

Aus dem Departement für Diagnostische Labormedizin der
Universität Tübingen

Institut für Medizinische Genetik und angewandte Genomik

**Analyse der Rolle von Einzelnukleotid-Polymorphismen
im *Ataxin-3*- und *PARK2*-Gen in der Spinocerebellären
Ataxie Typ 3**

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

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

vorgelegt von

Sturm, Daniel Johannes

2022

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. O. Rieß
2. Berichterstatter: Professor Dr. P. Heutink

Tag der Disputation: 14.10.2021

Soli Deo Gloria

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	VI
Tabellenverzeichnis.....	IX
Abkürzungsverzeichnis	XI
1. Einleitung	1
1.1. Die Spinocerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3)	1
1.2. Geschichte und Epidemiologie.....	2
1.3. Das <i>Ataxin-3</i> -Gen und sein Proteinprodukt.....	3
1.4. Pathobiologie und -physiologie in der SCA3	5
1.5. Klinische Symptomatik der SCA3-Patienten	9
1.6. Diagnostik und Therapie	10
1.7. Parkin und seine Interaktion mit Ataxin-3.....	11
1.8. Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) in Ataxin-3 und <i>PARK2</i>	13
1.9. Die Bedeutung von Biomarkern in der SCA3-Forschung.....	16
1.10. Das ESMI-Projekt.....	18
1.11. Ziele dieser Arbeit	19
2. Material und Methoden	21
2.1. Material	21
2.1.1. Probandenrekrutierung, Probengewinnung und Datenerhebung	21
2.1.2. Chemikalien/Reagenzien	21
2.1.3. Kits	23
2.1.4. <i>Primer</i>	23
2.1.5. Restriktionsendonukleasen	24
2.1.6. Lösungen und Puffer	25
2.1.7. Geräte	26

2.1.8. Verbrauchsmaterialien	26
2.1.9. Softwares	27
2.2. Methoden	27
2.2.1. DNA-Isolation aus Blutproben	27
2.2.2. Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung	28
2.2.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur DNA-Amplifikation	28
2.2.4. Agarose-Gelelektrophorese	31
2.2.5. Gelextraktion	32
2.2.6. Fragmentlängenanalyse mittels spezifischer <i>Primer</i>	33
2.2.6.1. PCR für die Fragmentlängenanalyse	33
2.2.6.2. Fragmentlängenanalyse	35
2.2.7. Sanger-Sequenzierung	36
2.2.7.1. Sequenzierungs-PCR	37
2.2.7.2. Aufreinigung der Sequenzierungs-PCR	38
2.2.7.3. Sequenzierung	39
2.2.8. Restriktionsfragmentlängenanalyse (RFLA)	39
2.2.9. Statistik	41
2.2.9.1. Verwendete Tests zur statistischen Auswertung	41
2.2.9.2. Überprüfung der SNPs auf eine Hardy-Weinberg-Verteilung ...	41
3. Ergebnisse	43
3.1. Kohortenanalyse der ESMI-Kohorte	44
3.1.1. Zusammensetzung der ESMI-Kohorte	44
3.1.2. Untersuchung der Homogenität der demographischen Daten	46
3.1.3. Untersuchung der Homogenität der klinischen Daten	48
3.1.4. Häufigkeit der CAG-Wiederholungen in der ESMI-Kohorte	51
3.1.5. Anzahl der CAG-Wiederholungen und <i>Age at onset</i>	52

3.2. Genotypen-Verteilungen der SNPs	53
3.2.1. <i>ATXN3</i> -SNP Bp 669.....	53
3.2.2. <i>ATXN3</i> -SNP Bp 987	57
3.2.3. <i>ATXN3</i> -SNP Bp 1118.....	64
3.2.4. Kombination der <i>ATXN3</i> -SNPs Bp 987 und Bp 1118.....	70
3.2.5. <i>PARK2</i> -SNP Bp 601.....	73
3.2.6. <i>PARK2</i> -SNP Bp 1239.....	77
3.2.7. <i>PARK2</i> -SNP Bp 1281.....	81
3.3. SNP-Genotypen und ihre Korrelation mit klinischen SCA3-Daten	83
3.3.1. <i>ATXN3</i> -Genotypen und die CAG-Wiederholungsanzahl.....	83
3.3.2. Genotypen der SNPs und <i>Age at onset</i>	85
3.3.3. Genotypen der SNPs und <i>Cross-sectional Disease Progression</i>	87
3.3.4. Genotypen der SNPs und Level des löslichen <i>ATXN3</i> (L- <i>ATXN3</i>)..	90
3.4. L- <i>ATXN3</i> -Level als putativer Biomarker für SCA3.....	94
4. Diskussion.....	97
4.1. Kohortenanalyse der ESMI-Kohorte.....	97
4.2. Genotypen-Verteilung der <i>ATXN3</i> -SNPs	103
4.3. Korrelation der <i>ATXN3</i> -Genotypen mit klinischen SCA3-Daten und den L- <i>ATXN3</i> -Leveln	109
4.4. Verteilung der <i>PARK2</i> -Genotypen und Korrelation mit klinischen SCA3-Daten und den L- <i>ATXN3</i> -Leveln	111
4.5. L- <i>ATXN3</i> -Level als molekularer Biomarker für die SCA3.....	114
4.6. Fazit und Ausblick	116
5. Zusammenfassung.....	119
Literaturverzeichnis	121
Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	138

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	139
------------------	-----

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Schematische Darstellung der Struktur des ATXN3-Proteins.</i>	4
<i>Abbildung 2: Toxisches-Fragment-Hypothese für die Pathogenese von SCA3.</i>	8
<i>Abbildung 3: Proteinstruktur von Parkin und die Interaktion mit Ataxin-3.</i>	12
<i>Abbildung 4: Lokalisation der analysierten SNPs auf dem ATXN3- und PARK2- Gen.</i>	14
<i>Abbildung 5: Workflow dieser Arbeit.</i>	44
<i>Abbildung 6: Geschlechterverhältnis in der ESMI-Kohorte und in den einzelnen Zentren.</i>	47
<i>Abbildung 7: Alter in den ESMI-Zentren, sowie zwischen Kontrollen und Mutationsträger.</i>	48
<i>Abbildung 8: SARA-Score der ataktischen Mutationsträger in den ESMI-Zentren.</i>	49
<i>Abbildung 9: AAO der ataktischen Mutationsträger in den ESMI-Zentren.</i>	50
<i>Abbildung 10: CSDP der ataktische Mutationsträger in den ESMI-Zentren.</i>	51
<i>Abbildung 11: Häufigkeit der CAG-Wiederholungen in der ESMI-Kohorte.</i>	52
<i>Abbildung 12: Korrelation der CAG-Wiederholungsanzahl und des AAOs.</i>	53
<i>Abbildung 13: Verteilung der Genotypen des ATXN3-SNP Bp 669 in der ESMI- Kohorte.</i>	54
<i>Abbildung 14: Genotypen-Verteilungen des ATXN3-SNPs Bp 669 nach Ländern aufgeteilt.</i>	55
<i>Abbildung 15: Exemplarische Ergebnisse von Kontrollgel und Fragmentlängenanalyse für den SNP Bp 987.</i>	58
<i>Abbildung 16: Haplotypen-Verteilung des ATXN3-SNP Bp 987 in der ESMI- Kohorte.</i>	60
<i>Abbildung 17: Verteilungen der Haplotypen des ATXN3-SNPs Bp 987 nach Ländern aufgeteilt.</i>	63
<i>Abbildung 18: Exemplarische Ergebnisse von Kontrollgel und Fragmentlängenanalyse für den SNP Bp 1118.</i>	65
<i>Abbildung 19: Exemplarische Ergebnisse einer Sanger-Sequenzierung für den SNP Bp 1118.</i>	66
<i>Abbildung 20: Haplotypen-Verteilung des ATXN3-SNP Bp 1118 in der ESMI- Kohorte.</i>	67

