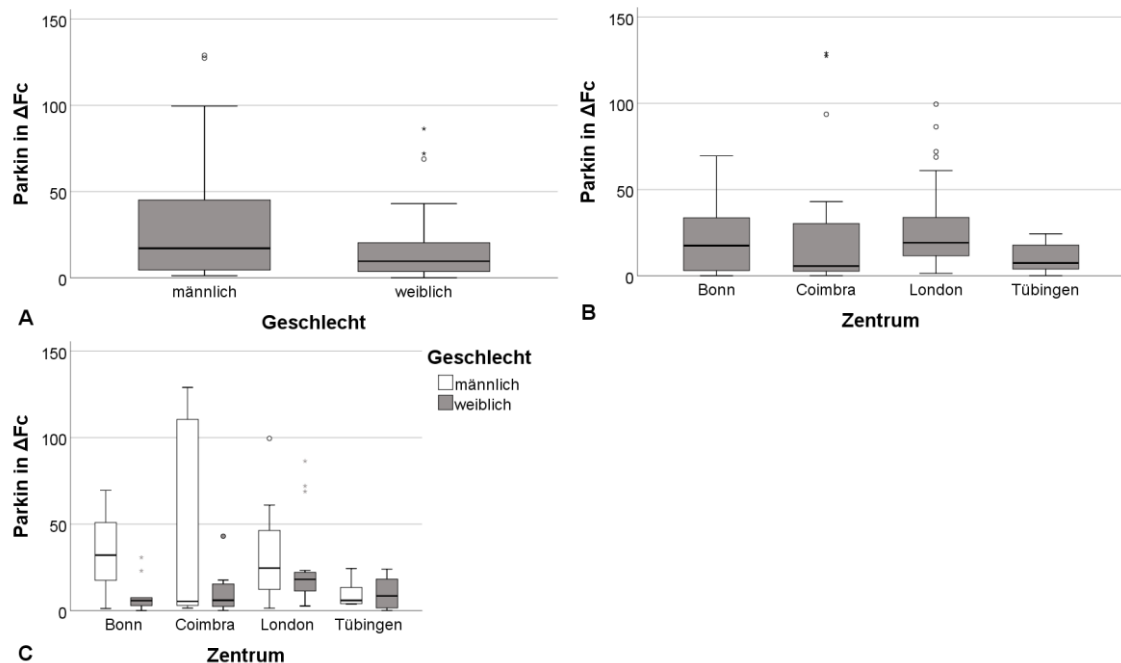
### 3.3.3 Vergleich der klinischen Parameter mit den Messergebnissen für das lösliche Parkin Protein

Die Messergebnisse für das lösliche Parkin Protein wurden mit den erhobenen klinischen Parametern verglichen, um zu überprüfen, ob Parkin als möglicher

Biomarker für die SCA3 in Frage kommt. Es konnte bei 89 von 98 Probanden ein Messergebnis für das lösliche Parkin erhoben werden. Die vorhandenen PBMC-Proben wurden für mehrere Biomarker-Analysen benötigt. Da die Messung des Proteins Parkin zuletzt durchgeführt wurde, war von 9 Probanden nicht mehr genügend Material vorhanden, um eine valide Messung durchzuführen. Somit fehlten Messwerte von 5 manifest erkrankten SCA3-Patienten, 1 präataktischen Mutationsträger und 3 Kontrollprobanden.

Wie beim Vergleich der Messergebnisse des löslichen *full-length* Ataxin-3 mit den erhobenen klinischen Parametern wurde auch hier zunächst überprüft, ob das Geschlecht oder die Herkunft der Probe eine Auswirkung auf das Messergebnis des löslichen Parkins hatte. Dabei zeigte sich, dass die Messergebnisse für das lösliche Parkin bei männlichen Probanden mit durchschnittlich  $\Delta Fc=30,9$  (SD=34,2) signifikant höher waren als bei weiblichen Probandinnen mit  $\Delta Fc=15,8$  (SD=18,2) ( $p=0,014$ ) (Abb.3.3.22 A). Zudem zeigten die Messergebnisse für Parkin bei männlichen Probanden eine größere Streuung als bei weiblichen Probandinnen. Beim Vergleich der Messergebnisse für das lösliche Parkin eingeteilt nach erfassendem Zentrum war ebenfalls ein signifikanter Unterschied zu erkennen. Die Messergebnisse für Parkin von Probanden (beider Geschlechter) aus London waren mit einem Mittelwert von  $\Delta Fc=27,5$  (SD=25,2) signifikant höher als die Messergebnisse für Parkin von Probanden aus Tübingen mit durchschnittlich  $\Delta Fc=10,0$  (SD=8,0) ( $p=0,001$ ) (Abb. 3.3.22 B). Die restlichen Unterschiede bei den Messergebnissen für das lösliche Parkin eingeteilt nach dem erfassenden Zentrum waren nicht signifikant verändert. Dabei lag der Mittelwert der Messergebnisse für Parkin bei Probanden aus Bonn bei  $\Delta Fc=21,7$  (SD=22,3), der Mittelwert der Messergebnisse für Parkin bei Probanden aus Coimbra bei  $\Delta Fc=28,8$  (SD=45,4). Die daraus resultierende Möglichkeit, dass die signifikant höheren Messwerte für Parkin von Probanden aus London im Vergleich zu den Probanden aus Tübingen lediglich daraus resultierten, dass die Messergebnisse für Parkin von Probanden aus London hauptsächlich von männlichen Probanden stammten, konnte durch Tabelle 3.5 widerlegt werden. Für weibliche Probanden ( $n=19$ ) aus London lagen sogar mehr Messergebnisse für das lösliche Parkin vor als für männliche ( $n=15$ ). Dasselbe galt für Probanden

aus Coimbra (♂=7, ♀=9) und Tübingen (♂=8, ♀=12). Nur bei Patienten aus Bonn war es umgekehrt (♂=10, ♀=9). Insgesamt lagen 49 Messwerte für Parkin von weiblichen und 40 von männlichen Probanden vor. Der Vergleich der Messergebnisse für das lösliche Parkin eingeteilt nach erfassendem Zentrum und Geschlecht (Abb. 3.3.22 C) bestätigte die Ergebnisse aus den Abbildungen 3.3.22 A+B und lieferte zeitgleich einen Grund für die signifikant höheren Messwerte von Probanden aus London im Vergleich zu Probanden aus Tübingen. Bei Probanden aus Tübingen waren der Mittelwert und die Streuung der Messwerte für Parkin von Frauen größer als bei den von Männern. Bei allen anderen Zentren zeigten sich umgekehrte Ergebnisse (Abb. 3.3.22 C).



**Abbildung 3.3.22:** Parkin bei unterschiedlichem Geschlecht und unterschiedlichen erfassenden Zentren

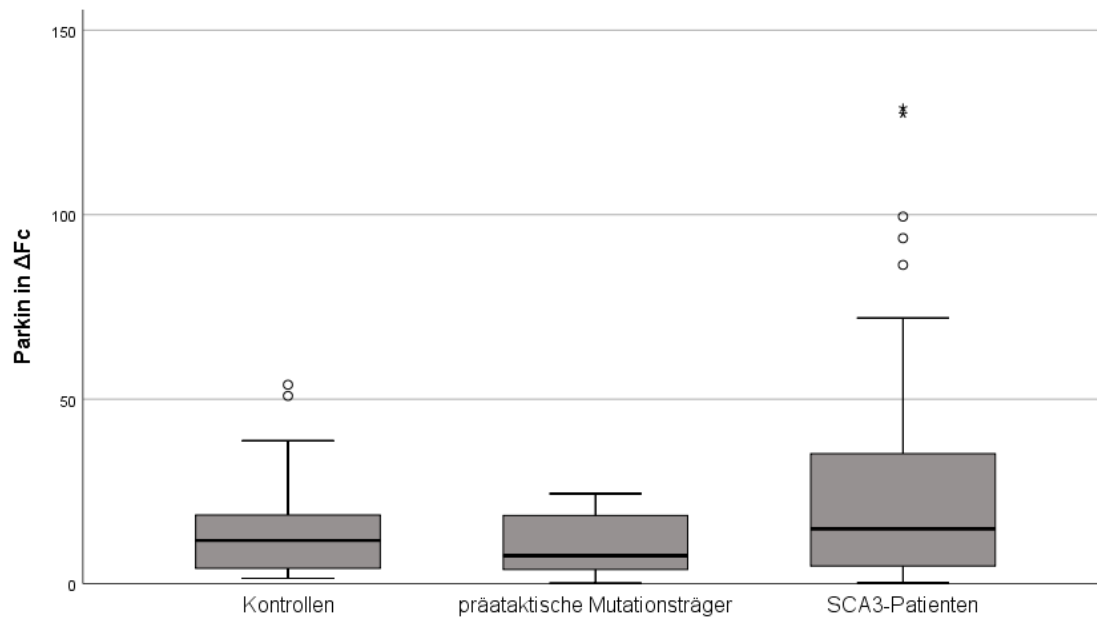
Die Messergebnisse für das lösliche Parkin bei männlichen Probanden ( $M=30,9$  ( $SD=34,2$ )) waren signifikant höher als die bei weiblichen Probandinnen ( $M=15,8$  ( $SD=18,2$ )) (A). Ebenfalls signifikant höher waren die Messergebnisse für Parkin bei Probanden aus London ( $M=27,5$  ( $SD=25,2$ )) im Vergleich zu Probanden aus Tübingen ( $M=10,0$  ( $SD=8,0$ )) (B). Der Mittelwert der Messergebnisse für Parkin bei Probanden aus Bonn lag bei  $\Delta Fc=21,7$  ( $SD=22,3$ ), der Mittelwert bei Probanden aus Coimbra bei  $\Delta Fc=28,8$  ( $SD=45,4$ ). Die restlichen Unterschiede waren nicht signifikant. Bei weiblichen Probanden aus Tübingen zeigten sich höhere Messwerte für Parkin als bei männlichen. Bei Probanden aus Bonn, Coimbra und London wurde das Gegenteil festgestellt (C). Die kleinen Kreise stehen für Ausreißer außerhalb des Zweifachen, die kleinen Sternchen für Ausreißer außerhalb des Dreifachen der Standardabweichung.

**Tabelle 3.7:** Anzahl der Probanden, bei denen ein Messergebnis für das lösliche Parkin vorlag, aufgeteilt nach erfassendem Zentrum und Geschlecht

	männlich	weiblich	gesamt
Bonn	10	9	19
Coimbra	7	9	16
London	15	19	34
Tübingen	8	12	20
gesamt	40	49	89

Betrachtete man die Messergebnisse für das lösliche Parkin eingeteilt in Kontrollprobanden, präataktische Mutationsträger und manifest erkrankte SCA3-Patienten ergaben sich ebenfalls signifikante Unterschiede. Manifest erkrankte SCA3-Patienten zeigten mit einem Mittelwert von  $\Delta Fc=27,4$  ( $SD=32,3$ ) signifikant höhere Messergebnisse für Parkin sowohl gegenüber Kontrollprobanden ( $M=15,3$  ( $SD=14,4$ )) ( $p=0,022$ ) als auch präataktischen Mutationsträgern ( $M=11,0$  ( $SD=9,6$ )) ( $p=0,007$ ) (Abb. 3.3.23). Der Unterschied der Messergebnisse für Parkin zwischen Kontrollprobanden und präataktischen Mutationsträgern war nicht signifikant. Zusätzlich war festzustellen, dass die Messergebnisse für Parkin bei ataktischen SCA3-Patienten die größte Streuung und die meisten Ausreißer aufwiesen.



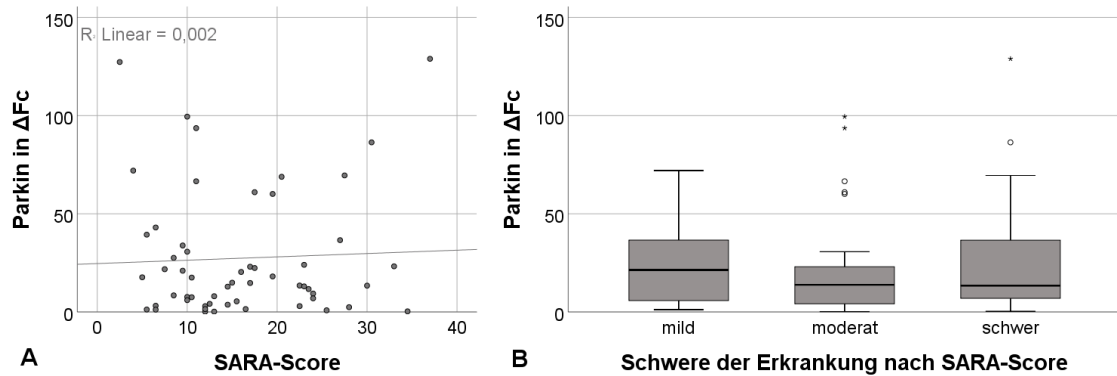


**Abbildung 3.3.23: Parkin bei unterschiedlichem Erkrankungsstatus**

Die Messergebnisse für das lösliche Parkin bei ataktischen SCA3-Patienten (M=27,4 (SD=32,3)) waren signifikant höher als die bei Kontrollprobanden (M=15,3 (SD=14,4)) (p=0,022) und präataktischen Mutationsträgern (M=11,0 (SD=9,6)) (p=0,007). Der Unterschied zwischen den Kontrollprobanden und den präataktischen Mutationsträgern waren nicht signifikant. Die Messergebnisse für Parkin bei SCA3-Patienten zeigten die größte Streuung und die meisten Ausreißer. Die kleinen Kreise stehen für Ausreißer außerhalb des Zweifachen, die kleinen Sternchen für Ausreißer außerhalb des Dreifachen der Standardabweichung.

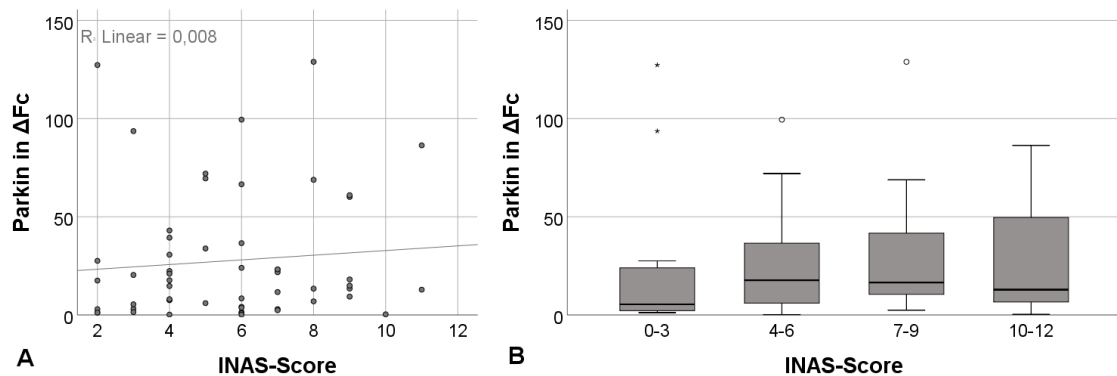
Vergleich man die Messergebnisse für das lösliche Parkin von manifest erkrankten SCA3-Patienten mit dem SARA-Score zeigten sich weniger aussagekräftige Zusammenhänge. Es ergab sich eine sehr schwache, lineare Korrelation ( $r^2=0,002$ ) zwischen den beiden Messgrößen (Abb.3.3.24 A). Bei der Einteilung der SCA3-Patienten nach der Schwere der Erkrankung auf Basis des SARA-Scores in mild (3-9,5), moderat (10-20) und schwer (>20) betroffen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abb. 3.3.24 B).

Sehr ähnlich war der Vergleich der Messergebnisse für das lösliche Parkin von manifest erkrankten SCA3-Patienten mit dem INAS-Score. Auch hier zeigte sich eine sehr schwache, lineare Korrelation ( $r^2=0,008$ ) zwischen den beiden Messgrößen (Abb. 3.3.25 A). Eingeteilt nach dem INAS-Score in INAS=0-3, 4-6, 7-9 und 10-12 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede für die Messergebnisse des löslichen Parkins (Abb. 3.3.25 B). Lediglich die Streuung der Messwerte für Parkin nahm mit steigendem INAS-Score etwas zu.



**Abbildung 3.3.24: Vergleich Parkin mit SARA-Score**

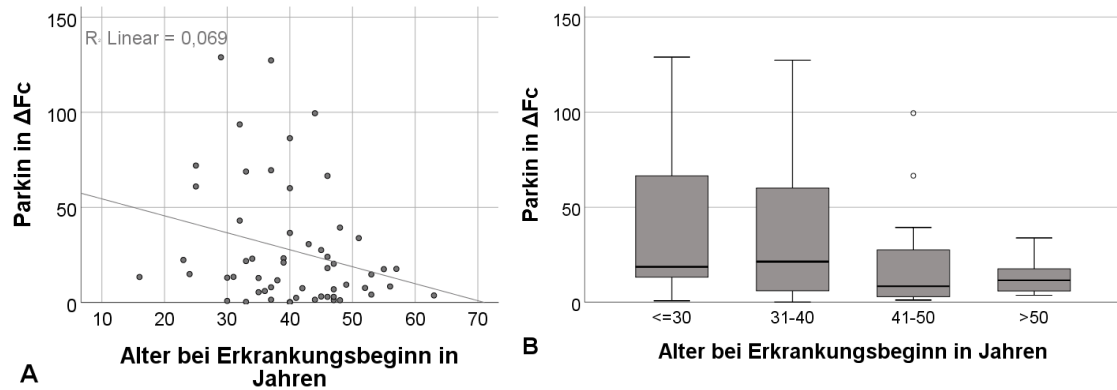
Es zeigte sich eine sehr schwache, lineare Korrelation zwischen den Messergebnissen für das lösliche Parkin von ataktischen SCA3-Patienten und dem SARA-Score (A). Eingeteilt in mild (SARA=3-9,5), moderat (10-20) und schwer (>20) erkrankte SCA3-Patienten ergaben sich keine signifikanten Abweichungen der Messerwerte für Parkin. Die kleinen Kreise stehen für Ausreißer außerhalb des Zweifachen, die kleinen Sternchen für Ausreißer außerhalb des Dreifachen der Standardabweichung.



**Abbildung 3.3.25: Vergleich Parkin mit INAS-Score**

Es ergab sich eine sehr schwache, lineare Korrelation zwischen den Messergebnissen für das lösliche Parkin von ataktischen SCA3-Patienten und dem INAS-Score (A). Dabei zeigte die Einteilung in Gruppen (INAS=0-3, 4-6, 7-9 und 10-12) lediglich eine Zunahme der Streuung der Messwerte für Parkin. Die Abweichungen der Messergebnisse für Parkin zwischen den Gruppen waren nicht signifikant (B). Die kleinen Kreise stehen für Ausreißer außerhalb des Zweifachen, die kleinen Sternchen für Ausreißer außerhalb des Dreifachen der Standardabweichung.

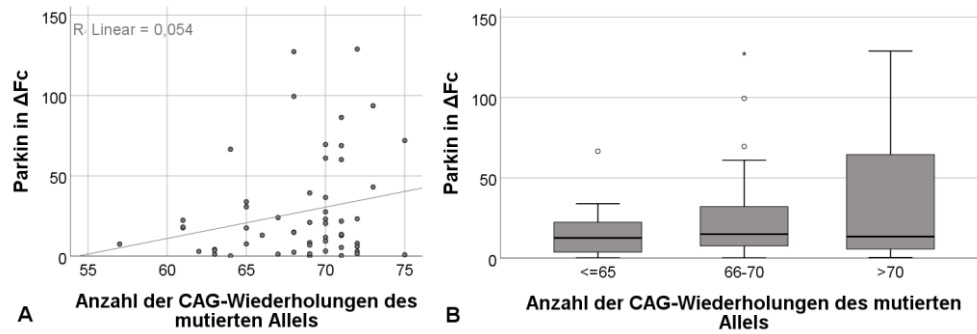
Der Vergleich der Messergebnisse für das lösliche Parkin von manifest erkrankten SCA3-Patienten mit dem Alter bei Erkrankungsbeginn zeigte eine schwache, inverse Korrelation ( $r^2=0,069$ ) zwischen den beiden Messgrößen (Abb. 3.3.26 A). Durch eine Einteilung der Messergebnisse für Parkin nach dem Alter bei Erkrankungsbeginn in AAO  $\leq 30$ , 31-40, 41-50 und  $>50$  konnte dies bestätigt werden (Abb. 3.3.26 B). Dabei nahm die Streuung der Messergebnisse für Parkin mit steigendem AAO deutlich ab. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht signifikant.