<i>Abbildung 21: Verteilungen der Haplotypen des ATXN3-SNP Bp 1118 nach Ländern aufgeteilt.....</i>	<i>68</i>
<i>Abbildung 22: Verteilung der kombinierten Haplotypen der ATXN3-SNPs Bp 987 und Bp 1118 in der ESMI-Kohorte.....</i>	<i>71</i>
<i>Abbildung 23: Verteilungen der kombinierten Haplotypen der ATXN3-SNPs Bp 987 und Bp 1118 nach Ländern aufgeteilt.....</i>	<i>72</i>
<i>Abbildung 24: Exemplarische Ergebnisse einer Restriktionsfragmentlängenanalyse für den SNP Bp 601.....</i>	<i>74</i>
<i>Abbildung 25: Verteilung der Genotypen des PARK2-SNP Bp 601 in der ESMI-Kohorte.....</i>	<i>75</i>
<i>Abbildung 26: Genotypen-Verteilungen des PARK2-SNPs Bp 601 nach Ländern aufgeteilt.....</i>	<i>76</i>
<i>Abbildung 27: Exemplarische Ergebnisse einer Restriktionsfragmentlängenanalyse für den SNP Bp 1239.....</i>	<i>78</i>
<i>Abbildung 28: Genotypen-Verteilung des PARK2-SNPS Bp 1239 in der ESMI-Kohorte.....</i>	<i>79</i>
<i>Abbildung 29: Genotypen-Verteilungen des PARK2-SNP Bp 1239 nach Ländern aufgeteilt.....</i>	<i>80</i>
<i>Abbildung 30: Exemplarische Ergebnisse einer Restriktionsfragmentlängenanalyse für den SNP Bp 1281.....</i>	<i>82</i>
<i>Abbildung 31: Verteilung der Genotypen des PARK2-SNPs Bp 1281 in der azoreanischen Kohorte und den restlichen ESMI-Zentren.....</i>	<i>83</i>
<i>Abbildung 32: Haplotypen der SNPs Bp 987 und Bp 1118 und die assoziierte Anzahl der CAG-Wiederholungen.....</i>	<i>84</i>
<i>Abbildung 33: Geno-/Haplotypen der ATXN3-SNPs und das assoziierte AAO der Studienteilnehmer.....</i>	<i>86</i>
<i>Abbildung 34: Genotypen der PARK2-SNPs und das assoziierte AAO der Studienteilnehmer.....</i>	<i>87</i>
<i>Abbildung 35: Geno-/Haplotypen der ATXN3-SNPs und die assoziierte CSDP der Studienteilnehmer.....</i>	<i>89</i>
<i>Abbildung 36: Genotypen der PARK2-SNPs und die assoziierte CDSP der Studienteilnehmer.....</i>	<i>90</i>
<i>Abbildung 37: L-ATXN3-Level bei Kontrollen, nicht ataktischen und ataktischen Mutationsträgern.....</i>	<i>92</i>

<i>Abbildung 38: Geno-/Haplotypen der ATXN3-SNPs und die assoziierten L-ATXN3-Protein-Level.....</i>	<i>93</i>
<i>Abbildung 39: Genotypen der PARK2-SNPs und die assoziierten L-ATXN3-Level.</i>	<i>94</i>
<i>Abbildung 40: L-ATXN3-Level in den ESMI-Zentren.</i>	<i>95</i>
<i>Abbildung 41: L-ATXN3-Level und SARA-Score.</i>	<i>96</i>

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Übersichtsdarstellung der analysierten SNPs</i>	15
<i>Tabelle 2: Verzeichnis aller verwendeten Chemikalien/Reagenzien</i>	21
<i>Tabelle 3: Verwendete Kits</i>	23
<i>Tabelle 4: Auflistung der Primer für die Fragmentlängenanalyse mittels spezifischer Primer</i>	23
<i>Tabelle 5: Primer für die Sanger-Sequenzierung</i>	24
<i>Tabelle 6: Auflistung der Primer für die Restriktionsfragmentlängenanalyse</i>	24
<i>Tabelle 7: Verwendete Restriktionsendonukleasen für den Restriktionsenzymverdau</i>	24
<i>Tabelle 8: Verzeichnis aller verwendeten Lösungen und Puffer</i>	25
<i>Tabelle 9: Verzeichnis aller verwendeten Geräte</i>	26
<i>Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien</i>	26
<i>Tabelle 11: Verwendete Softwares für die Datenauswertung und Literaturverwaltung</i>	27
<i>Tabelle 12: Reaktionsansatz der PCR für die Sanger-Sequenzierung</i>	29
<i>Tabelle 13: Reaktionsansatz der PCR für die Restriktionsfragmentlängenanalysen</i> ...	29
<i>Tabelle 14: PARK2-SNPs und das jeweilige Primer-Paar für die PCR</i>	30
<i>Tabelle 15: Thermocycler-Programm der Touchdown-PCR für die Sanger- Sequenzierung</i>	30
<i>Tabelle 16: Thermocycler-Programm der PCR für die Restriktionsfragmentlängenanalysen</i>	31
<i>Tabelle 17: Fluoreszenzmarkierungen der entsprechenden SNP-Varianten</i>	33
<i>Tabelle 18: Reaktionsansatz der PCR für die Fragmentlängenanalyse des ATXN3-SNP Bp 987</i>	34
<i>Tabelle 19: Reaktionsansatz der PCR für die Fragmentlängenanalyse des ATXN3-SNP Bp 1118</i>	34
<i>Tabelle 20: Thermocycler-Programm der PCR für die Fragmentlängenanalysen</i>	34
<i>Tabelle 21: Thermocycler-Programm der Touchdown-PCR für die Fragmentlängenanalyse</i>	35
<i>Tabelle 22: Beladung der Wells der Probenplatten für die Fragmentlängenanalyse</i>	36
<i>Tabelle 23: Einstellungen des Frag2-Programms im CEQ™8000 Genetic Analysis System</i>	36
<i>Tabelle 24: Reaktionsansatz der Sequenzierungs-PCR</i>	38

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 25: Thermocycler-Programm der Sequenzierungs-PCR.....</i>	<i>38</i>
<i>Tabelle 26: Einstellungen des LFR-b-Programms im CEQ™8000 Genetic Analysis System</i>	<i>39</i>
<i>Tabelle 27: Übersicht der SNPs und ihrer Restriktionsendonukleasen.....</i>	<i>40</i>
<i>Tabelle 28: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für den Restriktionsenzymverdau</i>	<i>40</i>
<i>Tabelle 29: Zusammensetzung der ESMI-Kohorte.....</i>	<i>45</i>
<i>Tabelle 30: Genotypen des PARK2-SNPs Bp 601 und die erwarteten Fragmentlängen beim Restriktionsenzymverdau</i>	<i>74</i>
<i>Tabelle 31: Genotypen des PARK2-SNPs Bp 1239 und die zu erwartenden Fragmentlängen beim Restriktionsenzymverdau</i>	<i>78</i>
<i>Tabelle 32: Genotypen des PARK2-SNPs Bp 1281 und die zu erwartenden Fragmentlängen beim Restriktionsenzymverdau</i>	<i>82</i>
<i>Tabelle 33: Die ESMI-Kohorte im Vergleich mit EuroSCA- und RISCA-Kohorte</i>	<i>98</i>
<i>Tabelle 34: Zwischen den ESMI-Zentren verglichene Merkmale.....</i>	<i>101</i>
<i>Tabelle 35: Allelfrequenzen der ATXN3-SNPs in der ESMI-Kohorte und in der weltweiten Haplotypstudie von Gaspar et al. 2001</i>	<i>106</i>
<i>Tabelle 36: Allelfrequenz der kombinierten Haplotypen der ATXN3-SNPs Bp 987 und Bp 1118 für die expandierten Allele in der ESMI-Kohorte</i>	<i>108</i>
<i>Tabelle 37: Verteilung der Genotypen der PARK2-SNPs in der ESMI-Kohorte und in europäischen Kohorten aus der Literatur</i>	<i>113</i>

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AAO	<i>Age at onset</i>
ADCA	Autosomale dominante cerebelläre Ataxie
Arg	Arginin
ARJP	Autosomal-rezessiv vererbtes juveniles Parkinsonsyndrom
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
ASO	Antisense-Oligonukleotide
Asp	Asparaginsäure
atakt.	ataktisch
ATXN3	Ataxin-3-Protein
ATXN3	<i>Ataxin-3-Gen</i>
Az	Azoren
Bo	Bonn
Bp	Basenpaar
C	Cytosin
CCFS	<i>Composite cerebellar functional severity score</i>
Co	Coimbra
CPT™	<i>Cell Preparation Tube</i>
CSDP	<i>Cross-sectional Disease Progression</i>
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERAD	Endoplasmatisches Retikulum assoziierte Degradation
ESMI	<i>European Spinocerebellar Ataxia Type 3/Machado-Joseph Disease Initiative</i>
EtBr	Ethidiumbromid
exp.	expandiert
f	Allelfrequenz
f _g	Allelfrequenz global
G	Guanin
Gly	Glycin
IBR	<i>in-between RING</i>
ICARS	<i>International Cooperative Ataxia Rating Scale</i>
INAS	<i>Inventory of Non-Ataxia signs</i>
K	<i>keto</i> (Guanin oder Thymin)
kDa	Kilodalton
Kb	Kilobasen
L-ATXN3	lösliches ATXN3
Leu	Leucin
Lo	London
M	<i>amino</i> (Adenin oder Cytosin)
Met	Methionin
MJD	<i>Machado-Joseph disease</i>
MM	<i>Mastermix</i>
mRNA	<i>messenger Ribonucleic acid</i>
N	<i>any</i> (Adenin oder Cytosin oder Guanin oder Thymin)
NES	nukleäres Exportsignal
NESSCA	<i>Neurological Examination Score for Spinocerebellar Ataxia</i>

Abkürzungsverzeichnis

Ni	Nijmegen
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
PMBC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PolyQ	Polyglutamin
REN	Restriktionsendonuklease
RFLA	Restriktionsfragmentlängenanalyse
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
SARA	<i>Scale for the assessment and rating of ataxia</i>
SCA3	Spinocerebelläre Ataxie Typ 3
SCAFI	<i>Spinocerebellar Ataxia Functional Index</i>
Ser	Serin
siRNA	<i>Small interfering Ribonucleic acid</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SOD2	<i>Superoxiddismutase 2-Gen</i>
Stop	Stopcodon
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TR-FRET	<i>Time-resolved fluorescence energy transfer-Assay</i>
Tü	Tübingen
Tyr	Tyrosin
UbcH7	Ubiquitin carboxyl-terminale Hydrolase 7
Ubl	<i>Ubiquitin-like domain</i>
UIM	Ubiquitin-interagierendes Motiv
Val	Valin
VCP/p97	<i>Valosin-containing protein</i>

1. Einleitung

1.1. Die Spinocerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3)

Die Spinocerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3) – auch unter dem Namen Machado-Joseph-Krankheit (MJD) bekannt – ist eine seltene autosomal dominant vererbare, neurodegenerative Erkrankung, bei der es zur Degeneration des Kleinhirns und anderer Bereiche des Nervensystems kommt (Bettencourt and Lima, 2011). Die SCA3 zählt dabei zu den spät manifestierenden (*late onset*) cerebellären Ataxien, mit einem Erkrankungsbeginn zwischen der dritten und fünften Lebensdekade (Harding, 1983).

Auf molekulargenetischer Ebene kommt es bei der SCA3 zu einer Expansion einer CAG-Wiederholungssequenz im *Ataxin-3*-Gen (*ATXN3*), wodurch es zu einer Verlängerung des sogenannten Polyglutaminbereichs (PolyQ-Bereich) im Proteinprodukt Ataxin-3 (*ATXN3*) kommt (Bettencourt and Lima, 2011).

Damit gehört die SCA3 zu den Polyglutaminerkrankungen (PolyQ-Erkrankungen), zu denen auch die Spinocerebellären Ataxien der Typen 1, 2, 6, 7 und 17, sowie die Dentatorubro-Pallidoluysische Atrophie, die Spinale Muskelatrophie und Chorea Huntington gehören (David et al., 1997, Imbert et al., 1996, Koide et al., 1994, La Spada et al., 1991, MacDonald et al., 1993, Orr et al., 1993, Stevanin and Brice, 2008, Zhuchenko et al., 1997).

Dieser Krankheitsgruppe wird die Proteotoxizität der Erkrankungsproteine mit expandiertem PolyQ-Bereich als gemeinsamer Pathomechanismus zugeschrieben. Zu den weiteren Gemeinsamkeiten dieser Erkrankungen zählen außerdem Antizipation, Instabilität der Expansion, eine positive Korrelation zwischen CAG-Wiederholungsanzahl und klinischer Symptomatik und dementsprechend höchst variable Krankheitsbilder in Abhängigkeit dieser CAG-Wiederholungsanzahl (Paulson, 2018).

Proteinaggregationen, wie sie bei den PolyQ-Erkrankungen und damit auch bei SCA3 zu finden sind, gelten als gemeinsamer Mechanismus in der Pathophysiologie von neurodegenerativen Erkrankungen und sind somit auch in weit verbreiteten Krankheiten wie dem Morbus Alzheimer oder dem Morbus Parkinson zu finden (Bucciantini et al., 2002, Dickson, 2018, Lane et al., 2018, Paulson, 2018).