### Abbildung 3.3.26: Vergleich Parkin mit dem Alter bei Erkrankungsbeginn

Es zeigte sich eine schwache, inverse Korrelation zwischen den Messergebnissen für das lösliche Parkin von ataktischen SCA3-Patienten und dem Alter bei Erkrankungsbeginn (A). Die Gruppeneinteilung der Messergebnisse für Parkin nach dem Alter bei Erkrankungsbeginn (AAO  $\leq 30$ , 31-40, 41-50 und  $>50$ ) ergab eine Abnahme der Streuung der Messwerte für Parkin mit steigendem AAO (B). Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren dabei nicht signifikant. Die kleinen Kreise stehen für Ausreißer außerhalb des Zweifachen, die kleinen Sternchen für Ausreißer außerhalb des Dreifachen der Standardabweichung.

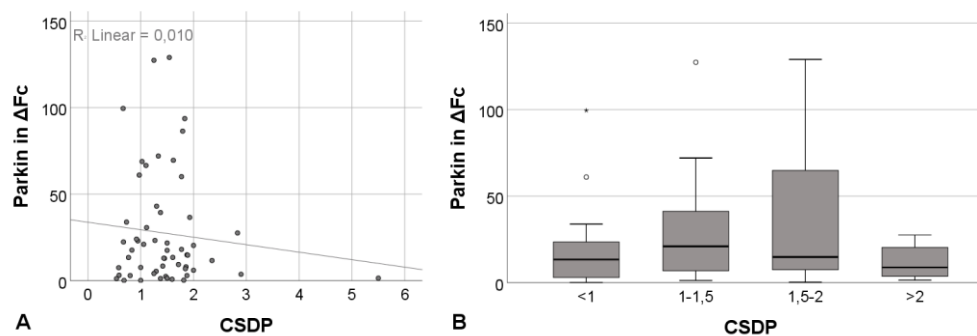
Beim Vergleich der Messergebnisse für das lösliche Parkin von manifest erkrankten SCA3-Patienten mit der mutCAG-Anzahl zeigte sich eine schwache, lineare Korrelation ( $r^2=0,054$ ) zwischen den beiden Messgrößen (Abb. 3.3.27 A). Teilte man die ataktischen SCA3-Patienten nach der mutCAG-Anzahl in Gruppen (mutCAG-Anzahl  $\leq 65$ , 66-70 und  $>70$ ) ein, konnte man eine deutliche Zunahme der Streuung der Messergebnisse bei steigender mutCAG-Anzahl feststellen (Abb. 3.3.27 B). Die Abweichungen der Messwerte für Parkin zwischen den Gruppen waren dabei nicht signifikant.



**Abbildung 3.3.27: Vergleich Parkin mit der mutCAG-Anzahl**

Es ergab sich eine schwache, lineare Korrelation zwischen den Messergebnissen für das lösliche Parkin von ataktischen SCA3-Patienten und der mutCAG-Anzahl (A). Eingeteilt nach der mutCAG-Anzahl in mutCAG-Anzahl  $\leq 65$ , 66-70 und  $>70$  zeigten sich keine signifikanten Abweichungen der Messwerte für Parkin (B). Die Streuung der Messergebnisse für Parkin nahm mit steigender mutCAG-Anzahl zu. Die kleinen Kreise stehen für Ausreißer außerhalb des Zweifachen, die kleinen Sternchen für Ausreißer außerhalb des Dreifachen der Standardabweichung.

Die Abbildung 3.3.28 zeigt den Vergleich der Messergebnisse für das lösliche Parkin von manifest erkrankten SCA3-Patienten mit dem CSDP-Score. Dabei wurde eine sehr schwache, inverse Korrelation ( $r^2=0,010$ ) zwischen den beiden Messgrößen festgestellt (Abb. 3.3.28 A). Die Einteilung nach dem CSDP-Score in Gruppen (CSDP  $<1$ , 1-1,5, 1,5-2 und  $>2$ ) zeigte keine signifikanten Unterschiede der Messwerte für Parkin (Abb. 3.3.28 B). Die Gruppe mit einem CSDP von 1,5-2 wies eine deutlich größere Streuung der Messergebnisse für das lösliche Parkin auf als die anderen Gruppen.



**Abbildung 3.3.28: Vergleich Parkin mit CSDP-Score**

Es zeigte sich eine sehr schwache, inverse Korrelation zwischen den Messergebnissen für das lösliche Parkin von ataktischen SCA3-Patienten und dem CSDP-Score (A). Eingeteilt nach dem CSDP-Score in CSDP  $<1$ , 1-1,5, 1,5-2 und  $>2$  ergaben sich keine signifikanten Abweichungen der Messwerte für Parkin (B). Die kleinen Kreise stehen für Ausreißer außerhalb des Zweifachen, die kleinen Sternchen für Ausreißer außerhalb des Dreifachen der Standardabweichung.

**Tabelle 3.8:** Zusammenfassung der Ergebnisse aus Abschnitt 3.3.3

Messergebnisse für Parkin im Vergleich zu	Ergebnis
Geschlecht	Signifikant höhere Parkin Proteinlevel bei männlichen Probanden
Erfassenden Zentren	Signifikant höhere Parkin Proteinlevel bei Probanden aus London im Vergleich zu Probanden aus Tübingen
Erkrankungsstatus	Signifikant höhere Parkin Proteinlevel bei ataktischen SCA3-Patienten im Vergleich zu Kontrollprobanden und präataktischen Mutationsträgern
SARA-Score	Sehr schwache, lineare Korrelation, keine signifikanten Unterschiede
INAS-Score	Sehr schwache, lineare Korrelation, keine signifikanten Unterschiede, leichte Zunahme der Streuung der Messergebnisse bei steigendem INAS-Score
AAO	Schwache, inverse Korrelation, keine signifikanten Unterschiede, deutliche Abnahme der Streuung der Messergebnisse bei steigendem AAO
mutCAG-Anzahl	Schwache, lineare Korrelation, keine signifikanten Unterschiede, deutliche Zunahme der Streuung der Messergebnisse bei steigender mutCAG-Anzahl
CSDP	Sehr schwache, inverse Korrelation, keine signifikanten Unterschiede, große Streuung der Messergebnisse bei CSDP 1,5-2

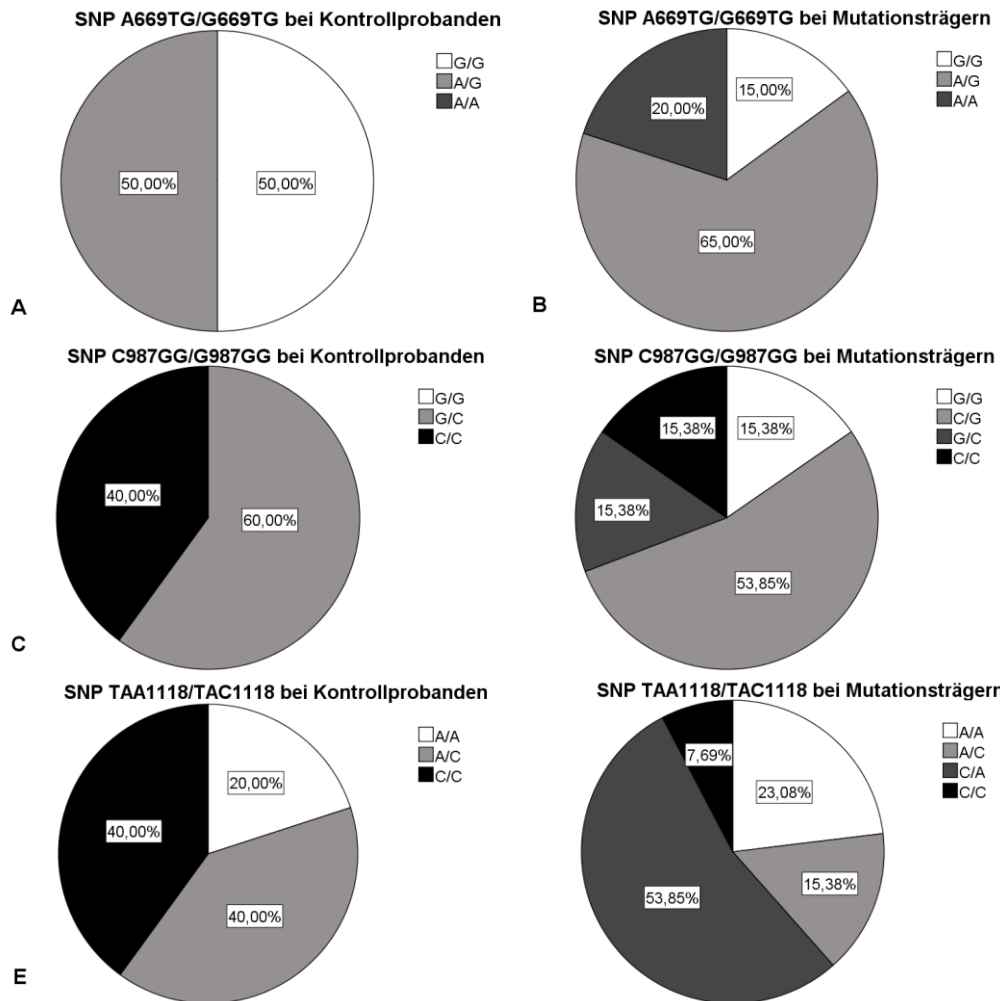
### 3.3.4 Ergebnisse der Sequenzierung der *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP)

In der Literatur wurden verschiedene SNPs für Ataxin-3 und Parkin beschrieben (vgl. Abschnitt 1.5). In Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass diese SNPs Auswirkungen auf die Menge der Proteine und/oder die Messbarkeit haben können. Um dies zu untersuchen, wurden für beide Proteine je drei SNPs im jeweils kodierenden Gen sequenziert. Für Ataxin-3 wurden die SNPs G<sup>669</sup>TG/A<sup>669</sup>TG (AS 212), C<sup>987</sup>GG/G<sup>987</sup>GG (AS 318) und TAC<sup>1118</sup>/TAA<sup>1118</sup> (AS 361) im *ATXN3*-Gen sequenziert, wobei sich der SNP an Position AS 212 vor dem CAG-Bereich befindet und die beiden anderen hinter dem CAG-Bereich zu finden sind. Die hier angegebenen Positions- und Aminosäuren-Angaben beziehen sich dabei auf das *ATXN3*-Gen mit 13 Wiederholungen des CAG-Bereiches. Für Parkin wurden die SNPs AG<sup>601</sup>C/AA<sup>601</sup>C (AS 167), G<sup>1239</sup>TA/C<sup>1239</sup>TA (AS 380) und G<sup>1281</sup>AT/A<sup>1281</sup>AT (AS 394) im *PARK2*-Gen sequenziert.

Aufgrund des Umfangs der anderen, bereits beschriebenen Arbeiten konnte nur von 32 Probanden (8 Kontrollprobanden, 3 präataktische Mutationsträgern, 21 ataktischen SCA3-Patienten) das Genmaterial analysiert werden. Zusätzlich konnte nicht für jeden der 32 Probanden alle 6 genannten SNPs untersucht werden, sodass leider für die präataktischen Mutationsträger kaum Daten vorlagen. Daher ging es bei der Auswertung der erhobenen Daten um das Aufzeigen von Ansätzen, die Abweichungen von gemessenen Proteinmengen erklären könnten. Zusätzlich sollte dabei untersucht werden, ob es tendenziell Unterschiede beim Vorkommen der SNPs zwischen Mutationsträger (egal ob präataktisch oder ataktisch) und Kontrollprobanden gab. Bei den SNPs im *PARK2*-Gen und dem SNP G<sup>669</sup>TG/A<sup>669</sup>TG (AS 212) im *ATXN3*-Gen wurde zwischen drei Ausprägungen unterschieden (G/G, A/G und A/A bzw. G/G, C/G und C/C). Bei den SNPs C<sup>987</sup>GG/G<sup>987</sup>GG (AS 318) und TAC<sup>1118</sup>/TAA<sup>1118</sup> (AS 361) im *ATXN3*-Gen konnte für die Mutationsträger zwischen vier Ausprägungen unterschieden werden (G/G, G/C, C/G und C/C bzw. A/A, A/C, C/A und A/A), da es hier notwendig war die mutierten Allele von den nicht mutierten zu trennen. Dabei wurde zuerst das nicht mutierte und an zweiter Stelle das mutierte Allel genannt.

Zuerst wurden die Ergebnisse für die SNPs im *ATXN3*-Gen ausgewertet. Für den SNP G<sup>669</sup>TG/A<sup>669</sup>TG (AS 212) zeigte sich in dieser kleinen Kohorte ein klarer Unterschied zwischen Kontrollprobanden und Mutationsträgern (Abb. 3.3.29 A+B). Während bei Kontrollprobanden nur die Ausprägung G/G und A/G zu jeweils 50% auftraten, zeigten sich bei den Mutationsträgern alle drei Ausprägungen, wobei A/G mit 65% mit Abstand am häufigsten vorkam, gefolgt von A/A mit 20% und G/G mit 15%. Somit kam der SNP bei Mutationsträgern häufiger vor als bei Kontrollprobanden. Bei SNP C<sup>987</sup>GG/G<sup>987</sup>GG (AS 318) ergab sich ein ähnliches Bild (Abb. 3.3.29 C+D). Bei den Kontrollprobanden waren lediglich die Ausprägungen C/C und G/C zu finden. Bei den Mutationsträgern traten alle vier Ausprägungen auf. C/G kam mit 53,85% am häufigsten vor. Die anderen Ausprägungen C/C, G/C und G/G kamen zu je 15,38% vor. Damit gab es den SNP bei Mutationsträgern insgesamt häufiger als bei Kontrollprobanden. Beim SNP TAC<sup>1118</sup>/TAA<sup>1118</sup> (AS 361) zeigten die Kontrollprobanden alle drei

Ausprägungen (Abb. 3.3.29 E). Dabei waren A/C und C/C gleich häufig mit je 40% und A/A mit 20% am seltensten. Bei den Mutationsträgern überwog die Ausprägung C/A mit 53,85% (Abb. 3.3.29 F). A/A war zu 23,08%, A/C zu 15,38% und C/C zu 7,69% nachzuweisen.

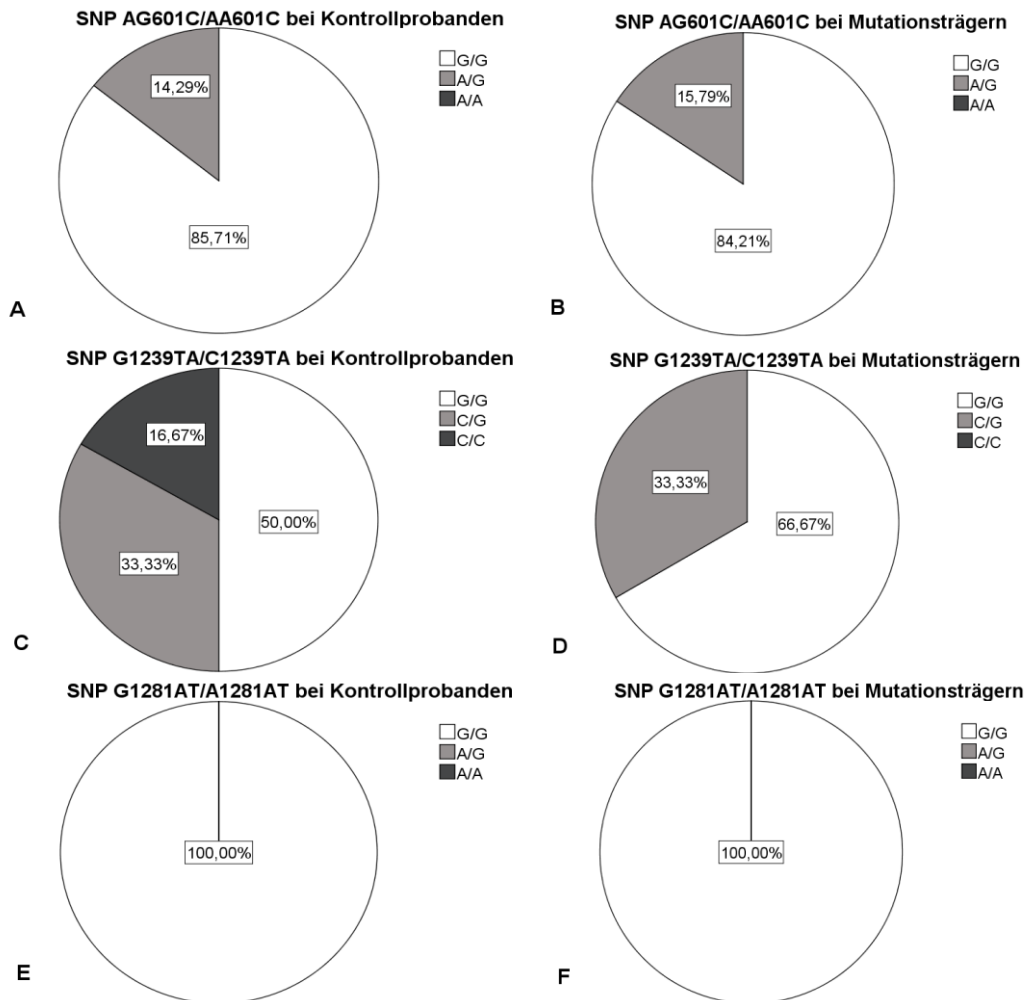


**Abbildung 3.3.29: SNPs im ATXN3-Gen**

A und B zeigen den SNP G669TG/A669TG (AS 212) bei Kontrollprobanden und Mutationsträgern. Bei den Kontrollprobanden traten G/G und A/G zu je 50% auf. Bei den Mutationsträgern kam A/G zu 65%, A/A zu 20% und G/G zu 15% vor. Damit zeigten mehr Mutationsträger den SNP als Kontrollprobanden. Beim SNP C987GG/G987GG (AS 318) ergab sich ein ähnliches Bild (C+D). Kontrollprobanden wiesen nur zwei Ausprägung auf (G/C 60%, C/C 40%). Bei den Mutationsträgern zeigten sich alle vier Ausprägungen. C/G kam zu 53,85% vor und G/G, G/C und C/C zu je 15,38%. Auch trat der SNP häufiger bei Mutationsträgern auf als bei Kontrollen. Beim SNP TAC1118/TAA1118 (AS 361) zeigten die Kontrollprobanden alle drei Ausprägung (A/A zu 20%, A/C und C/C zu je 40%) (E). Bei den Mutationsträgern waren alle vier Ausprägungen zu finden (F). C/A kam zu 53,85% vor, A/A zu 23,08%, A/C zu 15,38% und C/C zu 7,69%.

Die Ergebnisse der SNPs im *PARK2*-Gen ergaben kaum Unterschiede. Beim SNP AG<sup>601</sup>C/AA<sup>601</sup>C (AS 167) zeigten sich bei Kontrollprobanden und Mutationsträgern nur zwei Ausprägungen (G/G und A/G) (Abb. 3.3.30 A+B). Bei den Kontrollprobanden kam G/G zu 85,71% und A/G zu 14,29% vor. Die Verteilung bei den Mutationsträgern war sehr ähnlich mit G/G zu 84,21% und A/G zu 15,79%. Beim SNP G<sup>1239</sup>TA/C<sup>1239</sup>TA (AS 380) hingegen konnte ein Unterschied abhängig vom Genotyp festgestellt werden. Die Kontrollprobanden wiesen alle drei Ausprägungen auf (G/G zu 50%, C/G zu 33,33% und C/C zu 16,67%), wohingegen bei den Mutationsträgern nur zwei Ausprägungen (G/G zu 66,67% und C/G zu 33,33%) zu beobachten waren (Abb. 3.3.30 C+D). Beim SNP G<sup>1281</sup>AT/A<sup>1281</sup>AT (AS 394) konnte wiederum kein Unterschied zwischen Kontrollprobanden und Mutationsträgern festgestellt werden. Beide Gruppen zeigten lediglich die Ausprägung G/G. Somit konnte in dieser Kohorte weder für Kontrollprobanden noch für Mutationsträger der SNP nachgewiesen werden.