1.2. Geschichte und Epidemiologie

Die ersten Beschreibungen von SCA3-Fällen wurden in den 1970er Jahren publiziert, wobei die betroffenen Familien alle von der portugiesischen Inselgruppe der Azoren stämmig waren. Die gängige Bezeichnung als „*Machado-Joseph disease*“ rührt dabei von den Familiennamen Machado und Joseph, die zwei dieser Familien führten (Nakano et al., 1972, Rosenberg et al., 1976, Woods and Schaumburg, 1972). Nachdem zunächst zwischen MJD und SCA3 unterschieden wurde, konnte später gezeigt werden, dass es sich hierbei um dieselbe Erkrankung handelt (Haberhausen et al., 1995).

Mit der Zeit wurden neben den zuerst publizierten Fällen mit azoreanischem Ursprung auch weitere Fälle aus unterschiedlichen anderen ethnischen Gruppen beschrieben. Der globalen Verbreitung der SCA3 scheint dabei eine Gründermutation zugrunde zu liegen (Gaspar et al., 1996). Eine weltweite Haplotyp-Studie von Gaspar et al. unter SCA3-Patienten legt nahe, dass diese Gründermutation in einer portugiesischen Population stattgefunden hat (Gaspar et al., 2001). Martins et al. unterstützten mit einer weiteren Haplotyp-Studie diese Annahme und stellten darüber hinaus die Hypothese auf, dass es bereits deutlich früher ein Gründermutations-Ereignis in Asien gegeben haben könnte (Martins et al., 2007). Weitere Gründermutationen werden unter anderem für japanische und französische SCA3-Stammbäume vermutet (Endo et al., 1996, Stevanin et al., 1995).

Weltweit liegt die Prävalenz von autosomal dominant vererbten cerebellären Ataxien (ADCA) bei 2,7/100.000 (Ruano et al., 2014). Dabei ist die SCA3 mit einer relativen Häufigkeit von 20-50 % die am Häufigsten auftretende Erkrankung aus dieser Gruppe (Hersheson et al., 2012). Diese relative Häufigkeit der SCA3 unterliegt jedoch in den unterschiedlichen Ländern einer sehr hohen Varianz (Bettencourt and Lima, 2011). In Deutschland macht die SCA3 42 % aller ADCA-Fälle aus (Schols et al., 1997). Währenddessen beträgt die relative Häufigkeit der SCA3 in Portugal 74 % und in Brasilien sogar 93 % (Jardim et al., 2001, Silveira et al., 1998). In anderen Ländern wiederum, wie zum Beispiel in Südafrika oder in Italien, sind es dagegen unter 4 % (Brusco et al., 2004, Bryer et al., 2003). Die weltweit höchste Prävalenz der SCA3 lässt sich auf den Azoren finden. Sie

beträgt hier knapp 1/3.500 und erreicht innerhalb der Inselgruppe auf der Insel Flores mit 1/239 ihren Höchstwert (Bettencourt et al., 2008).

1.3. Das *Ataxin-3*-Gen und sein Proteinprodukt

Das für die SCA3 verantwortliche Krankheitsgen konnte auf dem Chromosom 14q32.1 lokalisiert werden (Schols et al., 1995, Takiyama et al., 1993). Es handelt sich um das *ATXN3*-Gen, welches in der Literatur auch häufig als *MJD*-Gen beziehungsweise *MJD1*-Gen bezeichnet wird. Dieses ist 48,2 kb groß und besteht aus 11 Exonen. Durch alternatives Spleißen können unterschiedliche Transkripte entstehen. Die CAG-Wiederholungssequenz befindet sich auf Exon 10 und somit im codierenden Bereich (Ichikawa et al., 2001). Das CAG-Triplett wiederholt sich dabei auf gesunden Allelen 12-44mal (Hsieh et al., 1997, Maciel et al., 1995, Maruyama et al., 1995). Die mRNA des *ATXN3*-Gens kann in unterschiedlichstem humanem Gewebe nachgewiesen werden, was auf eine ubiquitäre Genexpression im menschlichen Körper schließen lässt (Ichikawa et al., 2001).

Das Proteinprodukt des *ATXN3*-Gens ist das gleichnamige *ATXN3*-Protein, welches eine Proteinmasse von 40-43 kDa besitzt (Costa Mdo and Paulson, 2012). Entsprechend den unterschiedlichen möglichen Transkripten des Gens existieren auch mehrere Protein-Isoformen von *ATXN3*. Diese sind ubiquitär, sowohl in neuronalem als auch in nicht-neuronalem Gewebe nachweisbar. Auf zellulärer Ebene ist *ATXN3* dabei überwiegend zytoplasmatisch, aber auch nukleär und mitochondrial lokalisiert (Paulson et al., 1997, Trottier et al., 1998, Wang et al., 1997). Der nukleäre Import und Export unterliegt dabei einem aktiven Transportmechanismus, wofür das *ATXN3*-Protein zwei nukleäre Exportsignale (NES) und ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) beinhaltet (Abb.1), (Antony et al., 2009, Macedo-Ribeiro et al., 2009).

ATXN3 fungiert in der Zelle als Deubiquitinase, was sich in der Struktur des Proteins widerspiegelt. N-terminal im *ATXN3*-Protein befindet sich die sogenannte Josephin-Domäne, welche für die Deubiquitinase-Aktivität verantwortlich ist (Sato et al., 2014). Zur Bindung von poly- oder monoubiquitinierten Proteinen existieren drei Ubiquitin-interagierende Motive (UIM). Zwei dieser UIMs liegen zwischen der Josephin-Domäne und dem PolyQ-Bereich, das Dritte befindet sich

C-terminal des PolyQ-Bereiches (Abb.1). Dieses dritte UIM ist allerdings nicht in allen, durch alternatives Spleißen entstehenden, ATXN3-Isoformen enthalten (Burnett et al., 2003, Weishaupl et al., 2019).

Ataxin-3

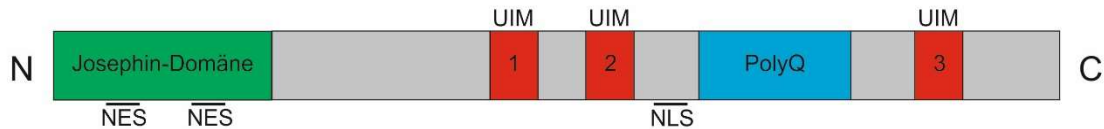


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Struktur des ATXN3-Proteins. N-terminal (N) befindet sich die Josephin-Domäne (grün), die zwei nukleäre Exportsignale (NES) beinhaltet. Zwischen der Josephin-Domäne und dem Polyglutaminbereich (PolyQ, hellblau) befinden sich zwei Ubiquitin-interagierende Motive (UIM 1 & 2, rot), sowie ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS). C-terminal (C) des Polyglutaminbereichs liegt ein drittes Ubiquitin-interagierendes Motiv (UIM 3, rot), welches allerdings nicht in allen Isoformen des ATXN3-Proteins enthalten ist (modifiziert nach Durcan and Fon, 2013, McLoughlin et al., 2020).