**Abbildung 3.3.30: SNPs im *PARK2*-Gen**

Für den SNP AG601C/AA601C (AS 167) zeigte sich bei Kontrollprobanden und Mutationsträgern nur zwei Ausprägungen (G/G und A/G) (A+B). Bei den Kontrollprobanden kam G/G zu 85,71% und A/G zu 14,29% vor. Die Mutationsträger wiesen zu 84,21% G/G und zu 15,79% A/G auf. Beim SNP G1239TA/C1239TA (AS 380) ließen sich deutlichere Unterschiede feststellen. Kontrollprobanden zeigten alle drei Ausprägungen (G/G zu 50%, C/G zu 33,33% und C/C zu 16,67%). Bei den Mutationsträgern waren nur zwei Ausprägungen (G/G zu 66,67% und C/G zu 33,33%) nachweisbar. Der SNP G1281AT/A1281AT (AS 394) konnte weder für Kontrollprobanden noch für Mutationsträger nachgewiesen werden (E+F). Beide Gruppen zeigten lediglich die Ausprägung G/G.

**Tabelle 3.9:** Zusammenfassung der Ergebnisse aus Abschnitt 3.3.4

SNP	Ergebnis
<b>ATXN3-Gen</b>	
G <sup>669</sup> TG/A <sup>669</sup> TG	Bei Kontrollprobanden nur G/G und A/G, bei Mutationsträgern G/G, A/G und A/A
C <sup>987</sup> GG/G <sup>987</sup> GG	Bei Kontrollprobanden nur C/G und C/C, bei Mutationsträgern G/G, G/C, C/G und C/C
TAC <sup>1118</sup> /TAA <sup>1118</sup>	Bei Kontrollprobanden A/A, A/C und C/C, bei Mutationsträgern A/A, A/C, C/A und C/C
<b>PARK2-Gen</b>	
AG <sup>601</sup> C/AA <sup>601</sup> C	Sehr ähnliche Verteilung von G/G und A/G bei Kontrollprobanden und Mutationsträgern, bei beiden kein A/A
G <sup>1239</sup> TA/C <sup>1239</sup> TA	Bei Kontrollprobanden G/G, C/G und C/C, bei Mutationsträgern nur G/G und C/G
G <sup>1281</sup> AT/A <sup>1281</sup> AT	Bei Kontrollprobanden und Mutationsträgern nur G/G

Bei Mutationsträgern im *ATXN3*-Gen vier verschiedene Ausprägungen möglich, da das nicht-mutierte (erstgenannt) von dem mutierten Allel unterschieden werden muss.

## 4 Diskussion

### 4.1 Etablierung des TR-FRET-Assays

#### 4.1.1 Etablierung des TR-FRET-Assays für die Proteinbestimmung in PBMCs

Biomarker spielen in der Beurteilung und Behandlung von vielen Erkrankungen eine immer größer werdende Rolle. Diese Entwicklung zeigt sich auch bei den neurodegenerativen Erkrankungen. Dabei liegt unter anderen ein großes Augenmerk auf biochemische Stoffe wie Proteine. In der Diagnostik und Therapie von bekannten neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson und Chorea Huntington nimmt die Quantifizierung von Erkrankungsproteinen, wie beispielsweise  $\alpha$ -Synuclein bei Morbus Parkinson (Atik et al., 2016) oder Huntingtin bei Chorea Huntington (Zeun et al., 2019), eine immer wichtigere Rolle ein. Aber auch bei nicht so bekannten Erkrankungen wie der SCA3 wird intensiv an verschiedenen Proteinen als mögliche Biomarkern geforscht. Dabei bietet sich zum einen das Erkrankungsprotein Ataxin-3 (*full-length*, d.h. das gesamte Ataxin-3 unabhängig ob mutiert oder nicht) und zum anderen das Protein Parkin als direkter Interaktionspartner von Ataxin-3 an. Im Optimalfall sollten diese Proteine in löslicher Form in relativ einfach und wenig invasiv zugänglichen Biomaterialien messbar sein. Bisher wurden die löslichen Proteine *full-length* Ataxin-3 und Parkin selten in humanen Biomaterialien quantifiziert. Zur Messung der Proteine in lysierten PBMCs ist bisher in der Literatur kaum etwas zu finden. Frau Dr. med. Kathrin Gonsior hat in ihrer Dissertation damit begonnen, einen sensitiven und quantitativen TR-FRET-Assay zur Messung von löslichem *full-length* Ataxin-3 und Parkin in lysierten PBMCs zu etablieren. Dabei hat sie für die Messung von *full-length* Ataxin-3 die beiden Ataxin-3 spezifischen Antikörper 1H9 und N-term (vgl. Abschnitt 1.4 und 2.5) verwendet und zunächst das optimale Verhältnis der jeweiligen Antikörper-Konzentration ermittelt. Die Proteinbestimmungen mit einer Kombination aus N-term-Tb mit einer Konzentration von 0,5 ng/ $\mu$ l und 1H9-D2 mit einer Konzentration von 10 ng/ $\mu$ l ergaben die besten Ergebnisse beim Vergleich von geringstmöglicher Menge an Antikörper und dennoch guter Diskrimination zwischen dem normalem bzw. expandiertem Ataxin-3 und

Kontrolllösungen, die kein Protein enthielten (Med. Doktorarbeit Kathrin Gonsior, (Gonsior et al., 2021)). Für die Messung von Parkin wurden Prk8 und Parkin2 (vgl. Abschnitt 1.4 und 2.5) als Parkin spezifische Antikörper von Frau Dr. Gonsior verwendet. Das optimale Verhältnis der jeweiligen Antikörperkonzentrationen lag bei 0,3 ng/μl Prk8-Tb-Antikörper und 10 ng/μl Parkin2-D2-Antikörper (Med. Doktorarbeit Kathrin Gonsior). Dementsprechend wurde in dieser Doktorarbeit bei allen Messungen diese zuvor etablierten Konzentrationen der jeweiligen Antikörper verwendet.

Um den TR-FRET-Assay als sicheres und solides Messverfahren zur Bestimmung der löslichen Proteine in PBMCs zu etablieren, wurden in dieser Arbeit weitere entscheidende Faktoren analysiert und validiert. Zunächst wurden der Konzentrationsmessbereich und die lineare Korrelation, die zwischen den gemessenen Werten und der tatsächlichen Proteinkonzentration vorliegt, bestimmt. Dabei konnte für die Messung von *full-length* Ataxin-3 ein Messbereich von Proteinkonzentrationen zwischen 0,25 bis 500 ng/μl mit  $r^2$ -Werten für die lineare Korrelation von 0,553 bis 0,811 und für die Messung von Parkin zwischen 0,1 und 100 pg/μl mit einem  $r^2$ -Wert für die lineare Korrelation von 0,997 abgegrenzt werden. Die Spanne bei den  $r^2$ -Werten der linearen Korrelation für Ataxin-3 ergab sich daraus, dass die Bestimmungen sowohl mit expandiertem (70Q,  $r^2=0,553$ ) als auch mit nicht expandiertem Ataxin-3 (15Q,  $r^2=0,811$ ) durchgeführt wurden. Frau Dr. Anna Kaucher hatte im Rahmen ihrer Dissertation ebenfalls Etablierungsarbeiten für einen TR-FRET-Assay zur Messung des expandierten Ataxin-3 Proteins durchgeführt. Dabei hat sie zwei verschiedene Antikörperkombinationen getestet: (a) zum einen den Ataxin-3 spezifischen 1H9-Antikörper mit dem MW1-Antikörper und (b) zum anderen den 1H9-Antikörper mit dem 1C2-Antikörper. Es zeigten sich für beide Kombinationen ein Konzentrationsmessbereich von 1 bis 100 ng/μl mit  $r^2$ -Werten für die lineare Korrelation von 0,822 bis 0,997. Da die beiden Antikörper MW1 und 1C2 erst an Ataxin-3 binden, wenn dieses mehr als 15Q (MW1) bzw. sogar mehr als 37Q (1C2) verfügt (Ko et al., 2001), beziehen sich diese  $r^2$ -Werte auf die Messungen von expandiertem Ataxin-3 (70Q). Verglichen mit dem Konzentrationsmessbereich und den  $r^2$ -Werten für die lineare Korrelation für die

Messung von *full-length* Ataxin-3 ist festzustellen, dass der Konzentrationsbereich für die Messung von *full-length* Ataxin-3 in einem ähnlichen Bereich liegt als der für die Messung von expandiertem Ataxin-3. Der Konzentrationsbereich für die Messung von *full-length* Ataxin-3 ist mit 0,25 bis 500 ng/µl breiter als der für die Messung von expandiertem Ataxin-3 (1 bis 100 ng/µl), während die  $r^2$ -Werte für die lineare Korrelation für die Messung von expandiertem Ataxin-3 mit 0,822 bis 0,997 höher sind als für die Messung von *full-length* Ataxin-3 (0,553 bis 0,811) (Vergleich zur Med. Doktorarbeit von Anna Kaucher). Der TR-FRET-Assay für die Messung von Parkin kann deutlich geringere Proteinmengen (0,1 und 100 pg/µl) nachweisen als TR-FRET-Assays für Ataxin-3 (expandiert oder *full-length*). Der  $r^2$ -Wert der linearen Korrelation liegt in einem ähnlich hohen Bereich wie beim Assay für die Messung von expandiertem Ataxin-3. Der Unterschied im Konzentrationsmessbereich lässt sich am ehesten dadurch erklären, dass bei dessen Bestimmung für Parkin nahezu reines, kommerziell erworbenes Parkin verwendet wurde und für die Bestimmung für Ataxin-3 (expandiert oder *full-length*) eigens hergestellte Zellkultur-Homogenate, in denen entweder das expandierte (70Q) oder das nicht expandierte (15Q) Ataxin-3 überexprimiert vorlag (vgl. Abschnitt 2.3.3.3), verwendet wurden. Zwar konnte mittels Western Blot-Analysen, durchgeführt von Herrn Dr. Jonasz Weber, ein hoher Ataxin-3 Proteingehalt der beiden Zellkultur-Homogenaten gezeigt werden, dennoch befinden sich in Zellkultur-Homogenaten auch weitere Zellinhalte, die die Bindung der Antikörper an Ataxin-3 behindern könnten. Weitere Vergleiche mit anderen Messmethoden bezüglich deren Messbereich und den dazu passenden  $r^2$ -Werten der linearen Korrelation sind kaum möglich, da diese Art von Untersuchung bei den Etablierungsarbeiten anderer Methoden nicht immer dargestellt werden. Bei der Etablierungsarbeit eines SMC-Assays zur Messung von mutiertem Huntingtin wurde ein Konzentrationsmessbereich von 10 bis 1000 ng/µl angegeben, wobei kein  $r^2$ -Wert beim Nachweis einer linearen Korrelation zwischen gemessenem Wert und tatsächlicher Proteinkonzentration angegeben wurde (Fodale et al., 2017). Mit den Messungen zur Bestimmung des Konzentrationsbereiches und den dazu passenden linearen Korrelationen wurde auch der Einfluss der Expansion im

Ataxin-3 Protein auf den TR-FRET-Assay zur Bestimmung von *full-length* Ataxin-3 gezeigt. Die Messungen wurden mit Zellkultur-Homogenaten durchgeführt, in denen entweder das expandierte (70Q) oder das nicht expandierte (15Q) Ataxin-3 überexprimiert vorlag (vgl. Abschnitt 2.3.3.3). Während die Regressionsgeraden der linearen Korrelation die gleiche Steigung bei den beiden Varianten zeigte, gab es jedoch klare Unterschiede beim  $r^2$ -Wert. Der  $r^2$ -Wert für die 15Q Variante lag bei 0,811, der Wert für die 70Q-Variante bei 0,553. Wie bereits erwähnt, befinden sich in Zellkultur-Homogenaten auch weitere Zellinhalte, die die Bindung der Antikörper an Ataxin-3 möglicherweise behindern können. Ein qualitativer Unterschied zwischen den beiden Zellkultur-Homogenaten kann bereits Teil der Ursache für den Unterschied der beiden  $r^2$ -Werte sein. Jedoch liegt auch der Schluss nahe, dass die expandierte Form des Ataxin-3 Proteins einen gewissen Einfluss auf die Messungen mittels des TR-FRET-Assays hat. Dieser Einfluss könnte möglicherweise die bekannte Ausbildung von Aggregaten des expandierten Ataxin-3 Proteins sein. In diesen Aggregaten befindet sich auch die nicht expandierte Form des Proteins (Schmidt et al., 1998). Dies könnte wiederum, je nachdem wie viel nicht expandiertes Protein mit ausfällt, zu Schwankungen bei den Messwerten und dementsprechend einem niedrigeren  $r^2$ -Wert führen. Ein weiterer die Messungen beeinflussender Aspekt könnte eine mögliche Konformationsänderung des Proteins durch die Expansion sein, wodurch einer der beiden oder sogar beide Antikörper, die für den Assay verwendet werden, nicht mehr richtig am Protein binden können. Ein Blick auf die Bindungsstellen der beiden Antikörper gibt hierzu jedoch keine direkte Erklärung. Der 1H9 Antikörper bindet an die Aminosäuren 112 bis 249 des Ataxin-3 Proteins und der N-term Antikörper an die Aminosäuren 1 bis 215 (vgl. Abschnitt 2.5). Somit binden beide Antikörper vor dem von einer möglichen Expansion betroffenen PolyQ-Bereich des Proteins, der erst mit Aminosäure 292 beginnt (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4287> Isoform NM\_004993.6 → NP\_004984.2, erstbeschrieben durch (Paulson and Shakkottai, 1993);).

Das Veränderungen eines Proteins eine Auswirkung auf eine Messmethode haben können, wird durch eine weitere Untersuchung im Rahmen dieser Arbeit

unterstrichen. Auch in den TR-FRET-Assay zur Messung von Parkin wurden zwei unterschiedliche Ausführungen des Proteins eingesetzt. Dazu wurden Bakterienkultur-Homogenate hergestellt, die zum einen das wildtypische Parkin ohne SNP an Basen-Position 1239 und dementsprechend AS-Position 380 (V380) und zum anderen Parkin mit einem SNP an dieser Position (L380) überexprimiert enthalten (vgl. Abs. 2.3.3.3.4). Die beiden Varianten wurden jeweils mit einer Proteinkonzentration von 5 und 50 pg/μl in den Assay eingesetzt. Die Messungen ergaben in beiden Konzentrationen höhere Werte für das wildtypische Parkin (V380). Die Messwerte für das Parkin L380 lagen nur bei 83,3% (50 pg/μl) bzw. sogar nur 66,8% (5 pg/μl) der Messwerte für das wildtypische Parkin V380. Dieser Unterschied könnte teilweise dadurch zu Stande kommen, dass bei den Messungen Bakterienkultur-Homogenate verwendet wurden, in denen die jeweilige Variante des Parkins überexprimiert vorlag, jedoch auch andere Bestandteile der Bakterienzellen vorhanden waren. Das überexprimierte Vorliegen der jeweiligen Parkin-Variante wurde zwar mithilfe einer Gelelektrophorese bestätigt, dennoch könnten die restlichen Bestandteile der Bakterienzellen die Bindung der Antikörper am Protein beeinflussen. Eine derart starke Abweichung der Messwerte für die beiden Parkin-Varianten lässt sich darüber aber nur schwer erklären. Eine weitaus plausible Erklärung dafür liefert hier die Theorie der Konformationsänderung des Proteins durch den AS-Austausch aufgrund des SNPs. Betrachtet man hierzu die Bindungsstellen der Antikörper Prk8-Tb (AS 399-465) und Parkin2-D2 (AS 250-350) und die Position des SNPs (AS 380), ist festzustellen, dass der AS-Austausch von Valin zu Leucin, der die Folge des SNPs ist, zwischen den Bindungsstellen der beiden Antikörper liegt. Eine dadurch resultierende Konformationsänderung könnte die Bindung der Antikörper oder den Energie-Transfer, der zur Messung mittels des TR-FRET-Assays entscheidend ist, erschweren.

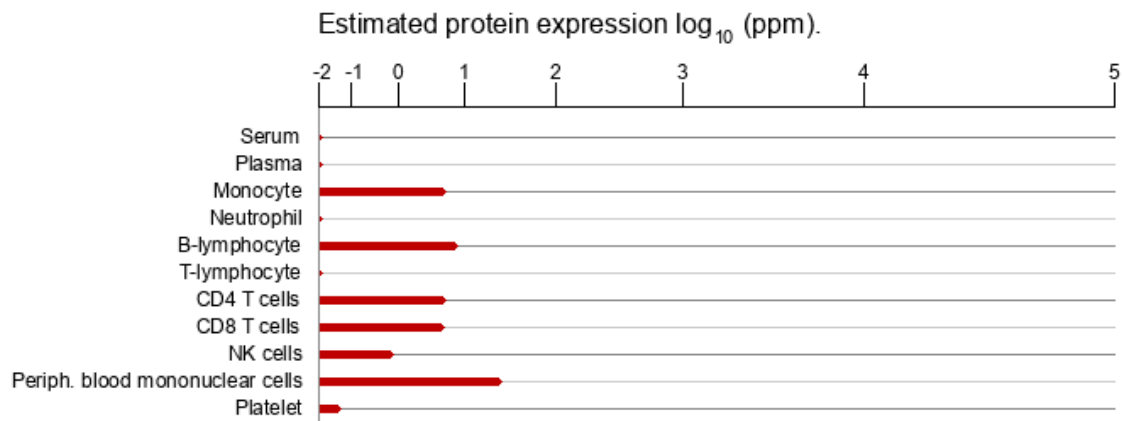
Generell kann die Konformation der Proteine die Proteinbestimmung (egal ob Ataxin-3 oder Parkin) mittels TR-FRET-Assay beeinflussen. Beim TR-FRET-Assay werden die Proteine nicht denaturiert wie beispielsweise bei einem Western Blot und dementsprechend in ihrer natürlichen Konformation gemessen, welche die Bindung der Antikörper prinzipiell erschweren könnte.

Die Reproduzierbarkeit der Assays wurde mittels Intra- und Inter-Platten-Test nachgewiesen. Dabei wurde die gleiche Probe in zwei verschiedenen Verdünnungen auf unterschiedlichen Positionen einer Platte (Intraplattentest) und auf unterschiedlichen Platten (Interplattentest) gemessen. Für die Messung von Ataxin-3 wurde das Zellkultur-Homogenat mit überexprimiertem Ataxin-3 148Q in den Verdünnungen 1:4 und 1:16 verwendet. Das kommerziell erworbene, rekombinante Parkin mit den Konzentrationen 5 pg/ $\mu$ l und 75 pg/ $\mu$ l wurde für die Messung von Parkin genutzt. Beim Intraplattentest für die Messung von *full-length* Ataxin-3 zeigten sich Variationskoeffizienten von 3,4 bis 4,3 %. Auch der Interplattentest erbrachte akzeptable Variationskoeffizienten von 9,9 bis 11,2 %. Für die Messung von Parkin ergaben sich Variationskoeffizienten von 4,85 bis 7,39 % im Intraplattentest und Variationskoeffizienten von 5,39 bis 6,30 % beim Interplattentest. Ähnliche Werte für den Intra- und Interplattentest konnte Anna Kaucher für die TR-FRET-Assays zur Messung von expandiertem Ataxin-3 in Ihrer Doktorarbeit nachweisen (Promotion Anna Kaucher). Die Messungen von expandiertem Ataxin-3 zeigten Variationskoeffizienten von 4,85 bis 6,94 % im Intraplattentest und 8,15 bis 13,91 % im Interplattentest. Verglichen mit anderen hochsensitiven Messmethoden zur Proteinbestimmungen zeigen die TR-FRET-Assays zur Proteinbestimmung in PBMCs eine hohe Übereinstimmung. Beispielsweise werden beim SMC-Immunoassay zur Proteinbestimmung von Ataxin-3 in Liquor und Serumplasma eine Intra-Assay-Variabilität von  $9,2 \pm 3$  % und eine Inter-Assay-Variabilität von sogar  $29,3 \pm 6$  % angegeben (Hubener-Schmid et al., 2021).

In Bezug auf die Anwendung der TR-FRET-Assays zur Bestimmung der Proteine *full-length* Ataxin-3 und Parkin als mögliche Biomarker sind klare Stärken der Assays offensichtlich. PBMCs sind gut und wenig invasiv zu gewinnen. Eine Blutentnahme ist einfacher, schneller und mit weniger Komplikationen durchführbar als zum Beispiel eine Liquorpunktion und wird häufig ohnehin bei der Konsultation eines Arztes durchgeführt. CSF wäre zwar näher am Hirn- und Rückenmarksgewebe und könnte dementsprechend Veränderungen direkter



anzeigen, jedoch wird Ataxin-3 ubiquitär exprimiert. Zudem werden in PBMCs im Vergleich zu anderen Blutbestandteilen die höchsten Proteinkonzentrationen erwartet (Abb. 4.1.1).



**Abbildung 4.1.1:** Erwartete Proteinmenge von Ataxin-3 in verschiedenen Blutbestandteilen

Die Abbildung zeigt die zu erwartende Proteinexpression von Ataxin-3 in verschiedenen Blutbestandteilen. Dabei ist die erwartete Expression von Ataxin-3 in PBMCs am höchsten.

Bildquelle: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ATXN3#expression>, Stand 15.12.2021

Das Gewinnen und Lysieren von PBMCs aus Blut ist ein gut etabliertes Verfahren, das schon lange in vielen Laboren routinemäßig durchgeführt wird. Darüber hinaus ist die Menge an Blut, die zusätzlich entnommen werden muss, gering, da nur geringe Proteinmengen zur Messung notwendig sind. Dementsprechend ist auch die benötigte Antikörpermenge gering. Dieser Fakt ist angesichts der hohen Preise für die Antikörper und die notwendige Fluoreszenzmarkierung nicht zu vernachlässigen. Die Fluoreszenzmarkierung birgt jedoch auch einen der Störfaktoren der Messungen mittels der TR-FRET-Assays. Sie macht die Antikörper lichtempfindlich, weshalb eine hohe Geschwindigkeit beim Pipettieren notwendig ist. Schnelles Pipettieren ist aber auch notwendig, da die Bindung der Antikörper an den Proteinen auch temperaturabhängig (bei 4°C) ist. In der Regel wird jedoch bei Raumtemperatur gearbeitet, da es beim Pipettieren im Rahmen der TR-FRET-Assays eine ruhige Hand braucht, um die teilweise sehr geringen Volumina (teils < 0,5 µl) sauber zu verarbeiten. Demzufolge sind die Assays von der Pipettier-Routine des Anwenders abhängig und es kann zu Unterschieden durch die bearbeitende

Person kommen, da das Verfahren nicht Roboter-gestützt ist. Um diese möglichen Störfaktoren zu verringern, wurden die Proben im Duplikat gemessen. Gelegentlich kam es zu hohen Abweichungen der Duplikate. Messungen von Proben, bei denen die Abweichung der Duplikate über 10 % lag, wurden wiederholt. Bei zukünftigen Anwendungen der TR-FRET-Assays zur Proteinbestimmung ist dieses Vorgehen zu empfehlen. Des Weiteren müssen auch die Gesamtproteinkonzentrationen, die zur Kalkulation der Messwerte eingesetzt werden, beachtet werden. Bei zu hohen Gesamtproteinkonzentrationen können die gemessenen Werte falsch niedrig sein. Bei hohen Gesamtproteinkonzentration ist davon auszugehen, dass auch der Anteil anderer Zellbestandteile in den lysierten PBMCs hoch ist und dadurch die Bindung der Antikörper an den zu messenden Proteinen behindern könnte. Des Weiteren spielt hier auch der *high-dose*-Hook-Effekt eine Rolle. Der Anteil der zumessenden Proteine an der Gesamtproteinkonzentration kann so hoch sein, dass nicht genügend Antikörper in dem Gemisch vorhanden sind, um alle Proteinmoleküle zu detektieren. Die beiden Antikörper binden dann zwar an den zu messenden Proteinen, aber nicht am selben Proteinmolekül, wodurch das zur Messung notwendige Signal ausbleibt (Schiettecatte, 2012).

Zusammenfassend zeigen sich die TR-FRET-Assays zur Proteinbestimmung von *full-length* Ataxin-3 und Parkin in PBMCs als robuste und hochsensitive Messmethoden.

Die in diesem Abschnitt dargestellten Daten bezüglich des TR-FRET-Assays zur Messung von löslichem *full-length* Ataxin-3 und expandiertem Ataxin-3 wurden bereits in Zusammenarbeit mit meinem Arbeitskreis veröffentlicht (Gonsior et al., 2021).

#### **4.1.2 TR-FRET-Assays zur Proteinbestimmung in CSF und anderen Biomaterialien**

Die Messung des Erkrankungsproteins Ataxin-3 und seines direkten Interaktionspartners Parkin ist nicht nur in PBMCs von Interesse für die SCA3-Forschung. Auch in anderen Biomaterialien kann die Bestimmung der beiden Proteine ein wichtiger Ansatz bei der Untersuchung des Erkrankungsproteins und

seiner Interaktionspartner in der Krankheitsprogression aber auch unter einer möglichen Therapie sein. Um zu überprüfen, ob der TR-FRET-Assay auch in anderen Biomaterialien einsetzbar ist, wurde in dieser Doktorarbeit das Verfahren in CSF, iPSCs, Fibroblasten und humanem post-mortem Hirngewebe untersucht.

Für die Analyse von potenziellen Biomarkern in der SCA3 ist vor allem CSF aufgrund seiner unmittelbaren Nähe zum Hirn- und Rückenmarksgewebe von großem Interesse. Dementsprechend wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit die Anwendbarkeit des TR-FRET-Assays in CSF deutlich ausgiebiger überprüft als die Anwendbarkeit in iPSCs, Fibroblasten oder humanem Hirngewebe.

Die Entnahme von CSF ist zwar aufwendiger und invasiver als eine Blutentnahme, jedoch wird sie im klinischen Alltag mittlerweile auch routinemäßig durchgeführt. Da die Proteine direkt in der CSF gemessen werden sollen, entfallen die Zwischenschritte des Verfahrens, die bei anderen Biomaterialien zwischen Entnahme des Biomaterials und der Quantifizierung der Proteine durchgeführt werden müssen. Das bedeutet, dass die Isolation und Lyse, die bei der Proteinbestimmung in PBMCs notwendig ist, obsolet sind. Dadurch entsteht für die Anwendung des Verfahrens in CSF jedoch ein Problem. Zur Durchführung des TR-FRET-Assays bzw. zur Berechnung der Messwerte bedarf es Negativ- und Positivkontrollen. Als Negativkontrolle bei der Messung in PBMCs wurde der Puffer verwendet, der bei der Lyse der PBMCs zum Einsatz kommt. Dieser kann jedoch nicht als Negativkontrolle bei der Messung in CSF verwendet werden, da eine Lyse der CSF-Probe nicht erforderlich ist. Um eine Negativkontrolle zu generieren, wurde zunächst ein Ansatz ähnlich zu bereits publizierten Studien gewählt (Bidinosti et al., 2012, Wild et al., 2015). Den CSF-Proben wurden verschiedene Substanzen hinzugefügt, die anschließend als Negativkontrolle genutzt werden sollten. Insgesamt wurden drei verschiedene Pufferansätze getestet. Zunächst wurden die Pufferansätze nur in den TR-FRET-Assay zur Bestimmung von Ataxin-3 eingesetzt. Jedoch konnte keiner der Ansätze überzeugen. Bei den Messungen waren die Unterschiede zwischen CSF-Proben

und den verschiedenen Pufferansätzen sehr gering. Teilweise waren die für die Pufferansätze erhobenen Werte sogar höher als die der CSF-Proben.

Bei einem weiteren Ansatz, der ebenfalls an die Publikation von Bidinosti et al. angelehnt war, wurde versucht einer *pooled human donor* CSF-Probe das zu messende Protein Ataxin-3 zu entfernen (Bidinosti et al., 2012). Die auf diesem Weg (vgl. 3.2.3) von Ataxin-3 bereinigte CSF-Probe (in dieser Doktorarbeit Kalibrationsmatrix genannt) hätte anschließend als Negativkontrolle dienen sollen. Leider war es uns nicht möglich, trotz verschiedener Protokolle und Adaptionen eine solche Kalibrationsmatrix herzustellen. Die gemessenen Werte der nativen CSF-Probe und die der Kalibrationsmatrices waren nahezu gleich. Bei diesem Ansatz konnte aber gezeigt werden, dass Ataxin-3 in CSF-Proben vorhanden sein muss. Das aus den *pooled human donor* CSF-Proben entfernte Ataxin-3 wurde mit in den TR-FRET-Assay eingesetzt und zeigte deutlich höhere Ataxin-3 Messwerte als die native CSF-Probe oder die Kalibrationsmatrices. Dies wird auch von neuen Studien bestätigt. Mit einem SMC-Immunoassay war es möglich, Ataxin-3 in sehr niedrigen Konzentrationen (Konzentrationsmessbereich des SMC-Immunoassays 0,252 – 427,695 pg/ml) in CSF und Plasma nachzuweisen (Hubener-Schmid et al., 2021). Bei der Etablierung dieses Immunoassays wurde rekombinantes nicht-expandiertes (15Q) als auch expandiertes (62Q) Ataxin-3 eingesetzt und festgestellt, dass der Assay spezifisch mutiertes Ataxin-3 erkennt. Hübener-Schmid und Kollegen haben ebenfalls gezeigt, dass expandiertes Ataxin-3 in CSF-Proben von SCA3-Patienten und präataktischen Mutationsträgern nicht jedoch von gesunden Kontrollprobanden nachweisbar ist. Für die gemessenen Konzentrationen von expandiertem Ataxin-3 in Plasma konnte sogar eine Korrelation zu den klinischen Parametern SARA und AAO festgestellt werden (Hubener-Schmid et al., 2021). Ähnliche Ergebnisse und Zusammenhänge sind in einer anderen Publikation ebenfalls zu finden. Darin wurde eine Meso Scale Discovery (MSD)-Assay verwendet, um expandiertes Ataxin-3 in CSF und Plasma zu messen (Prudencio et al., 2020). Darin werden mittlere Proteinkonzentrationen von expandiertem Ataxin-3 in CSF-Proben von SCA3-Patienten mit 0,13 pg/μl und in Plasma-Proben von SCA3-Probanden mit 1,28 pg/μl angegeben (Prudencio et al., 2020).

Vergleichend wurden bei den beiden Verfahren demzufolge unterschiedliche Proteinkonzentrationen in CSF und Plasma (MSD im niedrigen pg/ $\mu$ l-Bereich, SMC im niedrigen pg/ml-Bereich) von SCA3-Patienten festgestellt. Ursache dafür könnten die Antikörper sein, die bei den Verfahren genutzt werden. Beide Messmethoden nutzen zwar jeweils zwei Antikörper, wovon einer der Ataxin-3 spezifische 1H9-Antikörper ist, jedoch unterscheidet sich der jeweils zweite Antikörper, der im polyQ-Bereich des Ataxin-3 Proteins bindet.

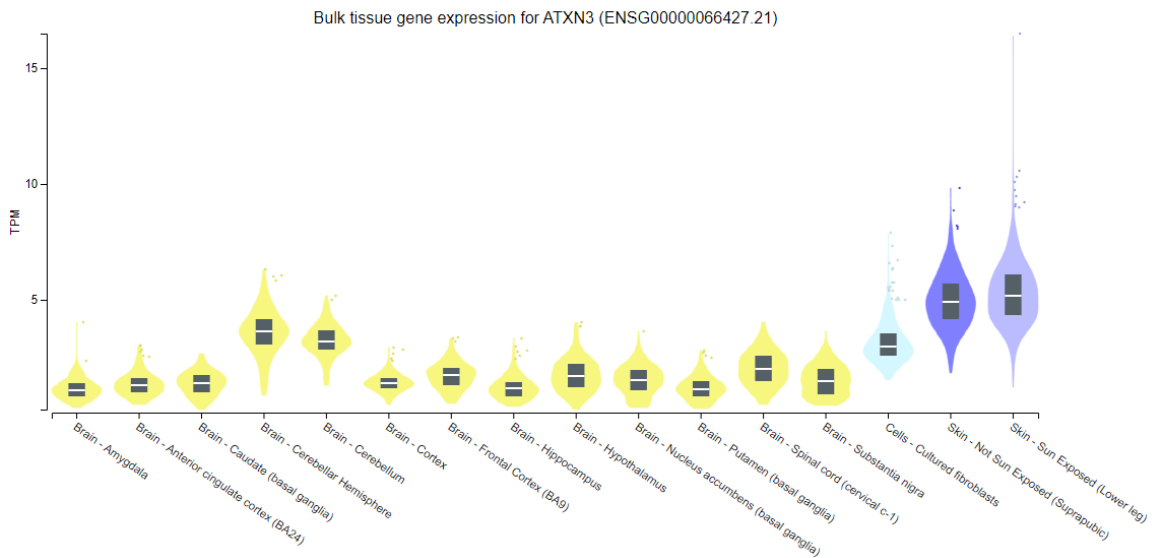
Diese sehr niedrigen Proteinkonzentrationen von Ataxin-3 in CSF oder Plasma (im pg/ $\mu$ l- bzw. pg/ml-Bereich) verglichen mit dem Konzentrationsmessbereich des etablierten TR-FRET-Assays für Ataxin-3 in PBMCs (0,25 – 500 ng/ $\mu$ l) lassen darauf schließen, dass es mit einem TR-FRET-Assay nicht möglich ist, Ataxin-3 in CSF zu quantifizieren. Dies wird durch die erfolglosen Versuche der Etablierung der Messung mittels eines TR-FRET-Assays in dieser Doktorarbeit bestätigt.

Ob Parkin in CSF mittels eines TR-FRET-Assay nachgewiesen werden kann, wurde in dieser Doktorarbeit nicht überprüft. Geht man davon aus, dass Parkin in einer ähnlichen Konzentration in CSF vorliegt wie Ataxin-3 und betrachtet den Konzentrationsmessbereich des TR-FRET-Assays für Parkin in PBMCs (1 – 100 pg/ $\mu$ l), ist es denkbar, dass eine Quantifizierung von Parkin in CSF mittels TR-FRET-Assay möglich wäre.

Um generell zu testen, ob der TR-FRET-Assay zur Proteinbestimmung in anderen Biomaterialien anwendbar ist, wurden in dieser Doktorarbeit die Proteine *full-length* Ataxin-3 und Parkin in iPSCs, Fibroblasten und humanem post-mortem Hirngewebe untersucht. Die Wahl der Biomaterialien wurde maßgeblich von der Verfügbarkeit der Materialien in unserem Institut beeinflusst. Darüber hinaus könnte die Quantifizierung der beiden Proteine in diesen Biomaterialien auch weitere Erkenntnisse beispielsweise über Therapien bzw. Therapiekontrollen (iPSCs und Fibroblasten) oder den Ablauf der Erkrankung (humanes Hirngewebe) liefern.

Betrachtet man die *ATXN3*-Gen Expression, wie sie im GTex-Portal in den drei Biomaterialien beschrieben ist ((Consortium, 2013), GTex Analysis Release V8

(dbGaP Accession phs000424.v8.p2), <https://gtexportal.org/home/gene/ATXN3>, Stand 14.12.2021), dann war zu erwarten, dass in allen drei Biomaterialien Ataxin-3 zu quantifizieren ist (Abb. 4.1.2). Dies konnte durch die Proteinbestimmung von *full-length* Ataxin-3 mittels TR-FRET-Assay bestätigt werden.

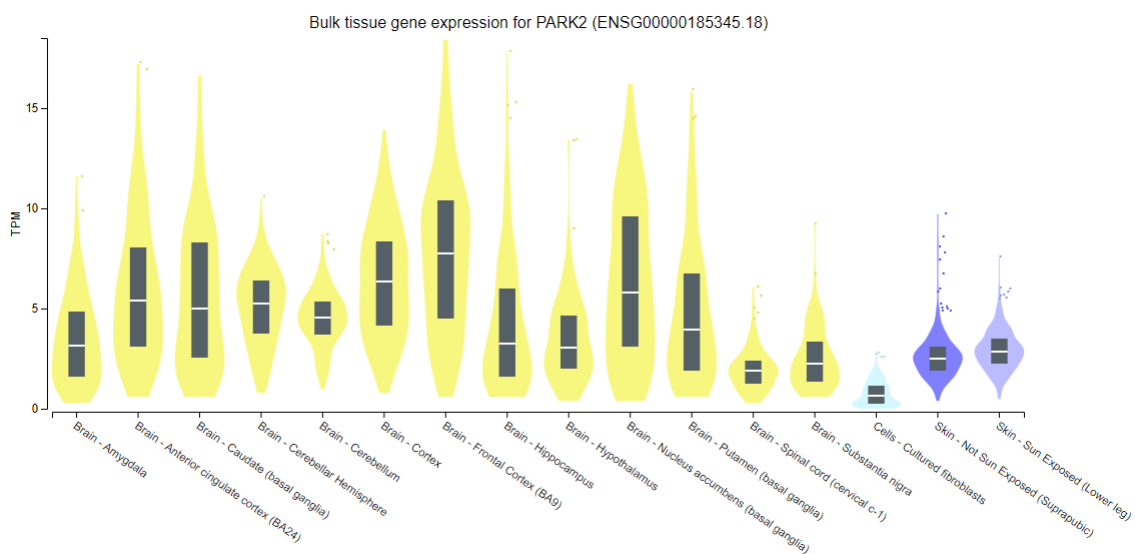


**Abbildung 4.1.2:** Gen-Expression von *ATXN3* in ausgewählten Biomaterialien  
Die Abbildung zeigt die Gen-Expression von *ATXN3* in verschiedenen Strukturen des Gehirns (gelb) und der Haut (blau und grau) bzw. aus der Haut kultivierten Fibroblasten (türkis).  
Bildquelle: <https://gtexportal.org/home/gene/ATXN3>, Stand 14.12.2021

Zusätzlich konnten in allen drei Biomaterialien bei Kontrollprobanden höhere *full-length* Ataxin-3 Konzentrationen als bei SCA3-Probanden festgestellt werden. Ein möglicher Erklärungsansatz dafür ist die Bildung von unlöslichen Aggregaten in humanem Hirngewebe bei PolyQ-Expansionserkrankungen (Legleiter et al., 2010, Adegbuyiro et al., 2017). Die Menge an Ataxin-3, die in Aggregaten ausgefallen ist, ist nicht mehr löslich und steht demzufolge der Quantifizierung mittels TR-FRET-Assay in humanem Hirngewebe nicht zur Verfügung. Dieser Ansatz kann für iPSCs und Fibroblasten jedoch nicht herangezogen werden, da bisher keine Aggregate in iPSCs und Fibroblasten nachgewiesen werden konnten. Die dennoch verringerten Konzentrationen von *full-length* Ataxin-3 bei SCA3-Patienten könnte man jedoch mit einer möglichen Umverteilung der Proteine innerhalb des Körpers erklären. Durch den Ausfall von Ataxin-3 in

Aggregaten im Hirngewebe ist es denkbar, dass der Körper als Gesamtorganismus keine ausreichenden Mengen des Proteins zur Verfügung hat und das vorhandene Protein so umverteilt, dass vor allem die überlebenswichtigen Organe und Zellen genug davon haben. Vorausgesetzt, dass Ataxin-3 in anderen Zellen wichtiger ist als in Fibroblasten, wäre eine solche Umverteilung des Proteins eine mögliche Erklärung für die verringerten Konzentrationen von *full-length* Ataxin-3 in iPSCs und Fibroblasten bei SCA3-Patienten.

Bei der Bestimmung von Parkin in iPSCs, Fibroblasten und humanem Hirngewebe zeigten sich eher kontroverse Ergebnisse. Bei der Betrachtung der Gen-Expression von *PARK2*, wie sie im GTex-Portal in den drei Biomaterialien beschrieben ist ((Consortium, 2013), GTex Analysis Release V8 (dbGaP Accession phs000424.v8.p2), <https://gtexportal.org/home/gene/PARK2>, Stand 14.12.2021), ist ebenfalls zu erwarten, dass das Protein Parkin in den drei Biomaterialien zu quantifizieren ist (Abb. 4.1.3).



**Abbildung 4.1.3:** Gen-Expression von *PARK2* in ausgewählten Biomaterialien  
Die Abbildung zeigt die Gen-Expression von *PARK2* in verschiedenen Strukturen des Gehirns (gelb) und der Haut (blau und grau) bzw. aus der Haut kultivierten Fibroblasten (türkis).  
Bildquelle: <https://gtexportal.org/home/gene/PARK2>, Stand 14.12.2021

In iPSC konnte Parkin sowohl bei den Kontrollprobanden als auch bei den SCA3-Patienten mittels TR-FRET-Assay nachgewiesen werden. Dabei zeigten sich bei

den SCA3-Patienten höhere Werte als bei den Kontrollprobanden. Über die Ursache dafür lässt sich an dieser Stelle nur spekulieren. Möglicherweise wird die Parkin-Produktion als Gegenregulation zur verminderten Ataxin-3 Konzentration bei SCA3-Patienten bzw. generell als Gegenregulation zu den SCA3-Erkrankungsprozessen im Körper erhöht.