ATXN3 scheint mit seiner Deubiquitinaseaktivität eine wichtige Rolle im Ubiquitin-Proteasom-System zu spielen (Burnett et al., 2003). Unter anderem ist ATXN3 für die Deubiquitinierung von Beclin-1 verantwortlich. Dieses Protein ist ein wichtiger Autophagie-Initiator. Durch die Deubiquitinierung kommt es zu einem verringerten Abbau von Beclin-1 und damit zur vermehrten Autophagosombildung. Die Interaktion mit Beclin-1 wird dabei maßgeblich vom PolyQ-Bereich und dessen Länge beeinflusst. Somit reguliert ATXN3 über seine Deubiquitinaseaktivität die Autophagie (Ashkenazi et al., 2017). Interessanterweise ist ATXN3, wenn es abgebaut wird, selbst ein Substrat der Autophagie (Nascimento-Ferreira et al., 2011).

Darüber hinaus existieren weitere Funktionen, die ATXN3 zugeschrieben werden. So wurde eine Interaktion des ATXN3 mit dem *Valosin-containing protein* (VCP/p97) nachgewiesen (Laco et al., 2012a). Das VCP/p97 fungiert als ein wichtiger Faktor in der Endoplasmatisches Retikulum assoziierte Degradation (ERAD), einem Protein-Qualitätskontrollsystem, welches für die Degradation von missgefalteten Proteinen verantwortlich ist (Hampton, 2002, Kobayashi et al., 2002). Durch die Bindung von ATXN3 an VCP/p97 wird die Degradation vermindert und das Level der ERAD-Substrate in der Zelle steigt (Zhong and Pittman, 2006).

Außerdem kommt ATXN3 eine Rolle in der Transkriptionsregulation zu. So kann ATXN3 mit seinem C-terminalen Teil unterschiedliche Co-Transkriptionsfaktoren binden, wodurch die durch diese Faktoren vermittelte Transkription herabgesetzt wird. Mit dem N-Terminus dagegen bindet ATXN3 an Histone und hemmt dadurch die Acetylierung derselben (Li et al., 2002). Eine Funktion von ATXN3 in der Transkriptionsregulation sei – weil für die möglichen Pathomechanismen der SCA3 relevant - besonders erwähnt: Bei oxidativem Stress bindet ATXN3 an den Transkriptionspromotor des Gens für die Superoxiddismutase 2 (*SOD2*), einem antioxidativem Enzym und sorgt damit für eine vermehrte Expression dieses Gens (Araujo et al., 2011). Konsistent zu dieser ATXN3-Funktion ist die Beobachtung, dass zellulärer Hitzeschock zu einer vermehrten nukleären Lokalisation von ATXN3 führt (Reina et al., 2010).

Weiterhin interagiert ATXN3 mit DNA-Reperaturenzymen und scheint zudem für die Organisation und Funktion des Zytoskeletts relevant zu sein (Rodrigues et al., 2010, Wang et al., 2000). Allerdings konnte in Tiermodellen mit ATXN3-*knock-out*-Mäusen, sowie *Caenorhabditis elegans* gezeigt werden, dass die Funktionen von ATXN3, zumindest bei diesen Spezies, nicht essentiell für die Lebensfähigkeit sind (Rodrigues et al., 2007, Schmitt et al., 2007, Switonski et al., 2011).

1.4. Pathobiologie und -physiologie in der SCA3

Die Pathobiologie und -physiologie der SCA3 ist zum aktuellen Zeitpunkt in ihren Details noch nicht komplett verstanden (McLoughlin et al., 2020). Im Erkrankungsfall wird bei Patienten auf dem mutierten Allel eine Expansion der CAG-Wiederholungssequenz des *ATXN3*-Gens von den normalen 12-44 Wiederholungen auf 61-86 Triplets beobachtet (Hsieh et al., 1997, Maciel et al., 1995, Maruyama et al., 1995, Zhou et al., 1997). In dem intermediären Bereich von 45-60 CAG-Wiederholungen konnten sowohl symptomatische als auch asymptotische Träger, sowie Träger mit peripher-nervösen, aber ohne zentral-nervöse Symptome gefunden werden, sodass eine unvollständige Penetranz der Erkrankung für diesen Bereich angenommen wird (Maciel et al., 2001, Padiath et al., 2005, van Alfen et al., 2001). Diese Annahme deckt sich mit den Beobachtungen

für Chorea Huntington, für die ebenfalls ein intermediärer Bereich an Triplet-Wiederholungen mit unvollständiger Penetranz beschrieben ist (Rubinsztein et al., 1996).

Für die SCA3 ist bei den betroffenen Familien das Prinzip der Antizipation zu beobachten. Dies bedeutet, dass die CAG-Expansion einer intergenerationalen Instabilität unterliegt, wobei es bei Transmission des mutierten Allels in seltenen Fällen zu einer Verkürzung, im Mittel aber zu einer Verlängerung der CAG-Wiederholungssequenz kommt. Je öfter sich aber die Triplet-Sequenz auf dem mutierten Allel wiederholt, desto früher manifestiert sich die Erkrankung klinisch. Mit zunehmenden Triplet-Wiederholungen tritt also ein immer jüngeres *Age at onset* (AAO) ein. Zudem äußert sich eine größere CAG-Anzahl in einer schwereren Krankheitssymptomatik. Somit sind nachfolgende Generationen innerhalb einer erkrankten Familie im Durchschnitt schwerer betroffen (Maciel et al., 1995, Maruyama et al., 1995, Schmitz-Hubsch et al., 2008a, Takiyama et al., 1995). Bemerkenswerterweise wird bei der Transmission das expandierte Allel in der männlichen Meiose häufiger als das nicht-expandierte Allel weitergegeben. In der weiblichen Meiose dagegen existiert eine derartige Verzerrung nicht (Ikeuchi et al., 1996). Zudem unterliegt die intergenerationale Instabilität in der männlichen Meiose einer größeren Varianz als in der weiblichen Meiose (Takiyama et al., 1995).

Es konnte gezeigt werden, dass sich durch die Anzahl der CAG-Wiederholungen nur zwischen 45 % und 62 % des AAO erklären lässt. Da die von der Länge der Triplet-Wiederholungen unabhängige Varianz des AAOs innerhalb von Familien geringer ist als zwischen Individuen aus unterschiedlichen Familien, scheint es wahrscheinlich, dass sie auf andere genetische Faktoren oder Umwelteinflüsse zurückzuführen ist (Akçimen et al., 2020, Schmitz-Hubsch et al., 2008a, van de Warrenburg et al., 2005). Ein sehr frühes AAO und schwere Krankheitsverläufe sind außerdem auch bei Homozygotie für eine expandierte CAG-Wiederholungssequenz zu beobachten (Carvalho et al., 2008, Takiyama et al., 1995).

Auf histopathologischer Ebene führt die SCA3 zu einem Neuronenverlust in unterschiedlichen Teilen des Gehirns und im Rückenmark. So sind unter anderem Cerebellum, Pons, Motorkortex, Substantia nigra, Hirnnerven, Thalamus und

Subthalamus, sowie viele Faserbahnen betroffen. Auf die funktionellen Systeme bezogen kommt es damit zur Schädigung von somatomotorischem, oculomotorischem, sensorischem und vestibulärem System. (Rub et al., 2013, Yuasa et al., 1986). Dieser Neuronenverlust hängt direkt mit dem expandierten ATXN3-Protein zusammen. So konnte gezeigt werden, dass ATXN3 mit verlängertem PolyQ-Bereich in Zellkulturen zu Zelltod mit apoptotischem Phänotyp führt (Ikeda et al., 1996).

Als weiteres histopathologisches Korrelat der Erkrankung sind in großen Teilen des Gehirns intranukleäre Einschlüsse zu finden. Diese Inklusionen bestehen aus Aggregaten der expandierten ATXN3-Proteine und sind offenbar für die Manifestierung der Krankheitssymptomatik erforderlich (Bichelmeier et al., 2007, Paulson et al., 1997). Untersuchungen haben hervorgebracht, dass die Aggregatbildung wohl von einem C-terminalen – den PolyQ-Bereich enthaltenden – ATXN3-Spaltprodukt katalysiert wird (Paulson et al., 1997). Darüber hinaus scheinen diese C-terminalen ATXN3-Fragmente mit expandiertem PolyQ-Bereich zytotoxische Eigenschaften zu haben, was sich in einem Apoptose-Anstieg im Zellmodell und Neurodegeneration im Tiermodell widerspiegelt (Goti et al., 2004, Hsu et al., 2017, Yoshizawa et al., 2000). Allerdings spielt wohl nicht nur das C-terminale ATXN3-Fragment eine für die Pathogenese relevante Rolle. Im Zellmodell führen auch N-terminale ATXN3-Fragmente zur Aggregatbildung (Yoshizawa et al., 2001). Diese Aggregate sind jedoch zytoplasmatisch lokalisiert, sorgen im Tiermodell aber ebenfalls für Neuronenverlust und Neurodegeneration (Hubener et al., 2011). Passend dazu können bei SCA3-Patienten neben den nukleären Einschlüssen auch axonale Inklusionen im ZNS nachgewiesen werden (Seidel et al., 2010).

Eine proteolytische Spaltung von ATXN3 scheint also eine Voraussetzung für die Aggregatbildung zu sein, was eine Bestätigung für die sogenannte Toxisches-Fragment-Hypothese ist (Haacke et al., 2006). Diese Hypothese wurde zunächst für Chorea Huntington aufgestellt und besagt, dass proteolytische Spaltprodukte des Erkrankungsproteins für die Bildung von Aggregaten verantwortlich sind (Rubinsztein, 2002). In ATXN3 wurden mehrere putative Schnittstellen für die proteolytische Spaltung durch Enzyme aus der Gruppe der Cysteinproteasen N-

terminal des PolyQ-Bereichs entdeckt. Dazu gehören Schnittstellen für Caspasen und Calpain (Haacke et al., 2007, Weber et al., 2017, Wellington et al., 1998). Durch die Spaltung an diesen Schnittstellen entstehen ein N-terminales Fragment, welches die Josephin-Domäne mit den beiden NES enthält und ein C-terminales Fragment mit dem PolyQ-Bereich und dem unmittelbar N-terminal davor liegenden NLS. Durch Trennung von NES und NLS kommt es im Nukleus zur Akkumulation des C-terminalen Fragments und im Zytosol dementsprechend zur Ansammlung des N-terminalen Fragments. Folge davon ist dann die Aggregatbildung in beiden Kompartimenten (Abb.2), (Antony et al., 2009, Hubener et al., 2011).

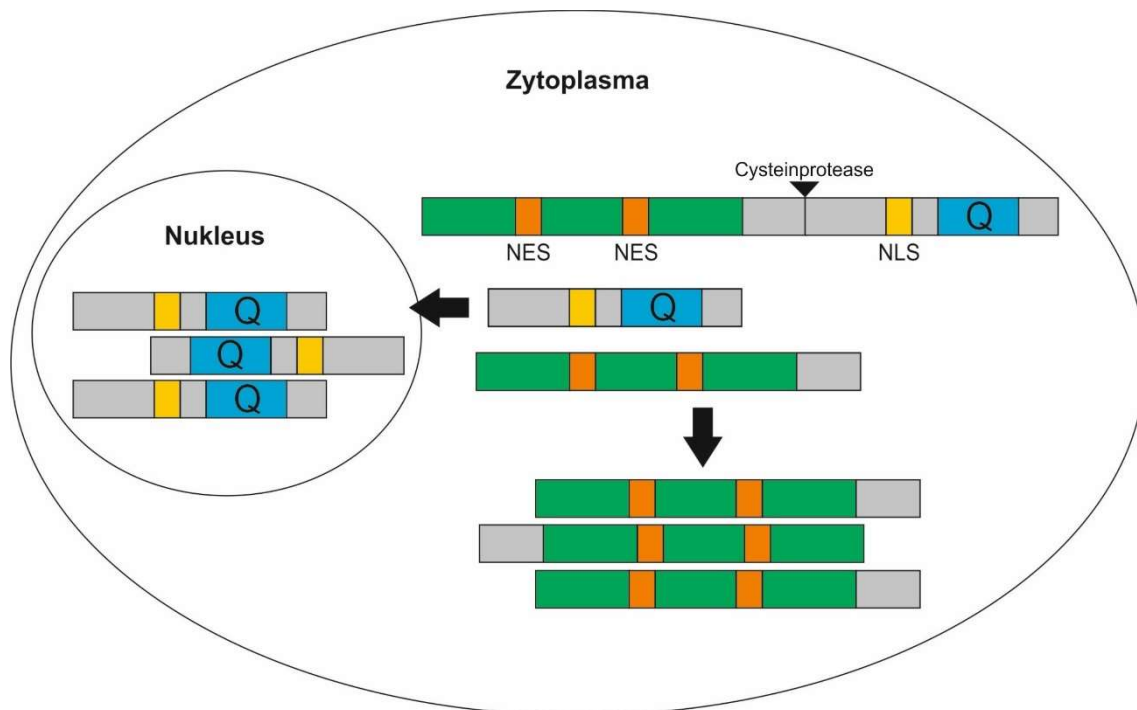


Abbildung 2: Toxisches-Fragment-Hypothese für die Pathogenese von SCA3. Cysteinprotease (schwarzes Dreieck) spaltet ATXN3. Es entstehen daraus ein N-terminales Fragment mit der Josephin-Domäne (grün) und den zwei nukleären Exportsignalen (NES, orange) und ein C-terminales Fragment mit dem Polyglutaminbereich (Q, hellblau) und dem nukleären Lokalisationssignal (gelb). Durch die Trennung von NES und NLS akkumulieren das C-terminale Fragment im Nukleus und das N-terminale Fragment im Zytosol, was zur Aggregatbildung im jeweiligen Kompartiment führt (modifiziert nach Hubener et al., 2011).

Konsistent zu diesem Pathogenese-Modell ist die Beobachtung, dass die Inhibition von Calpain im Zellmodell zu einem Stopp der Inklusionsbildung führt und im Tiermodell mit der Blockade von Calpain die neuronale Dysfunktion und

Neurodegeneration reduziert werden kann (Haacke et al., 2007, Simoes et al., 2012).