In Fibroblasten war es mit dem TR-FRET-Assay nicht eindeutig möglich sowohl bei Kontrollprobanden als auch bei SCA3-Patienten das Protein Parkin zu quantifizieren. Eine mögliche Erklärung dafür liefert die Betrachtung der Gen-Expression von *PARK2* in Fibroblasten, die aus Haut kultiviert wurden, und der Haut selbst (Abb. 4.1.2). Durch die Kultivierung von Fibroblasten sinkt anscheinend die *PARK2*-Expression und demzufolge vermutlich auch die Produktion von Parkin. Da die Fibroblasten-Proben, die zur Proteinbestimmung von Parkin in dieser Doktorarbeit eingesetzt wurden, ebenfalls zuvor kultiviert wurden, könnte die darin enthaltene Proteinkonzentrationen so gering sein, dass sie mittels des TR-FRET-Assays nicht nachgewiesen werden können.

In humanem Hirngewebe zeigten sich bei der Proteinbestimmung von Parkin kontroverse Ergebnisse. Während bei den Kontrollprobanden Parkin eindeutig nachgewiesen werden konnte, zeigte sich bei den SCA3-Patienten eine starke Streuung der Werte von nicht messbar bis sogar höher als bei den Kontrollprobanden. Hierzu lässt sich wieder nur spekulieren, da weitere Daten zu den Gewebespendern fehlen. Möglicherweise war die Erkrankung bei den SCA3-Patienten unterschiedlich weit fortgeschritten. Die Gewebeproben mit hohen Parkin-Konzentrationen könnten zum Beispiel von einem Patienten stammen, der relativ frisch erkrankt war und dementsprechend noch ähnliche Parkin-Konzentrationen wie die Kontrollprobanden aufweisen, während die Gewebeproben mit nicht messbaren Parkin-Konzentrationen von einem Patienten stammen, der schon länger an der Erkrankung gelitten hat. Ein anderer Erklärungsansatz könnte auch das Alter der Kontrollprobanden und Patienten sein. Davon ausgehend, dass die Kontrollprobanden eher ältere Menschen waren, könnten die Gewebeproben mit den ähnlich hohen Parkin-Konzentrationen ebenfalls eher älter gewesen sein. Im Gegensatz dazu könnten dann die Gewebeproben mit den nicht messbaren Parkin-Konzentrationen von



jüngeren SCA3-Patienten stammen. Es wäre aber auch denkbar, dass die Gewebeproben mit den niedrigen oder nicht messbaren Parkin-Konzentrationen von SCA3-Patienten stammen, die zusätzlich zu den typischen SCA3-Symptomen einen Parkinsonismus aufweisen und dementsprechend dem erst später beschriebenen Subtyp 4 der SCA3-Erkrankung (Paulson, 2007) zuzuordnen sind. Eine Mutation im *PARK2*-Gen und ein demzufolge fehlerhaftes Protein Parkin wurden bereits mit der erblichen Form und einem frühen Beginn der Parkinson-Erkrankung in Verbindung gebracht (Kitada et al., 1998, Lohmann et al., 2003). Nicht vorhandenes Parkin bzw. eine verringerte Parkin-Konzentration könnte ähnliche Auswirkungen wie fehlerhaftes Parkin haben und dadurch den Parkinsonismus, der bei einigen SCA3-Patienten beobachtet werden kann, erklären.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der TR-FRET-Assay zur Proteinbestimmung von *full-length* Ataxin-3 und Parkin in weiteren Biomaterialien anwendbar ist. Entscheidend ist letztlich die zu erwartende Proteinkonzentration in den einzelnen Biomaterialien. Darüber hinaus ist der TR-FRET-Assay zur Proteinbestimmung in PBMCs einfacher an Biomaterialien anpassbar, die Zellen enthalten, die zuerst lysiert und somit aufgeschlossen werden müssen. Dadurch kann eine ggf. aufwendige Herstellung einer benötigten Negativkontrolle umgangen werden. Insgesamt bedarf es zur Anwendung des TR-FRET-Assays in weiteren Biomaterialien jedoch noch tiefergehende Etablierungsarbeit.

## **4.2 Analyse der klinischen Parameter mit den Messergebnissen**

### **4.2.1 Analyse der klinischen Parameter**

Bei der Analyse der klinischen Parameter konnten bereits in der Literatur beschriebene Zusammenhänge bestätigt und weitere Tendenzen aufgezeigt werden. Auf diese soll nun im folgenden Kapitel näher eingegangen werden. Zunächst muss jedoch festgestellt werden, dass die Kohorte mit 98 vollständigen Datensätzen gerade für eine seltene Erkrankung wie die SCA3 absolut akzeptabel ist. Andere Kohorten, die sich ebenfalls mit den Spinozerebellären

Ataxien (SCA1, 2, 3 und 6) beschäftigen, beinhalten ähnliche Fallzahlen wie beispielsweise die EUROSCA-Kohorte (insgesamt 525 Patienten davon 139 mit SCA3) (Diallo et al., 2018) oder die RISCA-Kohorte (insgesamt 252 Patienten davon 46 mit SCA3) (Jacobi et al., 2013b). Auch wenn diese Kohorten aus verschiedenen Ländern Patienten rekrutieren, sind sie jedoch teilweise dennoch zu klein, um tendenziell aufgezeigte Zusammenhänge als signifikant bezeichnen zu können. Die Größe der Kohorte erschwert auch das nach bestimmten Vorgaben gematchte Vergleichen der Daten. Beispielsweise ist es nicht möglich Kontrollprobanden mit präataktischen Mutationsträgern oder SCA3-Patienten nach dem Alter gematcht zu vergleichen, da die Kontrollprobanden im Durchschnitt 11 Jahre älter sind als die präataktischen Mutationsträger und diese wiederum 10 Jahre jünger als die SCA3-Patienten sind. Zusätzlich sind die Gruppen auch unterschiedlich groß und einzeln betrachtet (insbesondere die Gruppe der präataktischen Mutationsträger mit n=8) einfach zu klein. Gründe dafür liegen auf der Hand. Kontrollprobanden sind neben den Lebenspartnern von SCA3-Patienten, die dementsprechend meist ähnlich alt sind, häufig im Vergleich zu den SCA3-Patienten (junge) Mitarbeiter der an ESMI beteiligten Institute gewesen. Die präataktischen Mutationsträger sind in der Regel jüngere Angehörige von SCA3-Patienten gewesen und generell auch logischerweise jünger als die SCA3-Patienten, da die Erkrankung erst im Durchschnitt zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr ausbricht (Sequeiros and Coutinho, 1993). Für diese Gruppe weitere Personen zu finden, ist äußerst schwierig, da Angehörige von SCA3-Patienten je nach Verwandtschaftsgrad bei einer autosomal-dominanten Vererbungsweise mit einer Wahrscheinlichkeit von maximal 50 % ebenfalls die Mutation in sich tragen. Da die SCA3 zu den sehr seltenen Erkrankungen zählt und die Prävalenz bei 1-9 von 100 000 liegt (Klockgether et al., 2019), ist es eher selten die Mutation bei einem Menschen, der nicht mit einem SCA3-Patienten verwandt ist, zu finden.

Da die SCA3 autosomal dominant vererbt wird und bisher in der Literatur keine geschlechtsspezifischen Unterschiede für SCA3 Patienten beschrieben sind, wurden zunächst das Alter bei Probenentnahme, AAO, SARA- und INAS-Score dahingehend analysiert. Dabei konnten keine geschlechterspezifischen

Unterschiede festgestellt werden. Eine tiefergehende Analyse ist bei der Größe dieser Kohorte jedoch nicht möglich. Interessant wäre beispielsweise eine Betrachtung des Krankheitsverlaufs getrennt nach Geschlechtern und AAO anhand von SARA, INAS oder CSDP. Eine Aufteilung dieser Kohorte nach Geschlecht und AAO ergibt leider zu kleine Gruppengrößen, um aussagekräftige Vergleiche ziehen zu können. Hierzu bedarf es einer größeren Kohorte.

Da ESMI eine Kohorte darstellt, welche in verschiedenen europäischen Ländern rekrutiert wird, und für nachfolgende (Therapie)-Studien die Kohorte möglichst homogen sein sollte, wurde zu Beginn dieser Arbeit analysiert, ob sich die Einzelkohorten der unterschiedlichen europäischen Partner unterscheiden. Ein erster signifikanter Unterschied zeigte sich bei der Analyse von Alter bei Probenentnahme, AAO, SARA- und INAS-Score getrennt nach den einzelnen erfassenden Zentren (Bonn, Coimbra, London und Tübingen). Während die Parameter Alter bei Probenentnahme, AAO und SARA-Score keine klaren Zentren-spezifischen Unterschiede aufwiesen, zeigten sich beim INAS-Score signifikant höhere Werte für SCA3-Patienten, die in London erfasst wurden, im Vergleich zu SCA3-Patienten, die in Bonn oder Coimbra erfasst wurden. Eine mögliche Erklärung dafür könnte die Abhängigkeit des INAS-Scores von der erhebenden Person sein. Wie bei nahezu allen klinischen Untersuchungen wird der Patient auch beim INAS-Score größtenteils subjektiv und von einer Person beurteilt. Die SCA3-Patienten in London könnten etwas strenger beurteilt worden sein und demzufolge mit einem höheren Wert für den INAS-Score bepunktet worden sein. Möglicherweise hätte ein in London erfasster SCA3-Patient von einem Untersucher aus Bonn oder Coimbra einen niedrigeren INAS-Score erhalten. Neben dieser Abhängigkeit des INAS-Scores vom Untersucher sind aber auch andere Einflüsse denkbar. Ein SNP, der gehäuft bei SCA3-Patienten in London auftritt, könnte beispielsweise bei SCA3-Patienten zu stärker ausgeprägten nicht-ataktischen Symptomen und damit zu höheren Werten beim INAS-Score führen. Da im Rahmen dieser Doktorarbeit die Sequenzierung von möglichen SNPs nicht im Vordergrund stand und dementsprechend nur 21 SCA3-Patienten diesbezüglich untersucht wurden, kann hierzu jedoch keine genauere Analyse erfolgen. Des Weiteren könnten äußere Einflüsse wie Lifestyle

(z.B. Ernährung) oder Umwelteinflüsse (z.B. Wetter/Klima) die Ausprägung nicht-ataktischer Symptome beeinflussen. Dass der Lifestyle einen Einfluss auf ataktische Symptome in der ESMI-Kohorte und damit in SCA3-Patienten haben kann, wurde bereits gezeigt (Hengel et al., 2021). Interessanterweise weisen dabei Patienten mit einem höheren Alkoholkonsum oder höherem *Body Mass Index* (BMI) einen niedrigen SARA-Score auf (Hengel et al., 2021). In einer Studie zu Fibromyalgie konnte gezeigt werden, dass das Wetter sowohl Schmerzen als auch das emotionale Befinden und die damit zusammenhängende Wahrnehmung der Symptome beeinflussen kann (Fagerlund et al., 2019). Ein ähnlicher Zusammenhang von Wetter und nicht-ataktischen Symptomen bzw. deren Wahrnehmung könnte die Zentren-spezifischen Unterschiede beim INAS-Score ebenfalls, zumindest teilweise, erklären. Zur genaueren Analyse eines solchen Zusammenhangs wird jedoch eine gezieltere Datenerhebung benötigt. Beim Betrachten des SARA-Scores aufgeteilt nach Kontrollprobanden, präataktischen Mutationsträgern und SCA3-Patienten wurde gezeigt, dass der SARA-Score von SCA3-Patienten erwartungsgemäß signifikant höher ist als der von Kontrollprobanden und präataktischen Mutationsträgern. Es wurde jedoch auch festgestellt, dass auch präataktische Mutationsträger einen signifikant höheren SARA-Score aufweisen als Kontrollprobanden. Als präsymptomatische Mutationsträger werden Personen bezeichnet, die die Mutation tragen, bei denen jedoch aus subjektiver Patientensicht die Erkrankung noch nicht ausgebrochen ist. Hingegen werden als präataktische Mutationsträger Probanden mit einem SARA-Score von > 2.5 SARA-Punkten bezeichnet. Somit lassen sich anhand des SARA-Scores in präsymptomatischen Mutationsträgern bereits vor dem subjektiven Erkrankungsbeginn erste leichte ataktische Symptome feststellen. Theoretisch könnte man daher über den Zeitpunkt des Erkrankungsbeginns diskutieren (aktuell ab SARA-Score von 3). Der Unterschied zwischen präataktischen Mutationsträgern und Kontrollprobanden ist zwar signifikant, aber sehr gering (Differenz von 0,5 Punkten im Durchschnitt). Dieser halbe Punkt kann jedoch bei einer Untersuchung wie der Erhebung des SARA-Scores, der sowohl vom Untersucher als auch von der Tagesform des Untersuchten abhängig ist, zufällig sein. Auch das Alter der untersuchten Person hat einen Einfluss auf den

SARA-Score. Ältere Personen weisen im Durchschnitt einen höheren SARA-Score auf als jüngere. Dieser Fakt würde wiederum dafürsprechen, dass der Unterschied zwischen präataktischen Mutationsträgern und Kontrollprobanden kein Zufall ist, da die Kontrollprobanden im Durchschnitt 11 Jahre älter sind als die präataktischen Mutationsträger und demzufolge eher höhere SARA-Scores zeigen müssten. Grundsätzlich könnten die präataktischen Mutationsträger auch kurz vor ihrem jeweiligen AAO stehen, was ebenfalls dafürsprechen würde, dass der festgestellte Unterschied nicht zufällig ist. Darüber hinaus ist die Gruppe der präataktischen Mutationsträger sehr klein (n=8). Bereits wenige weitere Personen in dieser Gruppe könnten den aktuell signifikanten Unterschied zu den Kontrollprobanden wieder egalisieren. Eine Diskussion über den Erkrankungsbeginn sollte demnach erst geführt werden, wenn dieser signifikante Unterschied auch in einer größeren Kohorte Bestand hat.

Für die SCA3 ist schon länger bekannt, dass die Anzahl der CAG-Wiederholungen in der DNA von SCA3-Patienten (mutCAG-Anzahl) umgekehrt proportional mit dem AAO und proportional mit der Ausprägung der Erkrankung korreliert (Durr et al., 1996). Diese Zusammenhänge konnten in dieser Doktorarbeit und damit der untersuchten ESMI-Kohorte bestätigt werden. Beim Vergleich von AAO mit der mutCAG-Anzahl zeigte sich eine inverse Korrelation und bei einer Gruppeneinteilung (mutCAG-Anzahl  $\leq$  65, 66-70 und  $>$ 70) ein signifikant fallender AAO bei steigender mutCAG-Anzahl. Dieser Zusammenhang konnte auch in den EUROSCA- und RISCA-Kohorten nachgewiesen werden (Tezenas du Montcel et al., 2014). Der Vergleich von der mutCAG-Anzahl mit der Ausprägung und dem Progress der Erkrankung erfolgte anhand der klinischen Parameter SARA-, INAS-Score und CSDP. Während sich zwischen dem AAO und dem SARA- bzw. INAS-Score nur eine sehr schwache lineare Korrelation ohne Signifikanz zeigte, wurde zwischen AAO und CSDP eine schwache lineare Korrelation festgestellt, die bei einer Gruppeneinteilung (mutCAG-Anzahl  $\leq$  65, 66-70 und  $>$ 70) sogar signifikant war. In der EUROSCA-Kohorte konnte zwar ein Anstieg des SARA-Score bei SCA3-Patienten im Verlauf der Erkrankung gezeigt werden, jedoch wurden keine den Progress beeinflussenden Faktoren identifiziert (Jacobi et al., 2015). Dennoch konnte in

dieser Publikation zumindest für andere Spinocerebelläre Ataxien (SCA1,2 und 6) Faktoren, die den Anstieg des SARA-Scores beeinflussen, identifiziert werden. Für die SCA1 war es unter anderem eine höhere mutCAG-Anzahl. Bei der SCA2 war einer der Faktoren ein früherer Erkrankungsbeginn (Jacobi et al., 2015). In dieser Doktorarbeit wurde für die SCA3 ebenfalls ein möglicher Zusammenhang zwischen dem AAO und dem SARA-, INAS-Score oder CSDP untersucht. Bei den Analysen zeigte sich lediglich eine sehr schwache lineare Korrelation ohne Signifikanz sowohl zwischen AAO und SARA-Score als auch zwischen AAO und INAS-Score. Beim Vergleich von AAO und CSDP konnten hingegen keine Unterschiede festgestellt werden. In Summe sprechen diese Ergebnisse dafür, dass das AAO den Progress der SCA3-Erkrankung nicht entscheidend beeinflusst. Aber auch hier würde eine größere Kohorte genauere Analysen ermöglichen.

#### **4.2.2 *Full-length Ataxin-3* als möglicher Biomarker in der SCA3**

Um zu überprüfen, ob das *full-length Ataxin-3* als möglicher molekularer Biomarker in der SCA3 einsetzbar ist, wurden die gemessenen  $\Delta Fc$ -Werte für das lösliche *full-length Ataxin-3* in PBMCs mit den klinischen Parametern verglichen. Zu Beginn der Analyse wurde ein möglicher Einfluss des Geschlechts oder des erfassenden Zentrums ausgeschlossen. Es zeigten sich weder geschlechtsspezifische noch dem erfassenden Zentrum zuzuordnende Unterschiede bei den  $\Delta Fc$ -Werten für das lösliche *full-length Ataxin-3*. Ein Grund dafür, dass das erfassende Zentrum keinen Einfluss auf den gemessenen Wert hat, könnte die hohe Standardisierung der Entnahme der Biomaterialien im Rahmen des ESMI-Projektes sein. Bei diesen ersten Auswertungen zeigten sich jedoch schon einige teilweise deutliche Ausreißer der gemessenen Werte. Diese deutlichen Ausreißer konnten bei der Einteilung der gemessenen Werte nach Kontrollprobanden, präataktischen Mutationsträgern und SCA3-Patienten alle (zumindest über einem  $\Delta Fc=100$ ) den SCA3-Patienten zugeordnet werden. Bei dieser Einteilung zeigten sich ansonsten keine Unterschiede in den gemessenen *full-length Ataxin-3* Proteinlevel zwischen den verschiedenen Gruppen.

Bei der Betrachtung der gemessenen  $\Delta Fc$ -Werte für das lösliche *full-length* Ataxin-3 bei den SCA3-Patienten im Vergleich mit dem AAO zeigten sich weder Tendenzen noch klare Zusammenhänge. Auch die deutlichen Ausreißer der gemessenen Proteinkonzentrationen verteilten sich auf verschiedene AAO. Ein etwas anderes Bild zeigte sich beim Vergleich der gemessenen  $\Delta Fc$ -Werte für das lösliche *full-length* Ataxin-3 mit der Anzahl der CAG-Wiederholungen (mutCAG-Anzahl). Zwischen den beiden Parametern konnte eine schwache lineare Korrelation festgestellt werden, jedoch ohne Signifikanz. Darüber hinaus nahm die Streuung der  $\Delta Fc$ -Werte mit steigender mutCAG-Anzahl zu. Die deutlichen Ausreißer der gemessenen Proteinkonzentrationen fanden sich zum Großteil um eine mutCAG-Anzahl von ca. 70. Setzt man die Zusammenhänge der  $\Delta Fc$ -Werte für lösliches *full-length* Ataxin-3 mit diesen statischen Parametern in Kontext zu anderen möglichen Biomarkern in der SCA3, zeigen sich teilweise Parallelen. Für das lösliche expandierte Ataxin-3 wurde in Anna Kaucher's Doktorarbeit ebenfalls eine Zunahme der gemessenen  $\Delta Fc$ -Werte bei steigender mutCAG-Anzahl festgestellt. Auch hier wiesen SCA3-Patienten mit einer mutCAG-Anzahl um 70 die höchsten gemessenen Proteinkonzentrationen auf (Promotion Anna Kaucher). Im Gegensatz dazu stehen jedoch die Ergebnisse für den Vergleich mit dem AAO. Während für das lösliche *full-length* Ataxin-3 in dieser Doktorarbeit keine Zusammenhänge mit dem AAO festgestellt wurden, konnte Anna Kaucher in ihrer Doktorarbeit zeigen, dass die gemessenen Proteinkonzentrationen für das lösliche expandierte Ataxin-3 bei einem niedrigen AAO durchschnittlich höher waren als bei einem mittleren AAO. Für SCA3-Patienten mit einem späten AAO wurden hohe expandierte Ataxin-3-Proteinkonzentrationen gemessen (Promotion Anna Kaucher, (Gonsior et al., 2021)). Auch bei einem weiteren möglichen Biomarker in der SCA3 zeigten sich signifikante Zusammenhänge. Bei SCA3-Patienten wurde bei steigender mutCAG-Anzahl höhere Serumlevel der Neurofilament-Leichtketten (NfL) gezeigt, die auch mit dem Fortschreiten der Erkrankung Bestand hatten (Wilke et al., 2020). Das AAO kann anhand der NfL-Serumlevel sogar besser vorausgesagt werden, da die NfL-Serumlevel bei präataktischen Mutationsträgern bis zum Erkrankungsbeginn hin ansteigen und bereits 7,5 Jahre

vor Erkrankungsbeginn gegenüber gleichaltrigen, gleichgeschlechtlichen Kontrollprobanden erhöht sind (Wilke et al., 2020).

In dieser Doktorarbeit wurde auch ein möglicher Zusammenhang der gemessenen  $\Delta Fc$ -Werte für das *full-length* Ataxin-3 mit der Ausprägung und dem Verlauf der Erkrankung untersucht. Dazu wurden die gemessenen Werte mit den klinischen Parametern SARA-, INAS-Score und CSDP verglichen. Bei allen drei Parametern wurde eine schwache lineare Korrelation ohne Signifikanz zu den gemessenen  $\Delta Fc$ -Werte für das lösliche *full-length* Ataxin-3 festgestellt. Zusätzlich wurde bei SARA- und INAS-Score die Streuung der gemessenen  $\Delta Fc$ -Werte mit steigender Punktzahl des jeweiligen Scores größer. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich für das lösliche expandierte Ataxin-3 als möglichen Biomarker in der SCA3. Für den SARA- sowie INAS-Score wurden statistisch signifikante lineare Korrelationen festgestellt (Promotion Anna Kaucher). Auch der Vergleich der  $\Delta Fc$ -Werte für das lösliche expandierte Ataxin-3 in Gruppe aufgeteilt nach dem SARA- bzw. INAS-Score bestätigte diese Zusammenhänge. Für den CSDP konnten hingegen keine Zusammenhänge zu den  $\Delta Fc$ -Werten für das lösliche expandierte Ataxin-3 gefunden werden (Promotion Anna Kaucher). Auch für die Neurofilament-Leichtketten (NfL) zeigten sich ähnliche Zusammenhänge. In zwei unabhängigen Studien wurde bei SCA3-Patienten eine signifikante lineare Korrelation zwischen den NfL-Serumleveln und dem SARA-Score festgestellt (Li et al., 2019, Wilke et al., 2020). In beiden Publikationen wurde darüber hinaus gezeigt, dass die NfL-Serumlevel im Verlauf der Erkrankung ansteigen und dieser Anstieg bereits in präataktischen Mutationsträgern nachweisbar ist (Li et al., 2019, Wilke et al., 2020).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass es interessante Tendenzen und Korrelationen zwischen klinischen Parametern und den gemessenen  $\Delta Fc$ -Werten für das lösliche *full-length* Ataxin-3 gibt. Da jedoch andere mögliche Biomarker deutlichere Zusammenhänge vor allem mit den klinischen Parametern, die den Krankheitsprogress beschreiben, aufweisen, bietet sich das lösliche *full-length* Ataxin-3 gemessen in PBMCs derzeit nicht als prognostischer Biomarker an. Die beschriebenen Zusammenhänge sollten allerdings in einer größeren oder weiteren unabhängigen Kohorte und wenn möglich longitudinal im



Krankheitsverlauf erneut analysiert werden. Ebenso wäre ein Einsatz als Marker zur Beurteilung eines Therapieerfolges denkbar. Bei dem vielversprechenden Therapieansatz des sogenannten „*diseases protein lowering*“ (Evers et al., 2013, Moore et al., 2017, McLoughlin et al., 2020, Martier et al., 2019) könnte beispielweise die Messung des löslichen *full-length* Ataxin-3 in Kombination mit der Messung des löslichen expandierten Ataxin-3 genutzt werden, um zu überprüfen, ob die expandierte Form des Erkrankungsproteins Ataxin-3 verringert wurde, aber zeitgleich das nicht-expandierte Ataxin-3 bestehen bleibt. Generell gilt jedoch, um die Funktion eines Biomarkers erfüllen zu können, müssen die in dieser Doktorarbeit aufgezeigten Tendenzen und Zusammenhänge in einer größeren Kohorte bestätigt werden.

#### **4.2.3 Parkin als möglicher Biomarker in der SCA3**

Die beiden Proteine Parkin und Ataxin-3 sind direkte Interaktionspartner (Bai et al., 2013). Ataxin-3 kann Parkin deubiquitiniere und so den Abbau von Parkin beeinflussen. Expandiertes Ataxin-3 kann somit zu einem vermehrten Abbau von Parkin führen (Durcan and Fon, 2011). Das Auftreten eines Parkinsonismus in einigen SCA3-Patienten könnte möglicherweise durch die Interaktion von Ataxin-3 mit Parkin erklärt werden (Durcan and Fon, 2013). Um zu überprüfen, ob Parkin als möglicher molekularer Biomarker in der SCA3 einsetzbar ist, wurden die gemessenen  $\Delta Fc$ -Werte für das lösliche Parkin in PBMCs mit den klinischen Parametern der analysierten SCA3 Mutationsträger und gesunden Kontrollen verglichen. Auch hier wurde zunächst wie beim Vergleich der Messergebnisse des löslichen *full-length* Ataxin-3 mit den erhobenen klinischen Parametern überprüft, ob das Geschlecht oder das erfassende Zentrum einen Einfluss auf die gemessenen Werte haben. Dabei zeigten sich für männliche Probanden signifikant höhere  $\Delta Fc$ -Werte für das lösliche Parkin als für weibliche Probanden. Bisher wurde in der Literatur ein solcher Unterschied nicht beschrieben, da die Parkin-Proteinlevel bei SCA3-Patienten, aber auch bei Parkinson-Erkrankten bisher kaum quantitativ gemessen wurden. Es ist jedoch bekannt, dass Mutationen im *PARK2*-Gen, das für das Protein Parkin kodiert, die juvenile Form des Parkinsons verursacht (Kitada et al., 1998). In der Literatur zur Parkinson-

Erkrankung werden ebenfalls geschlechterspezifische Unterschiede beschrieben. Beispielsweise werden in einer neuen Studie Unterschiede zwischen Männern und Frauen unter anderem bei Beginn, Verlauf, Ausprägung von motorischen und nicht-motorischen Symptomen und dem generellen Risiko, an Parkinson zu erkranken, identifiziert (Cerri et al., 2019). Da in verschiedenen Modellen bereits gezeigt wurde, dass Parkin eine protektive Wirkung auf Neuronen und Muskelzellen haben kann (Klein et al., 2006, Gousspillou et al., 2018), könnten diese geschlechterspezifischen Unterschiede möglicherweise mit den unterschiedlichen  $\Delta Fc$ -Werte für das lösliche Parkin, zumindest teilweise, in Zusammenhang stehen. Interessanterweise scheint das erfassende Zentrum auch eine Rolle zu spielen. Während die gemessenen Proteinkonzentrationen des löslichen Parkins bei männlichen Probanden aus Bonn, Coimbra und London höher waren als die von weiblichen Probanden, zeigte sich für Probanden aus Tübingen das Gegenteil. Ohne die Aufteilung nach dem Geschlecht waren die gemessenen Proteinkonzentration von Probanden aus London signifikant höher als die von Probanden aus Tübingen (London 19♀ 15♂, Tübingen 12♀ 8♂). Was dafür die Ursache sein könnte, ist schwer zu erklären und rein spekulativ. Dass Unterschiede in der Verarbeitung der Proben ursächlich sein könnten, ist zwar möglich, aber aufgrund der hohen Standardisierung im Rahmen des ESMI-Projektes bei der Gewinnung der Proben eher unwahrscheinlich. Zudem wurde die Proteinbestimmung von allen Proben von einer Person durchgeführt (mir). Wie bereits in Abschnitt 4.2.1 erwähnt, können Umwelteinflüsse und der Lifestyle eine Auswirkung auf klinische Parameter haben. Ob sich solche Einflüsse auch auf Proteinlevel in einem Biomaterial wie PBMCs auswirken können, ist unklar. Klar ist jedoch, dass Umwelteinflüsse und der Lifestyle Auswirkungen auf biochemische Prozesse haben kann. Beispielsweise wird die Produktion von Vitamin D im menschlichen Körper maßgeblich von UV-Strahlen beeinflusst oder eine Veränderung des Lifestyles ist eine Behandlungsmöglichkeit bei z.B. einer arteriellen Hypertonie oder Diabetes mellitus Typ 2. Es ließen sich noch etliche weitere solcher Zusammenhänge aufzählen. Daher ist es durchaus möglich, dass die Erklärung für die Zentrum-abhängigen Unterschiede bei den

gemessenen Proteinkonzentrationen von Parkin in Umwelteinflüssen, dem Lifestyle oder der Ernährung der Probanden liegt.

Bei der Betrachtung der statischen klinischen Parameter AAO und der Anzahl der CAG-Wiederholung im Erkrankungsgen *ATXN3* (mutCAG-Anzahl) im Vergleich zu den gemessenen Proteinkonzentrationen von Parkin waren zwei unterschiedliche Tendenzen erkennbar. Während sich eine schwache inverse Korrelation ohne Signifikanz zwischen dem AAO und den gemessenen  $\Delta Fc$ -Werten zeigte, wurde zwischen der mutCAG-Anzahl und den gemessenen  $\Delta Fc$ -Werten eine schwache lineare Korrelation festgestellt. Auch bei der Streuung der gemessenen Proteinkonzentrationen zeigte sich ein umgekehrtes Verhalten der beiden Parameter. Die Streuung der gemessenen Proteinkonzentrationen nahm mit steigendem AAO ab, während sie bei steigender mutCAG-Anzahl zunahm. Auch ein möglicher Zusammenhang zwischen den gemessenen  $\Delta Fc$ -Werten für das lösliche Parkin und der Ausprägung bzw. dem Progress der Erkrankung wurde in dieser Doktorarbeit untersucht. Dazu wurden die klinischen Parameter SARA- und INAS-Score sowie der CSDP mit den gemessenen Proteinkonzentrationen verglichen. Es zeigten sich interessante und fast schon gegensätzliche Ergebnisse. Während sich für den SARA- und INAS-Score eine schwache lineare Korrelation ohne Signifikanz zu den gemessenen Proteinkonzentrationen zeigte, wurde für die CSDP eine sehr schwache inverse Korrelation ohne Signifikanz festgestellt. Da der SARA-Score im Verlauf der SCA3-Erkrankung zunimmt (Jacobi et al., 2015), widersprechen sich die steigenden  $\Delta Fc$ -Werte für das lösliche Parkin bei steigendem SARA-Score bei eher fallenden Proteinkonzentrationen bei steigendem CSDP. Eine mögliche Auflösung dieses Widerspruches könnte eine longitudinale Messung der  $\Delta Fc$ -Werte für das lösliche Parkin in einer im Optimalfall noch größeren Kohorte erbringen.

Setzt man diese Ergebnisse für den möglichen Biomarker Parkin in Vergleich zu anderen möglichen Biomarkern in der SCA3, sind wie für das *full-length* Ataxin-3 hauptsächlich schwache Korrelationen ohne Signifikanz und Tendenzen festzustellen. Wie bereits im Abschnitt 4.2.2 beschrieben, wurden hingegen für das lösliche expandierte Ataxin-3 (Promotion Anna Kaucher, (Gonsior et al.,

2021)) und die Neurofilament-Leichtketten (NfL) (Li et al., 2019, Wilke et al., 2020) teilweise signifikante Zusammenhänge und lineare Korrelationen zu den klinischen Parametern gezeigt. Daher gilt auch für das lösliche Parkin in PBMCs, dass es eine weiterführende Analyse in einer größeren Kohorte, möglichst auch longitudinal betrachtend, braucht, um die in dieser Doktorarbeit aufgezeigten Zusammenhänge zu bestätigen. Dann könnte Parkin möglicherweise als Verlaufs-Biomarker in der SCA3 interessant werden. Um Parkin als therapeutischen Biomarker in der SCA3 zu nutzen, sind zunächst weitere grundlegende Untersuchungen notwendig. Bisher gibt es keine therapeutischen Ansätze von denen bekannt ist, dass sie die Proteinkonzentration von Parkin beeinflussen. An dieser Stelle ist vor allem die Proteinkonzentration von Parkin bei SCA3-Patienten mit einem Parkinsonismus von großem Interesse. Zusammenhänge zwischen der Proteinkonzentration von Parkin und der Ausprägung eines Parkinsonismus (Paulson, 2007, Park et al., 2015) in diesen SCA3-Patienten hätten nicht nur Auswirkung auf das Verständnis der SCA3, sondern könnten auch für andere neurodegenerative Erkrankungen, allen voran dem Morbus Parkinson, neue Erkenntnisse bringen und neue Therapieansätze aufzeigen. In dieser Doktorarbeit war es leider nicht möglich, diesbezüglich erste grundlegende Analysen durchzuführen, da aus den klinischen Daten, die für die Analyse innerhalb dieser Arbeit zur Verfügung standen, nicht klar hervorgeht, welcher Patient zusätzlich an einem Parkinsonismus leidet. Hier wären vor allem die einzelnen Unterpunkte des INAS-Scores wichtig, um mögliche Parkinson-Symptome einschätzen zu können. Für diese Doktorarbeit lagen jedoch nur die totalen INAS-Scores vor. Außerdem wären Informationen über die Medikation der SCA3-Patienten (z.B. L-DOPA) nötig. Angenommen bei SCA3-Patienten, die in London erfasst wurden, tritt ein Parkinsonismus häufiger auf als bei in Tübingen erfassten SCA3-Patienten, könnten so die Unterschiede bei den Parkin Proteinlevel erklärt werden. Sollte ein Parkinsonismus bei einem Geschlecht häufiger vorkommen, wäre auch dies eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Proteinkonzentrationen bei Frauen und Männern. Um mögliche Zusammenhänge wie diese zu bestätigen, bedarf es einer gezielteren

Datenanalyse im Hinblick auf das Erkennen und Erfassen eines Parkinsonismus in einer idealerweise größeren Kohorte.

#### **4.2.4 Einfluss von SNPs in *ATXN3* und *PARK2* auf die *SCA3***

Ein möglicher Einfluss von SNPs wurde in dieser Doktorarbeit bereits bei der Etablierung des TR-FRET-Assays in Betracht gezogen. Aber auch der generelle Einfluss von SNPs auf die *SCA3*-Erkrankung ist von großem Interesse, da es beispielsweise Ausreißer beim Erkrankungsbeginn oder bei dem Progress der Erkrankung gibt, die man sich mit den bisher bekannten Zusammenhängen nicht erklären kann. Möglicherweise sind solche Ausreißer mit SNPs in Verbindung zu bringen. In dieser Doktorarbeit lag jedoch das Hauptaugenmerk auf anderen Protein-Analysen von *full-length* Ataxin-3 und Parkin. Dementsprechend wurden nur jeweils drei SNPs für das *ATXN3*- und für das *PARK2*-Gen in 32 Proben (8 Kontrollprobanden, 3 präataktische Mutationsträgern, 21 ataktischen *SCA3*-Patienten) untersucht. Aufgrund der geringen Probenanzahl und dem hier durchgeführten Vergleich von SNPs, die auch in einem präataktischen Stadium der Erkrankung vorhanden sind, wurden in dieser Analyse die präataktischen Mutationsträger und die ataktischen *SCA3*-Patienten als Mutationsträger zusammengefasst und als eine Gruppe betrachtet. Für das *ATXN3*-Gen wurden die drei SNPs G<sup>669</sup>TG/A<sup>669</sup>TG (AS 212), C<sup>987</sup>GG/G<sup>987</sup>GG (AS 318) und TAC<sup>1118</sup>/TAA<sup>1118</sup> (AS 361) ausgewählt, da diese bereits zuvor identifiziert wurden und dabei unterschiedliche Häufigkeiten der einzelnen SNPs bei *SCA3*-Patienten und Kontrollprobanden festgestellt wurden (Goto et al., 1997). Für das *PARK2*-Gen wurden die drei SNPs AG<sup>601</sup>C/AA<sup>601</sup>C (AS 167), G<sup>1239</sup>TA/C<sup>1239</sup>TA (AS 380) und G<sup>1281</sup>AT/A<sup>1281</sup>AT (AS 394) ausgewählt, da diese bereits durch Forschungen in der eigenen Arbeitsgruppe identifiziert wurden (Masterarbeit Jonasz Weber, (Lucking et al., 2003)). Für alle SNPs gilt, dass bei Mutationsträgern der zweitgenannte Buchstabe die Variante des mutierten Allels beschreibt.

Bei Betrachtung der Ergebnisse für das *ATXN3*-Gen zeigten sich für alle drei SNPs Unterschiede zwischen Kontrollprobanden und Mutationsträgern. Für den SNP G<sup>669</sup>TG/A<sup>669</sup>TG (AS 212) konnte bei Kontrollprobanden nur die Ausprägungen A/G und G/G (jeweils 50%) festgestellt werden, während bei

Mutationsträgern A/A, A/G und G/G vorkamen (A/A 20%, A/G 65% und G/G 15%). Das bedeutet, dass bei Kontrollprobanden 75% der nicht-mutierten Allele die Variante G aufwiesen. Betrachtet man bei Mutationsträgern das mutierte Allele, zeigten sich ähnliche Prozentwerte (G 80%). Das nicht-mutierte Allel wies bei Mutationsträgern jedoch häufiger die Variante A auf (85%). Beim SNP C<sup>987</sup>GG/G<sup>987</sup>GG (AS 318) wurden bei Kontrollprobanden erneut nur zwei Ausprägung (C/C 40% und G/C 60%). Bei Mutationsträger wurden hingegen alle vier Ausprägungen nachgewiesen (C/C 15,38%, C/G 53,85%, G/C 15,38% und G/G 15,38%). Betrachtet man für diesen SNP die einzelnen Allele, zeigte sich beim nicht-mutierten Allel bei Mutationsträgern und Kontrollprobanden ähnliche Häufigkeiten (C häufiger als G). Im Gegensatz dazu wurde beim mutierten Allel von Mutationsträgern häufiger die Variante G als die Variante C nachgewiesen. Bei diesen beiden SNPs führen die unterschiedlichen Varianten zum Austausch einer Aminosäure im fertigen Protein Ataxin-3, was unterschiedliche Isoformen des Proteins zur Folge hat. Inwiefern die hier aufgezeigten Unterschiede im *ATXN3*-Gen zwischen Kontrollprobanden und Mutationsträgern und den dementsprechend unterschiedlichen Isoformen des Ataxin-3 einen Einfluss auf die SCA3-Erkrankung haben, ist unklar. Es konnte bereits gezeigt werden, dass unterschiedliche Isoformen des Proteins Ataxin-3 unterschiedliche physiologische, aber auch pathophysiologische Charakteristika aufweisen (Weishaupl et al., 2019). Dabei wurde gezeigt, dass eine verkürzte Isoform des Proteins Ataxin-3 häufiger die Expansion im PolyQ-Bereich des *ATXN3*-Gens aufweist (Weishaupl et al., 2019). Der SNP TAC<sup>1118</sup>/TAA<sup>1118</sup> (AS 361) führt durch den Einbau eines STOP-Codons anstelle eines Tyrosins ebenfalls zu einem verkürzten Ataxin-3. In dieser kleinen Kohorte konnte festgestellt werden, dass das mutierte Allel bei den Mutationsträgern zu über 75% die Variante A, die zum verkürzten Ataxin-3 führt, aufweist, während beim nicht-mutierten Allel bei Kontrollprobanden und Mutationsträgern häufiger die Variante C nachgewiesen wurde (jeweils ca. 60%). Somit konnte in dieser kleinen Kohorte bestätigt werden, dass eine verkürzte Isoform des Proteins Ataxin-3 häufiger die Expansion im PolyQ-Bereich des *ATXN3*-Gens aufweist. Die Ergebnisse in dieser kleinen Kohorte sollten zunächst in der gesamten ESMI-Kohorte verifiziert werden.

Dadurch wären auch gezieltere Analysen möglich. Eine Zuordnung der einzelnen Probanden zu den zwei bekannten Haplotypen wäre denkbar (Gaspar et al., 2001). Gezielte Vergleiche der SNPs bzw. Haplotypen mit klinischen Parametern und/oder deutlichen Ausreißern der gemessenen Proteinkonzentrationen von *full-length* Ataxin-3 könnten neue Erkenntnisse bringen. Auch in Bezug auf die Bindungsfähigkeit der Antikörper, die zur Proteinbestimmung von *full-length* Ataxin-3 im TR-FRET-Assay eingesetzt wurden, sind gezielte Analysen sinnvoll, da der SNP G<sup>669</sup>TG/A<sup>669</sup>TG (AS 212) im Bindungsbereich des 1H9-Antikörper (AS 112 – 249) liegt. Betrachtet man die gemessenen Proteinkonzentrationen von *full-length* Ataxin-3 im Vergleich zu den klinischen Parametern gezielt in nach den SNPs gematchten Gruppen, könnten möglicherweise deutlichere und aussagekräftigere Zusammenhänge gezeigt werden.