Welche Rolle genau den ATXN3-Aggregaten in der SCA3 zukommt, ist noch nicht eindeutig geklärt (McLoughlin et al., 2020). Letztlich sorgt die Erkrankung aber für eine Beeinträchtigung unterschiedlicher Zellfunktionen. So zeigen mit expandiertem ATXN3 oder dessen Spaltprodukten transfizierte Zellen mitochondriale Dysfunktion mit vermehrtem Anfallen von reaktiven Sauerstoffspezies und einer erhöhten Rate der Mitochondrien-vermittelten Apoptose (Harmuth et al., 2018, Hsu et al., 2017, Laco et al., 2012b, Tsai et al., 2004). Zudem ist die Funktion des Endoplasmatischen Retikulums, insbesondere die Antwort auf fehlgefaltete Proteine, reduziert (Hubener et al., 2011). Eine weitere Beeinträchtigung liegt im zellulären Autophagie-Prozess, welcher für die Degradation von ATXN3 relevant ist, vor (Nascimento-Ferreira et al., 2011). In der transkriptionsregulatorischen Funktion des ATXN3 scheint die Fähigkeit zur Aktivierung der Genexpression des *SOD 2*-Gens bei mutiertem ATXN3 beeinträchtigt, sodass im Pongewebe von SCA3-Patienten eine geringere Expression des *SOD2*-Gens gemessen wird (Araujo et al., 2011). Außerdem gibt es auch Hinweise für eine Toxizität der RNA des expandierten *ATXN3*-Gens (Li et al., 2008).

1.5. Klinische Symptomatik der SCA3-Patienten

Die Erstmanifestation der Krankheitssymptomatik erfolgt im Durchschnitt zwischen der dritten und fünften Lebensdekade mit einem mittleren AAO zwischen 36 und 42 Jahren, wobei eine große Spannweite des AAO von 4-70 Jahren existiert (Carvalho et al., 2008, Durr et al., 1996, Harding, 1983, Kieling et al., 2007, Klockgether et al., 1998). Eine Krankheitsmanifestation im frühen Kindesalter wird bei einer sehr hohen CAG-Wiederholungsanzahl oder Homozygotie für das expandierte Allel beobachtet (Carvalho et al., 2008, Zhou et al., 1997). Im Vergleich zu anderen Ataxien zeichnet sich die SCA3 durch einen moderaten Krankheitsprogress aus, wobei eine längere Triplet-Seqenz ein Risikofaktor für eine raschere Progression darstellt, ein frühes AAO dagegen keinen signifikanten Einfluss hat (Klockgether et al., 1998).

Das Leitsymptom der SCA3 ist die cerebelläre Ataxie, welche ein ataktisches

Gangbild, Dysarthrie und Dysmetrie beinhaltet. Zusätzlich kann eine Vielzahl weiterer neurologischer Symptome beobachtet werden, wie zum Beispiel eine gestörte Okulomotorik mit Ophthalmoplegie und Blickrichtungsnystragmus, pathologisch veränderte Reflexantworten, Pyramidenbahnzeichen, Amyotrophie, Dystonie und sensorische Störungen. Außerdem kann sich die Erkrankung auch in einem Parkinsonismus manifestieren (Burk et al., 1999, Durr et al., 1996, Tuite et al., 1995, Yuan et al., 2019). Das klinische Bild der Erstmanifestation entspricht häufig der Leitsymptomatik, kann sich aber auch als nicht-ataktische Symptomatik präsentieren (Globas et al., 2008).

Die Bewertung der klinischen Symptomatik und deren Progression erfolgt dabei mittels klinischer Bewertungsskalen. Für die ataktische Symptomatik wird der *Scale for the assessment and rating of ataxia* (SARA) verwendet, bei welcher die Schwere der ataktischen Symptomatik mit 0-40 Punkten bewertet wird (Schmitz-Hubsch et al., 2006). Für die Bewertung der Ausprägung der nicht-ataktischen Symptome existiert das *Inventory of Non-Ataxia Signs* (INAS), (Jacobi et al., 2013a).

SCA3 reduziert die Lebenserwartung für die erkrankten Personen im Mittel um fast 15 Jahren. Nach der klinischen Erstmanifestation beträgt das mittlere Überleben 21 Jahre (Kieling et al., 2007). Die häufigste Todesursache von SCA3-Patienten sind dabei durch Immobilisation begünstigte Lungenerkrankungen (Diallo et al., 2018).

1.6. Diagnostik und Therapie

Die Diagnosestellung bei Verdacht auf SCA3 erfolgt durch molekulare Diagnostik (Maciel et al., 2001). Diese kann auch im Rahmen einer Pränataldiagnostik mittels Amniozentese durchgeführt werden, was in Deutschland allerdings aufgrund des Gesetzes über genetische Untersuchungen beim Menschen verboten ist (Sequeiros et al., 1998, www.gesetze-im-internet.de).

Für die SCA3 existiert zum aktuellen Zeitpunkt keine kurative Therapieoption (McLoughlin et al., 2020). Mit Physiotherapie kann eine leichte Besserung der Symptomatik erzielt werden (Ilg et al., 2010, Miyai et al., 2012). Bei SCA3-Patienten mit dem klinischen Bild eines Parkinsonismus wurde eine Dopamin-

Responsivität beobachtet, womit in solchen Fällen Levodopa eine symptomatische Therapieoption darstellt (Tuite et al., 1995). Zudem konnte für Riluzol eine signifikante Verbesserung des SARA-Scores nachgewiesen werden, sodass eine Riluzol-Therapie in den S1-Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie als optionaler Therapieversuch angeführt wird (Klockgether et al., 2018, Romano et al., 2015).

Als putativer Therapieansatz für neurodegenerative Erkrankungen mit Proteinakkumulation, welcher Gegenstand aktueller Forschungen ist, gelten Antisense-Oligonukleotide (ASO), (Smith et al., 2006). Diese binden an die mRNA des mutierten Gens und aktivieren so den Abbau durch Ribonukleasen, wodurch die Expression des Erkrankungsproteins supprimiert wird (Crooke, 2004). Im Falle der Spinalen Muskelatrophie konnte erstmals in einer randomisierten Doppelblindstudie ein signifikanter Therapieerfolg für ASOs bei Patienten mit einer neurodegenerativen Erkrankung nachgewiesen werden (Finkel et al., 2017). Für die SCA3 zeigt sich im Mausmodell eine Milderung der Symptomatik durch ASO-Therapie (McLoughlin et al., 2018). Ein weiterer Ansatz ist das *Gen-Silencing* mittels siRNA (Elbashir et al., 2001). Sowohl für diesen Therapieansatz als auch für die ASO-Therapie konnten Modelle mit allelspezifischen Wirkmechanismen entwickelt werden, bei denen eine Diskrimination aufgrund von Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) erfolgt (Alves et al., 2008, Li et al., 2004, Magner et al., 2015, Miller et al., 2003).

1.7. Parkin und seine Interaktion mit Ataxin-3

Für die dieser Dissertationsschrift zugrunde liegenden Untersuchungen und Ergebnisse ist es von Relevanz, ein besonderes Augenmerk auf das Parkin-Protein und das dafür codierende *PARK2*-Gen, sowie die Interaktion des Proteins mit ATXN3 zu legen. Das *PARK2*-Gen ist auf Chromosom 6q25.2-27 lokalisiert. Es besteht aus 12 Exonen, mit großen dazwischen liegenden Intronen, sodass das Gen über 500 kb umspannt. Mutationen im *PARK2*-Gen führen zu einem autosomal-rezessiv vererbten juvenilen Parkinsonsyndrom (ARJP), (Kitada et al., 1998, Matsumine et al., 1997). Sein Genprodukt, das Parkin-Protein, wird im Gehirn ubiquitär exprimiert und ist innerhalb der Zellen zytoplasmatisch lokalisiert

(Stichel et al., 2000). Es fungiert als Ubiquitin Ligase vom Typ E3 und ist somit in die Ubiquitin-Ketten-Synthese und die damit einhergehende Protein-Degradation involviert. Das Parkin-Protein besteht aus einer N-terminalen *Ubiquitin-like* Domäne (Ubl) und einer C-terminalen RING-Box, welche wiederum aus den drei Domänen RING1, RING2 und *in-between RING* (IBR) zusammengesetzt ist (Abb. 3). Die Ubl dient zur Interaktion mit den ubiquitinierten Proteinen, während die RING-Box für die Rekrutierung von Ubiquitin carboxyl-terminale Hydrolase 7 (UbcH7), einem E2 Ubiquitin konjugierenden Enzym, verantwortlich ist (Morett and Bork, 1999, Shimura et al., 2000).