Bei der Betrachtung der SNPs im *PARK2*-Gen zeigten sich nur geringere Unterschiede zwischen Kontrollprobanden und Mutationsträgern. Für die SNPs AG<sup>601</sup>C/AA<sup>601</sup>C (AS 167) und G<sup>1281</sup>AT/A<sup>1281</sup>AT (AS 394) wurden keine Unterschiede zwischen Kontrollprobanden und Mutationsträgern nachgewiesen. Beim SNP AG<sup>601</sup>C/AA<sup>601</sup>C (AS 167) zeigten sich sowohl bei Kontrollprobanden als auch bei Mutationsträgern nur zwei Ausprägung mit einer sehr ähnlichen Verteilung (A/G mit jeweils ca. 15%, G/G mit jeweils ca. 85%). Beim SNP G<sup>1281</sup>AT/A<sup>1281</sup>AT (AS 394) wurde bei Kontrollprobanden und Mutationsträgern nur die Variante G/G nachgewiesen. Ein geringer Unterschied wurde beim SNP G<sup>1239</sup>TA/C<sup>1239</sup>TA (AS 380) festgestellt. Bei Kontrollprobanden zeigten sich alle drei Varianten (C/C 16,67%, C/G 33,33%, G/G 50%), während sich bei Mutationsträgern nur zwei Ausprägungen zeigten (C/G 33,33%, G/G 66,67%). Aus diesen Ergebnissen Rückschlüsse auf die SCA3-Erkrankung zu ziehen, ist schwierig. Interessant werden die Ergebnisse vor allem in Bezug auf die Bindungsfähigkeit der beiden Antikörper, die im Rahmen des TR-FRET-Assay zur Proteinbestimmung von löslichem Parkin in PBMCs verwendet wurden. Die beiden SNPs G<sup>1239</sup>TA/C<sup>1239</sup>TA (AS 380) und G<sup>1281</sup>AT/A<sup>1281</sup>AT (AS 394) liegen zwischen den beiden Bindungsbereichen der Antikörper (Parkin2 AS 250 – 350, Prk8 AS 399 – 465). Ein durch die SNPs ausgelöster Aminosäuren-Austausch an Position 380 bzw. 394 könnte zu einer Konformationsänderung des Proteins

Parkin führen, die möglicherweise die Bindungsfähigkeit und/oder den Energietransfer der am Protein gebundenen Antikörper (Messprinzip des TR-FRETs in Abschnitt 1.4) beeinflusst. Auch hier sollten die SNPs im *PARK2*-Gen in der gesamten ESMI-Kohorte bestimmt werden, um in gezielten Vergleichen einen möglichen Einfluss auf die Proteinbestimmung des Proteins Parkin zu überprüfen. Bisher schwer erklärbare Zusammenhänge, wie beispielsweise die unterschiedlichen Proteinkonzentrationen von Probanden aus London und Tübingen, könnten möglicherweise entweder direkt durch die SNPs oder einen möglichen Einfluss der SNPs auf die Messmethode erklärt werden.



## 5 Zusammenfassung und Fazit

Die Spinozerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3) ist eine neurodegenerative Erkrankung und ist weltweit die häufigste der autosomal dominant vererbten, zerebellären Ataxien (ADCA) (Bird, 1993, Paulson, 2007, Whaley et al., 2011). Aufgrund intensiver Forschung und international vernetzter Projekte, wie dem ESMI-Projekt, konnten in den letzten Jahren viele Erkenntnisse über die SCA3-Erkrankung gewonnen werden. Dennoch bedarf es weiterer Forschung, um vor allem objektive Biomarker, die mittlerweile in vielen Erkrankungen eine immer größere Rolle spielen, zum weiteren Informationsgewinn zu etablieren. Unter anderem molekulare Biomarker könnten helfen, die Erkrankung tiefergehend zu verstehen. Auch um neue Therapieansätze wie das vielversprechende sogenannte „*Disease protein lowering*“ (Evers et al., 2013, Moore et al., 2017, Martier et al., 2019, McLoughlin et al., 2020) schneller und gezielter überprüfen zu können, sind Biomarker auf Molekülebene notwendig. Um molekulare Biomarker zuverlässig quantifizieren zu können, bedarf es hochsensitiver Messmethoden in möglichst einfach und wenig invasiv erreichbaren Biomaterialien.

In dieser Doktorarbeit konnte der TR-FRET-Assay zur Proteinbestimmung von *full-length* Ataxin-3 und Parkin in PBMCs als hochsensitives und robustes Messverfahren etabliert werden. Dabei wurde auch ein möglicher Einsatz des TR-FRET-Assay in anderen Biomaterialien aufgezeigt. Das Potential von *full-length* Ataxin-3 und Parkin als mögliche molekulare Biomarker in der SCA3 wurde dargestellt. Für beide Proteine sind jedoch weiterführende Analyse in größeren Kohorten notwendig, um deren Eignung als Biomarker in der SCA3 abschließend zu beurteilen. Darüber hinaus zeigten die Ergebnisse für das Protein Parkin neue Zusammenhänge auf, die auch in anderen neurodegenerativen Erkrankungen, insbesondere in der Parkinson-Erkrankung, überprüft werden sollten. Des Weiteren wurde ein möglicher Einfluss von *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) auf die SCA3-Erkrankung, aber auch die Proteinbestimmung mittels TR-FRET-Assay aufgezeigt. Um den Einfluss von SNPs genau beschreiben zu können, sind ausgiebigere und gezielte Analysen in

der gesamten ESMI-Kohorte bzw. einer generell weiteren, größeren Kohorte notwendig.

## 6 Literaturverzeichnis

### Bücher:

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.

### Artikel:

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.

ATIK, A., STEWART, T. & ZHANG, J. 2016. Alpha-Synuclein as a Biomarker for Parkinson's Disease. *Brain Pathol*, 26, 410-8.

BAI, J. J., SAFADI, S. S., MERCIER, P., BARBER, K. R. & SHAW, G. S. 2013. Ataxin-3 is a multivalent ligand for the parkin Ubl domain. *Biochemistry*, 52, 7369-76.

BETTENCOURT, C. & LIMA, M. 2011. Machado-Joseph Disease: from first descriptions to new perspectives. *Orphanet J Rare Dis*, 6, 35.

BETTENCOURT, C., RAPOSO, M., KAZACHKOVA, N., CYMBRON, T., SANTOS, C., KAY, T., VASCONCELOS, J., MACIEL, P., DONIS, K. C., SARAIVA-PEREIRA, M. L., JARDIM, L. B., SEQUEIROS, J. & LIMA, M. 2011. The APOE epsilon2 allele increases the risk of earlier age at onset in Machado-Joseph disease. *Arch Neurol*, 68, 1580-3.

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).

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.

BURNETT, B., LI, F. & PITTMAN, R. N. 2003. The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin-3 binds polyubiquitylated proteins and has ubiquitin protease activity. *Hum Mol Genet*, 12, 3195-205.

- BURNETT, B. G. & PITTMAN, R. N. 2005. The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin 3 regulates aggresome formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 4330-5.
- CERRI, S., MUS, L. & BLANDINI, F. 2019. Parkinson's Disease in Women and Men: What's the Difference? *J Parkinsons Dis*, 9, 501-515.
- CONSORTIUM, G. T. 2013. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nat Genet*, 45, 580-5.
- COOKSON, M. R. 2003. Parkin's substrates and the pathways leading to neuronal damage. *Neuromolecular Med*, 3, 1-13.
- 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. *Sci Rep*, 4, 5601.
- D'ABREU, A., FRANCA, M. C., JR., PAULSON, H. L. & LOPES-CENDES, I. 2010. Caring for Machado-Joseph disease: current understanding and how to help patients. *Parkinsonism Relat Disord*, 16, 2-7.
- DIALLO, A., JACOBI, H., COOK, A., LABRUM, R., DURR, A., BRICE, A., CHARLES, P., MARELLI, C., MARIOTTI, C., NANETTI, L., PANZERI, M., RAKOWICZ, M., SOBANSKA, A., SULEK, A., SCHMITZ-HUBSCH, T., SCHÖLS, L., HENGEL, H., MELEGH, B., FILLA, A., ANTENORA, A., INFANTE, J., BERCIANO, J., VAN DE WARRENBURG, B., TIMMANN, D., BOESCH, S., PANDOLFO, M., SCHULZ, J., BAUER, P., GIUNTI, P., KANG, J. S., KLOCKGETHER, T. & DU MONTCEL, S. T. 2018. Survival in patients with spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6 (EUROSCA): a longitudinal cohort study. *Lancet Neurol*, 17 (4), 327-334.
- DONALDSON, K. M., LI, W., CHING, K. A., BATALOV, S., TSAI, C. C. & JOAZEIRO, C. A. 2003. Ubiquitin-mediated sequestration of normal cellular proteins into polyglutamine aggregates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 8892-7.
- DURCAN, T. M. & FON, E. A. 2011. Mutant ataxin-3 promotes the autophagic degradation of parkin. *Autophagy*, 7, 233-4.
- 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., TRAN, H. D., ZALACHORAS, I., PEPERS, B. A., MEIJER, O. C., DEN DUNNEN, J. T., VAN OMMEN, G. J., AARTSMA-RUS, A. & VAN ROON-MOM, W. M. 2013. Ataxin-3 protein modification as a treatment strategy for spinocerebellar ataxia type 3: removal of the CAG containing exon. *Neurobiol Dis*, 58, 49-56.
- FABER, J., SCHAPRIAN, T., BERKAN, K., REETZ, K., FRANCA, M. C., JR., DE REZENDE, T. J. R., HONG, J., LIAO, W., VAN DE WARRENBURG, B.,

- VAN GAALEN, J., DURR, A., MOCHEL, F., GIUNTI, P., GARCIA-MORENO, H., SCHOELS, L., HENGEL, H., SYNOFZIK, M., BENDER, B., OZ, G., JOERS, J., DE VRIES, J. J., KANG, J. S., TIMMANN-BRAUN, D., JACOBI, H., INFANTE, J., JOULES, R., ROMANZETTI, S., DIEDRICHSEN, J., SCHMID, M., WOLZ, R. & KLOCKGETHER, T. 2021. Regional Brain and Spinal Cord Volume Loss in Spinocerebellar Ataxia Type 3. *Mov Disord*, 36, 2273-2281.
- FAGERLUND, A. J., IVERSEN, M., EKELAND, A., MOEN, C. M. & ASLAKSEN, P. M. 2019. Blame it on the weather? The association between pain in fibromyalgia, relative humidity, temperature and barometric pressure. *PLoS One*, 14, e0216902.
- 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. *J Huntingtons Dis*, 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.
- GASPAR, C., LOPES-CENDES, I., HAYES, S., GOTO, J., ARVIDSSON, K., DIAS, A., SILVEIRA, I., MACIEL, P., COUTINHO, P., LIMA, M., ZHOU, Y. X., SOONG, B. W., WATANABE, M., GIUNTI, P., STEVANIN, G., RIESS, O., SASAKI, H., HSIEH, M., NICHOLSON, G. A., BRUNT, E., HIGGINS, J. J., LAURITZEN, M., TRANEBJAERG, L., VOLPINI, V., WOOD, N., RANUM, L., TSUJI, S., BRICE, A., SEQUEIROS, J. & ROULEAU, G. A. 2001. Ancestral origins of the Machado-Joseph disease mutation: a worldwide haplotype study. *Am J Hum Genet*, 68, 523-8.
- GONSIOR, K., KAUCHER, G. A., PELZ, P., SCHUMANN, D., GANSEL, M., KUHS, S., KLOCKGETHER, T., FORLANI, S., DURR, A., HAUSER, S., RATTAY, T. W., SYNOFZIK, M., HENGEL, H., SCHOLS, L., RIESS, O. H. & HUBENER-SCHMID, J. 2021. PolyQ-expanded ataxin-3 protein levels in peripheral blood mononuclear cells correlate with clinical parameters in SCA3: a pilot study. *J Neurol*, 268, 1304-1315.
- 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.
- GOUSPILLOU, G., GODIN, R., PIQUEREAU, J., PICARD, M., MOFARRAHI, M., MATHEW, J., PURVES-SMITH, F. M., SGARIOTO, N., HEPPLER, R. T., BURELLE, Y. & HUSSAIN, S. N. A. 2018. Protective role of Parkin in skeletal muscle contractile and mitochondrial function. *J Physiol*, 596, 2565-2579.
- HAACKE, A., HARTL, F. U. & BREUER, P. 2007. Calpain inhibition is sufficient to suppress aggregation of polyglutamine-expanded ataxin-3. *J Biol Chem*, 282, 18851-6.
- HANSSON, O., JANELIDZE, S., HALL, S., MAGDALINO, N., LEES, A. J., ANDREASSON, U., NORNGREN, N., LINDER, J., FORSGREN, L., CONSTANTINESCU, R., ZETTERBERG, H., BLENNOW, K. & SWEDISH

- BIO, F. S. 2017. Blood-based NfL: A biomarker for differential diagnosis of parkinsonian disorder. *Neurology*, 88, 930-937.
- HENGEL, H., MARTUS, P., FABER, J., GARCIA-MORENO, H., SOLANKY, N., GIUNTI, P., KLOCKGETHER, T., REETZ, K., VAN DE WARRENBURG, B. P., PEREIRA DE ALMEIDA, L., SANTANA, M. M., JANUARIO, C., SILVA, P., THIEME, A., INFANTE, J., DE VRIES, J., LIMA, M., FERREIRA, A. F., BUSHARA, K., JACOBI, H., ONYIKE, C., SCHMAHMANN, J. D., HUBENER-SCHMID, J., SYNOFZIK, M. & SCHOLS, L. 2021. Characterization of Lifestyle in Spinocerebellar Ataxia Type 3 and Association with Disease Severity. *Mov Disord*.
- HOULDEN, H. & SINGLETON, A. B. 2012. The genetics and neuropathology of Parkinson's disease. *Acta Neuropathol*, 124, 325-38.
- HUBENER-SCHMID, J., KUHLBRODT, K., PELADAN, J., FABER, J., SANTANA, M. M., HENGEL, H., JACOBI, H., REETZ, K., GARCIA-MORENO, H., RAPOSO, M., VAN GAALEN, J., INFANTE, J., STEINER, K. M., DE VRIES, J., VERBEEK, M. M., GIUNTI, P., PEREIRA DE ALMEIDA, L., LIMA, M., VAN DE WARRENBURG, B., SCHOLS, L., KLOCKGETHER, T., SYNOFZIK, M., EUROPEAN SPINOCEREBELLAR ATAXIA TYPE-3/MACHADO-JOSEPH DISEASE INITIATIVE STUDY, G. & RIESS, O. 2021. Polyglutamine-Expanded Ataxin-3: A Target Engagement Marker for Spinocerebellar Ataxia Type 3 in Peripheral Blood. *Mov Disord*, 36, 2675-2681.
- HUBENER, J., VAUTI, F., FUNKE, C., WOLBURG, H., YE, Y., SCHMIDT, T., WOLBURG-BUCHHOLZ, K., SCHMITT, I., GARDYAN, A., DRIESSEN, S., ARNOLD, H. H., NGUYEN, H. P. & RIESS, O. 2011. N-terminal ataxin-3 causes neurological symptoms with inclusions, endoplasmic reticulum stress and ribosomal dislocation. *Brain*, 134, 1925-42.
- 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., PANZERI, M., 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., KANG, J. S., PANDOLFO, M., SCHULZ, J. B., MOLHO, S., DIALLO, A. & KLOCKGETHER, T. 2015. Long-term disease progression in spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6: a longitudinal cohort study. *Lancet Neurol*, 14, 1101-8.
- JACOBI, H., RAKOWICZ, M., ROLA, R., FANCELLU, R., MARIOTTI, C., CHARLES, P., DURR, A., KUPER, M., TIMMANN, D., LINNEMANN, C., SCHOLS, L., KAUT, O., SCHAUB, C., FILLA, A., BALIKO, L., MELEGH, B., KANG, J. S., GIUNTI, P., VAN DE WARRENBURG, B. P., FIMMERS, R. & KLOCKGETHER, T. 2013a. Inventory of Non-Ataxia Signs (INAS): validation of a new clinical assessment instrument. *Cerebellum*, 12, 418-28.
- JACOBI, H., REETZ, K., DU MONTCEL, S. T., BAUER, P., MARIOTTI, C., NANETTI, L., RAKOWICZ, M., SULEK, A., DURR, A., CHARLES, P., FILLA, A., ANTENORA, A., SCHÖLS, L., SCHICKS, J., INFANTE, J., KANG, J. S., TIMMANN, D., DI FABIO, R., MASCIULLO, M., BALIKO, L.,

- MELEGH, B., BOESCH, S., BURK, K., PELTZ, A., SCHULZ, J., DUFAURE-GARE, I. & KLOCKGETHER, T. 2013b. Biological and clinical characteristics of individuals at risk for spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6 in the longitudinal RISCA study: analysis of baseline data. *Lancet Neurol*, 12 (7), 650-658.
- 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.
- KITADA, T., ASAKAWA, S., HATTORI, N., MATSUMINE, H., YAMAMURA, Y., MINOSHIMA, S., YOKOCHI, M., MIZUNO, Y. & SHIMIZU, N. 1998. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, 392, 605-8.
- 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.
- KLEIN, R. L., DAYTON, R. D., HENDERSON, K. M. & PETRUCCELLI, L. 2006. Parkin is protective for substantia nigra dopamine neurons in a tau gene transfer neurodegeneration model. *Neurosci Lett*, 401, 130-5.
- KLOCKGETHER, T., MARIOTTI, C. & PAULSON, H. L. 2019. Spinocerebellar ataxia. *Nat Rev Dis Primers*, 5, 24.
- KO, J., OU, S. & PATTERSON, P. H. 2001. New anti-huntingtin monoclonal antibodies: implications for huntingtin conformation and its binding proteins. *Brain Res Bull*, 56, 319-29.
- 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.
- LI, Q. F., DONG, Y., YANG, L., XIE, J. J., MA, Y., DU, Y. C., CHENG, H. L., NI, W. & WU, Z. Y. 2019. Neurofilament light chain is a promising serum biomarker in spinocerebellar ataxia type 3. *Mol Neurodegener*, 14, 39.
- 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.
- LOHMANN, E., PERIQUET, M., BONIFATI, V., WOOD, N. W., DE MICHELE, G., BONNET, A. M., FRAIX, V., BROUSSOLLE, E., HORSTINK, M. W., VIDAILHET, M., VERPILLAT, P., GASSER, T., NICHOLL, D., TEIVE, H., RASKIN, S., RASCOL, O., DESTEE, A., RUBERG, M., GASPARINI, F., MECO, G., AGID, Y., DURR, A., BRICE, A., FRENCH PARKINSON'S DISEASE GENETICS STUDY, G. & EUROPEAN CONSORTIUM ON GENETIC SUSCEPTIBILITY IN PARKINSON'S, D. 2003. How much phenotypic variation can be attributed to parkin genotype? *Ann Neurol*, 54, 176-85.
- LUCKING, C. B., CHESNEAU, V., LOHMANN, E., VERPILLAT, P., DULAC, C., BONNET, A. M., GASPARINI, F., AGID, Y., DURR, A. & BRICE, A. 2003.

- Coding polymorphisms in the parkin gene and susceptibility to Parkinson disease. *Arch Neurol*, 60, 1253-6.
- LYSENKO, L., GREWAL, R. P., MA, W. & PEDDAREDDYGARI, L. R. 2010. Homozygous Machado Joseph Disease: a case report and review of literature. *Can J Neurol Sci*, 37, 521-3.
- MARTIER, R., SOGORB-GONZALEZ, M., STRICKER-SHAVER, J., HUBENER-SCHMID, J., KESKIN, S., KLIMA, J., TOONEN, L. J., JUHAS, S., JUHASOVA, J., ELLEDEROVA, Z., MOTLIK, J., HAAS, E., VAN DEVENTER, S., KONSTANTINOVA, P., NGUYEN, H. P. & EVERS, M. M. 2019. Development of an AAV-Based MicroRNA Gene Therapy to Treat Machado-Joseph Disease. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 15, 343-358.
- 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.
- MCLOUGHLIN, H. S., MOORE, L. R. & PAULSON, H. L. 2020. Pathogenesis of SCA3 and implications for other polyglutamine diseases. *Neurobiol Dis*, 134, 104635.
- MOORE, L. R., RAJPAL, G., DILLINGHAM, I. T., QUTOB, M., BLUMENSTEIN, K. G., GATTIS, D., HUNG, G., KORDASIEWICZ, H. B., PAULSON, H. L. & MCLOUGHLIN, H. S. 2017. Evaluation of Antisense Oligonucleotides Targeting ATXN3 in SCA3 Mouse Models. *Mol Ther Nucleic Acids*, 7, 200-210.
- MURATA, Y., YAMAGUCHI, S., KAWAKAMI, H., IMON, Y., MARUYAMA, H., SAKAI, T., KAZUTA, T., OHTAKE, T., NISHIMURA, M., SAIDA, T., CHIBA, S., OH-I, T. & NAKAMURA, S. 1998. Characteristic magnetic resonance imaging findings in Machado-Joseph disease. *Arch Neurol*, 55, 33-7.
- NAKANO, K. K., DAWSON, D. M. & SPENCE, A. 1972. Machado disease. A hereditary ataxia in Portuguese emigrants to Massachusetts. *Neurology*, 22, 49-55.
- NARENDRA, D., TANAKA, A., SUEN, D. F. & YOULE, R. J. 2008. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol*, 183, 795-803.
- NGUYEN, H. P., HUBENER, 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.
- NICASTRO, G., MENON, R. P., MASINO, L., KNOWLES, P. P., MCDONALD, N. Q. & PASTORE, A. 2005. The solution structure of the Josephin domain of ataxin-3: structural determinants for molecular recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 10493-8.
- PARK, H., KIM, H. J. & JEON, B. S. 2015. Parkinsonism in spinocerebellar ataxia. *Biomed Res Int*, 2015, 125273.
- PAULSON, H. & SHAKKOTTAI, V. 1993. Spinocerebellar Ataxia Type 3. In: ADAM, M. P., ARDINGER, H. H., PAGON, R. A., WALLACE, S. E., BEAN, L. J. H., MIRZAA, G. & AMEMIYA, A. (eds.) *GeneReviews((R))*. Seattle (WA).



- PAULSON, H. L. 2007. Dominantly inherited ataxias: lessons learned from Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3. *Semin Neurol*, 27, 133-42.
- PAULSON, H. L., DAS, S. S., CRINO, P. B., PEREZ, M. K., PATEL, S. C., GOTSDINER, D., FISCHBECK, K. H. & PITTMAN, R. N. 1997. Machado-Joseph disease gene product is a cytoplasmic protein widely expressed in brain. *Ann Neurol*, 41, 453-62.
- PENG, H., LIANG, X., LONG, Z., CHEN, Z., SHI, Y., XIA, K., MENG, L., TANG, B., QIU, R. & JIANG, H. 2019. Gene-Related Cerebellar Neurodegeneration in SCA3/MJD: A Case-Controlled Imaging-Genetic Study. *Front Neurol*, 10, 1025.
- PRUDENCIO, M., GARCIA-MORENO, H., JANSEN-WEST, K. R., AL-SHAIKH, R. H., GENDRON, T. F., HECKMAN, M. G., SPIEGEL, M. R., CARLOMAGNO, Y., DAUGHRITY, L. M., SONG, Y., DUNMORE, J. A., BYRON, N., OSKARSSON, B., NICHOLSON, K. A., STAFF, N. P., GORCENCO, S., PUSCHMANN, A., LEMOS, J., JANUARIO, C., LEDOUX, M. S., FRIEDMAN, J. H., POLKE, J., LABRUM, R., SHAKKOTTAI, V., MCLOUGHLIN, H. S., PAULSON, H. L., KONNO, T., ONODERA, O., IKEUCHI, T., TADA, M., KAKITA, A., FRYER, J. D., KARREMO, C., GOMES, I., CAVINESS, J. N., PITTELKOW, M. R., AASLY, J., PFEIFFER, R. F., VEERAPPAN, V., EGGENBERGER, E. R., FREEMAN, W. D., HUANG, J. F., UITTI, R. J., WIERENGA, K. J., MARIN COLLAZO, I. V., TIPTON, P. W., VAN GERPEN, J. A., VAN BLITTERSWIJK, M., BU, G., WSZOLEK, Z. K., GIUNTI, P. & PETRUCCELLI, L. 2020. Toward allele-specific targeting therapy and pharmacodynamic marker for spinocerebellar ataxia type 3. *Sci Transl Med*, 12.
- REINDL, W., BALDO, B., SCHULZ, J., JANACK, I., LINDNER, I., KLEINSCHMIDT, M., SEDAGHAT, Y., THIEDE, C., TILLACK, K., SCHMIDT, C., CARDAUN, I., SCHWAGARUS, T., HERRMANN, F., HOTZE, M., OSBORNE, G. F., HERRMANN, S., WEISS, A., ZERBINATTI, C., BATES, G. P., BARD, J., MUNOZ-SANJUAN, I. & MACDONALD, D. 2019. Meso scale discovery-based assays for the detection of aggregated huntingtin. *PLoS One*, 14, e0213521.
- RIESS, O., RUB, U., PASTORE, A., BAUER, P. & SCHOLS, L. 2008. SCA3: neurological features, pathogenesis and animal models. *Cerebellum*, 7, 125-37.
- 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.
- RODRIGUES, A. J., NEVES-CARVALHO, A., TEIXEIRA-CASTRO, A., ROKKA, A., CORTHALS, G., LOGARINHO, E. & MACIEL, P. 2011. Absence of

- ataxin-3 leads to enhanced stress response in *C. elegans*. *PLoS One*, 6, e18512.
- 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.
- RUB, U., BRUNT, E. R., DE VOS, R. A., DEL TURCO, D., DEL TREDICI, K., GIERGA, K., SCHULTZ, C., GHEBREMEDHIN, E., BURK, K., AUBURGER, G. & BRAAK, H. 2004. Degeneration of the central vestibular system in spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3) patients and its possible clinical significance. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 30, 402-14.
- RUB, U., DE VOS, R. A., BRUNT, E. R., SCHULTZ, C., PAULSON, H., DEL TREDICI, K. & BRAAK, H. 2002a. Degeneration of the external cuneate nucleus in spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease). *Brain Res*, 953, 126-34.
- RUB, U., DE VOS, R. A., SCHULTZ, C., BRUNT, E. R., PAULSON, H. & BRAAK, H. 2002b. Spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease): severe destruction of the lateral reticular nucleus. *Brain*, 125, 2115-24.
- 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.
- SCHEEL, H., TOMIUK, S. & HOFMANN, K. 2003. Elucidation of ataxin-3 and ataxin-7 function by integrative bioinformatics. *Hum Mol Genet*, 12, 2845-52.
- SCHMIDT, J., SCHMIDT, T., GOLLA, M., LEHMANN, L., WEBER, J. J., HUBENER-SCHMID, J. & RIESS, O. 2016. In vivo assessment of riluzole as a potential therapeutic drug for spinocerebellar ataxia type 3. *J Neurochem*, 138, 150-62.
- SCHMIDT, T., LANDWEHRMEYER, G. B., SCHMITT, I., TROTTIER, Y., AUBURGER, G., LACCONE, F., KLOCKGETHER, T., VOLPEL, M., EPPLEN, J. T., SCHOLS, L. & RIESS, O. 1998. An isoform of ataxin-3 accumulates in the nucleus of neuronal cells in affected brain regions of SCA3 patients. *Brain Pathology*, 8, 669-679.
- SCHMITT, I., LINDEN, M., KHAZNEH, H., EVERT, B. O., BREUER, P., KLOCKGETHER, T. & WUELLNER, U. 2007. Inactivation of the mouse *Atxn3* (ataxin-3) gene increases protein ubiquitination. *Biochem Biophys Res Commun*, 362, 734-9.
- SCHOLS, L., AMOIRIDIS, G., EPPLEN, J. T., LANGKAFEL, M., PRZUNTEK, H. & RIESS, O. 1996. Relations between genotype and phenotype in German patients with the Machado-Joseph disease mutation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 61, 466-70.
- SCHOLS, L., HAAN, J., RIESS, O., AMOIRIDIS, G. & PRZUNTEK, H. 1998. Sleep disturbance in spinocerebellar ataxias: is the SCA3 mutation a cause of restless legs syndrome? *Neurology*, 51, 1603-7.
- SEQUEIROS, J. & COUTINHO, P. 1993. Epidemiology and clinical aspects of Machado-Joseph disease. *Adv Neurol*, 61, 139-53.
- 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. *J Neurol Sci*, 390, 111-114.
- STAROPOLI, J. F., MCDERMOTT, C., MARTINAT, C., SCHULMAN, B., DEMIREVA, E. & ABELIOVICH, A. 2003. Parkin is a component of an SCF-like ubiquitin ligase complex and protects postmitotic neurons from kainate excitotoxicity. *Neuron*, 37, 735-49.
- SUBRAMONY, S. H. 2007. SARA--a new clinical scale for the assessment and rating of ataxia. *Nat Clin Pract Neurol*, 3, 136-7.
- TAYLOR, J. P., TANAKA, F., ROBITSCHKEK, 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.
- TEZENAS DU MONTCEL, S., DURR, A., RAKOWICZ, M., NANETTI, L., CHARLES, P., SULEK, A., MARIOTTI, C., ROLA, R., SCHOLS, L., BAUER, P., DUFAURE-GARE, I., JACOBI, H., FORLANI, S., SCHMITZ-HUBSCH, T., FILLA, A., TIMMANN, D., VAN DE WARRENBURG, B. P., MARELLI, C., KANG, J. S., GIUNTI, P., COOK, A., BALIKO, L., MELEGH, B., BOESCH, S., SZYMANSKI, S., BERCIANO, J., INFANTE, J., BUERK, K., MASCIULLO, M., DI FABIO, R., DEPONDT, C., RATKA, S., STEVANIN, G., KLOCKGETHER, T., BRICE, A. & GOLMARD, J. L. 2014. Prediction of the age at onset in spinocerebellar ataxia type 1, 2, 3 and 6. *J Med Genet*, 51, 479-86.
- VAN DE WARRENBURG, B. P., VAN GAALEN, J., BOESCH, S., BURGUNDER, J. M., DURR, A., GIUNTI, P., KLOCKGETHER, T., MARIOTTI, C., PANDOLFO, M. & RIESS, O. 2014. EFNS/ENS Consensus on the diagnosis and management of chronic ataxias in adulthood. *Eur J Neurol*, 21, 552-62.
- WAN, N., CHEN, Z., WAN, L., TANG, B. & JIANG, H. 2020. MR Imaging of SCA3/MJD. *Front Neurosci*, 14, 749.
- WANG, Z. 2018. Experimental and Clinical Strategies for Treating Spinocerebellar Ataxia Type 3. *Neuroscience*, 371, 138-154.
- WEISHAUPL, D., SCHNEIDER, J., PEIXOTO PINHEIRO, B., RUESS, C., DOLD, S. M., VON ZWEYDORF, F., GLOECKNER, C. J., SCHMIDT, J., RIESS, O. & SCHMIDT, T. 2019. Physiological and pathophysiological characteristics of ataxin-3 isoforms. *J Biol Chem*, 294, 644-661.
- WELLINGTON, C. L., ELLERBY, L. M., HACKAM, A. S., MARGOLIS, R. L., TRIFIRO, M. A., SINGARAJA, R., MCCUTCHEON, K., SALVESEN, G. S., PROPP, S. S., BROMM, M., ROWLAND, K. J., ZHANG, T., RASPER, D., ROY, S., THORNBERRY, N., PINSKY, L., KAKIZUKA, A., ROSS, C. A., NICHOLSON, D. W., BREDESEN, D. E. & HAYDEN, M. R. 1998. Caspase cleavage of gene products associated with triplet expansion disorders generates truncated fragments containing the polyglutamine tract. *J Biol Chem*, 273, 9158-67.
- 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, 1618-1624.
- WILKE, C., HAAS, E., REETZ, K., FABER, J., GARCIA-MORENO, H., SANTANA, M. M., VAN DE WARRENBURG, B., HENGEL, H., LIMA, M., FILLA, A., DURR, A., MELEGH, B., MASCIULLO, M., INFANTE, J., GIUNTI, P., NEUMANN, M., DE VRIES, J., PEREIRA DE ALMEIDA, L., RAKOWICZ, M., JACOBI, H., SCHULE, R., KAESER, S. A., KUHLE, J., KLOCKGETHER, T., SCHOLS, L., GROUP, S. C. A. N. S., BARRO, C., HUBENER-SCHMID, J. & SYNOFZIK, M. 2020. Neurofilaments in spinocerebellar ataxia type 3: blood biomarkers at the preataxic and ataxic stage in humans and mice. *EMBO Mol Med*, 12, e11803.
- WINBORN, B. J., TRAVIS, S. M., TODI, S. V., SCAGLIONE, K. M., XU, P., WILLIAMS, A. J., COHEN, R. E., PENG, J. & PAULSON, H. L. 2008. The deubiquitinating enzyme ataxin-3, a polyglutamine disease protein, edits Lys63 linkages in mixed linkage ubiquitin chains. *J Biol Chem*, 283, 26436-43.
- WOODS, B. T. & SCHAUMBURG, H. H. 1972. Nigro-spino-dentatal degeneration with nuclear ophthalmoplegia. A unique and partially treatable clinico-pathological entity. *J Neurol Sci*, 17, 149-66.
- WU, X., LIAO, X., ZHAN, Y., CHENG, C., SHEN, W., HUANG, M., ZHOU, Z., WANG, Z., QIU, Z., XING, W., LIAO, W., TANG, B. & SHEN, L. 2017. Microstructural Alterations in Asymptomatic and Symptomatic Patients with Spinocerebellar Ataxia Type 3: A Tract-Based Spatial Statistics Study. *Front Neurol*, 8, 714.
- 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.
- ZEUN, P., SCAHILL, R. I., TABRIZI, S. J. & WILD, E. J. 2019. Fluid and imaging biomarkers for Huntington's disease. *Mol Cell Neurosci*, 97, 67-80.
- ZHANG, C. W., HANG, L., YAO, T. P. & LIM, K. L. 2015. Parkin Regulation and Neurodegenerative Disorders. *Front Aging Neurosci*, 7, 248.
- ZOGHBI, H. Y. & ORR, H. T. 2000. Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci*, 23, 217-47.

## 7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Institut für medizinische Genetik und angewandte Genomik unter Betreuung von Professor Dr. med. Olaf Riess durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Dr. rer. nat. Jeannette Hübener-Schmid. Die Entnahme der Proben und die 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 Dr. rer. nat. Jeannette Hübener-Schmid von mir und teilweise in Zusammenarbeit mit Gabriele-Anna Kaucher durchgeführt. Die Methode der PCR und Sequenzierung für die Polymorphismen-Analyse wurde größtenteils durch die Praktikantin Frau Annika Lambert und ergänzend durch mich und Gabriele-Anna Kaucher durchgeführt. Die Purifikation der DNA aus EDTA-Blut wurde Großteils von Gabriele-Anna Kaucher durchgeführt, während die PCR zur Fragment-Analyse Großteils von mir bearbeitet wurden. Die anschließende Fragment-Längen-Analyse wurde von Frau Alexandra Grenzendorf durchgeführt und von Gabriele-Anna Kaucher und mir zusammen ausgewertet. Die Aufreinigung der PBMC-Proben, sowie die anschließende Gesamtprotein-Bestimmung und Verwaltung der Proben wurden von Gabriele-Anna Kaucher und mir zusammen ausgeführt. Die Arbeiten für die TR-FRET-Assays, die Arbeiten mit HEK-Zellen und E. coli-Bakterien zur Proteinherstellung sowie die Arbeiten zur Herstellung einer CSF-Kalibrationsmatrix wurden allesamt durch mich allein durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig nach Anleitung durch Dr. rer. nat. Jeannette Hübener-Schmid verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 21.01.2022



## 8 Veröffentlichungen

### Paper:

GONSIOR, K., KAUCHER, G. A., PELZ, P., SCHUMANN, D., GANSEL, M., KUHS, S., KLOCKGETHER, T., FORLANI, S., DURR, A., HAUSER, S., RATTAY, T. W., SYNOFZIK, M., HENGEL, H., SCHOLS, L., RIESS, O. H. & HUBENER-SCHMID, J. 2021. PolyQ-expanded ataxin-3 protein levels in peripheral blood mononuclear cells correlate with clinical parameters in SCA3: a pilot study. *J Neurol*, 268, 1304-1315.

### Präsentationen:

*„Ataxin-3 measurements in PBMCs and biofluids“*

Workpackage 4: *biochemical markers*

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

### Poster:

*„Analysis of the protein Parkin as a potential disease biomarker for the Spinocerebellar Ataxia Type 3“*

Posterpräsentation: Kleinhirn- und Hirnstamm-Syndrome

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





## 9 Danksagung

Ich möchte allen danken, die mich bei meiner Doktorarbeit unterstützt haben und/oder mir das Leben dabei erheblich erleichtert haben:

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Olaf Rieß, der mir diese Arbeit ermöglicht hat und mir die Gelegenheit gab, an einem so interessanten und auch internationalen Projekt mitzuwirken. Besonders möchte ich mich für die Möglichkeit der Teilnahme am ESMI-Konsortium auf den Azoren und an der Neurowoche in Berlin bedanken.

Mein Dank gilt ebenfalls der/dem 2. Prüfer/in für die Übernahme der Begutachtung meiner Dissertation.

Auch bei allen Mitwirkenden im Rahmen des ESMI-Projektes möchte ich mich für die Zusammenarbeit bedanken. Dabei gilt mein besonderer Dank Frau Dr. Heike Jacobi, Herrn Dr. Holger Hengel und Herrn Prof. Dr. Ludger Schöls, die mir vor allem die klinischen Aspekte der SCA3-Erkrankung nähergebracht haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei allen SCA3-Patienten, präsymptomatischen Mutationsträgern und Kontrollprobanden bedanken, ohne deren Bereitschaft und Vertrauen diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ein riesengroßes Dankeschön geht an meinen Arbeitskreis und alle anderen Labormitglieder. Abgesehen von der fachlichen Hilfe habt ihr auch die Zeit im Labor um einiges verschönert; eine Zeit, die ich definitiv nicht missen möchte! Insbesondere bei Herrn Dr. Jonasz Weber, Frau Carolina Schröder, Frau Annika Lambert, Frau Doris Flach, Frau Alexandra Grenzendorf und Frau Yvonne Schelling möchte ich mich für die tatkräftige Unterstützung bedanken. Ein ganz besonderer Dank geht dabei an Frau Dr. Anna Kaucher für die unkomplizierte und sehr angenehme Zusammenarbeit sowie an Frau Dr. Katrin Gonsior, ohne deren „Vorarbeit“ in ihrer Doktorarbeit meine Doktorarbeit um einiges aufwendiger und länger geworden wäre.

Des Weiteren möchte ich mich bei all meinen Freunden und Verwandten bedanken; insbesondere meinen Freunden Schwarz, Träger, Mootz und Bauer, den Zocker-Jungs Shinzi, Lotte und LuLu und meinen ehemaligen Mitbewohnern Dennis und Jonas. Ihr habt regelmäßig für Ablenkung gesorgt und mir neue Energie gegeben, um den stressigen Alltag immer wieder aufs Neue angehen zu

können. An dieser Stelle auch einen ganz besonderen Dank an meinen Bruder Alex; du weißt wofür!

Meiner Freundin Jessi gebührt definitiv der größte Respekt und ein riesiges Dankeschön. Meinen Wahnsinn Tag für Tag zu ertragen und trotzdem für mich da zu sein, ist definitiv nicht selbstverständlich. Du bist mein Rückzugsort und mein Ruhepol, egal wie anstrengend und stressig ein Tag auch war. An dieser Stelle auch ein großes Dankeschön an Jessi's Mutter Ilona für die moralische Unterstützung.

Mama, Papa, ihr wisst, wie wichtig ihr für mich seid. Ohne eure emotionale (und auch finanzielle) Unterstützung wäre weder diese Doktorarbeit noch mein Studium überhaupt möglich gewesen.

Und zum Schluss liebe Jeannette: Vielen Dank für alles, vor allem für die absolut notwendigen „Arschritte“ und die schnellsten Korrekturen der Welt! Ohne deine außergewöhnliche Unterstützung würde ich in ein paar Jahren noch an meiner Doktorarbeit sitzen.