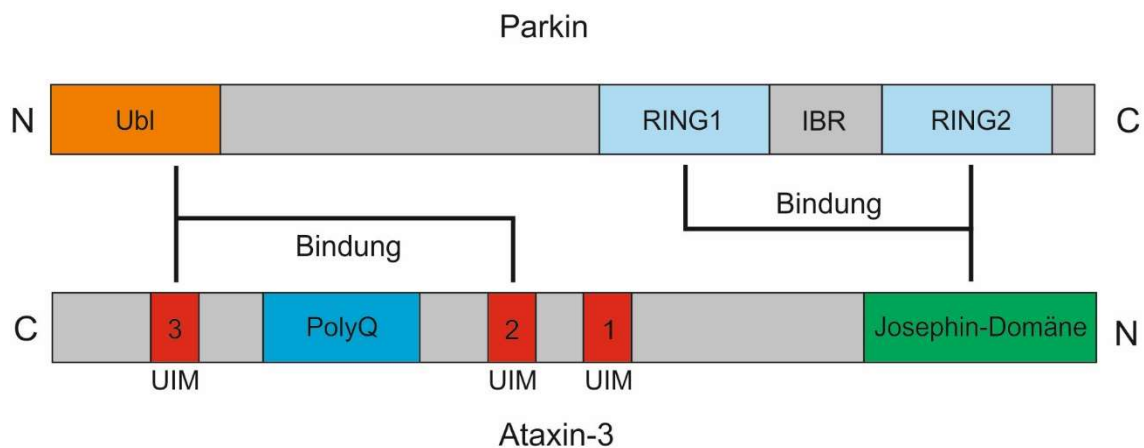


Abbildung 3: Proteinstruktur von Parkin und die Interaktion mit Ataxin-3. Parkin bindet mit der N-terminalen (N) Ubiquitin-like Domäne (Ubl, orange) an die Ubiquitin-interagierenden Motive 2 und 3 (UIM, rot) des Ataxin-3-Proteins. Die C-terminale (C) RING-Box, bestehend aus den Domänen RING1, RING2 (hellblau) und *in-between RING* (IBR), bindet an die Josephin-Domäne (grün), (modifiziert nach Durcan and Fon, 2013).

ATXN3 interagiert direkt mit Parkin, in dem es mit der Josephin-Domäne an die RING-Box und mit UIM2 und UIM3 an Ubl bindet und das Parkin-Protein deubiquitiniert (Abb. 3). Bemerkenswerterweise fördert ATXN3 mit expandiertem PolyQ-Bereich die Parkin-Clearance durch Autophagie, sodass in transgenen Mäusen, die expandiertes ATXN3 exprimieren, ein verringertes Parkin-Level beobachtet werden kann (Durcan et al., 2011). Umgekehrt scheint die Parkin-assoziierte Ubiquitinierung und Protein-Degradation auch beim Abbau von Proteinen mit expandiertem PolyQ-Bereich eine wichtige Rolle zu spielen. So führt eine Überexpression von Parkin zu einer verminderten Aggregation und Zytotoxizität der Proteine mit expandiertem PolyQ-Bereich (Tsai et al., 2003). Aufgrund

der Interaktionen wird vermutet, dass reduzierte Parkin-Level zur Pathogenese der SCA3 beitragen könnten (Durcan et al., 2011). Mit Blick auf dieses Zusammenspiel von ATXN3 und Parkin ist der Fakt, dass bei einigen SCA3-Patienten ein phänotypischer Parkinsonismus beobachtet werden kann, besonders bemerkenswert (Durr et al., 1996, Tuite et al., 1995, Yoritaka et al., 1999).

1.8. Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) in Ataxin-3 und *PARK2*

SNPs sind Varianten einzelner Basen im Genom, die bei mehr als 1 % der untersuchten Allele auftauchen (Richards et al., 2015). Im humanen Genom sind ca. 11 Millionen SNPs bekannt. Die SNPs treten dabei sowohl in codierenden als auch nicht-codierenden Regionen auf und können mit Blick auf die Beeinflussung der Genexpression sowohl funktional als auch neutral sein. Die große Mehrheit der SNPs sind biallelischer Natur (Ramirez-Bello and Jimenez-Morales, 2017). In dieser Dissertationsarbeit wurden jeweils drei SNPs aus *ATXN3* und *PARK2* analysiert, weshalb an dieser Stelle auf diese sechs SNPs näher eingegangen werden soll (Tab. 1). In *ATXN3* handelt es sich dabei um die SNPs mit den rs-Nummern rs1048755, rs12895357 und rs7158733, welche im Folgenden für eine bessere Übersicht mit der Position der jeweils entsprechenden Basenpaare (Bp) benannt werden (rs1048755 \triangleq Bp 669, rs12895357 \triangleq Bp 987, rs7158733 \triangleq Bp 1118).

Bei den SNPs kommt es zum Austausch folgender Basen im *ATXN3*-Gen und den damit einhergehenden Aminosäuren (AS) im *ATXN3*-Protein: $\underline{\text{G}}^{669}\text{TC}/\text{Val}^{212}$ (f_g (globale Allelfrequenz) = 0,75) \rightarrow $\underline{\text{C}}^{669}\text{TC}/\text{Met}^{212}$ (f_g = 0,25), $\underline{\text{G}}^{987}\text{GG}/\text{Gly}^{318}$ (f_g = 0,75) \rightarrow $\underline{\text{C}}^{987}\text{GG}/\text{Arg}^{318}$ (f_g = 0,25), $\text{TAC}^{1118}/\text{Tyr}^{361}$ (f_g = 0,73) \rightarrow $\text{TAA}^{1118}/\text{Stop}^{361}$ (f_g = 0,27), (Goto et al., 1997, NCBI/SNP).

SNP Bp 669 befindet sich in Exon 8 und damit im Gen vor der CAG-Wiederholungssequenz. Die SNPs Bp 987 und Bp 1118 sind in Exon 10 in 3'-Richtung zur Triplett-Sequenz lokalisiert, wobei SNP Bp 987 der Bp-Position unmittelbar am 3'-Ende der CAG-Wiederholungen entspricht (Abb. 4), (Martins et al., 2007). Dies impliziert, dass für diese beiden SNPs die exakte Position abhängig von der Anzahl der CAG-Wiederholungen ist. Die hier verwendeten Bp-Positionen gehen von 13 CAG-Wiederholungen aus.

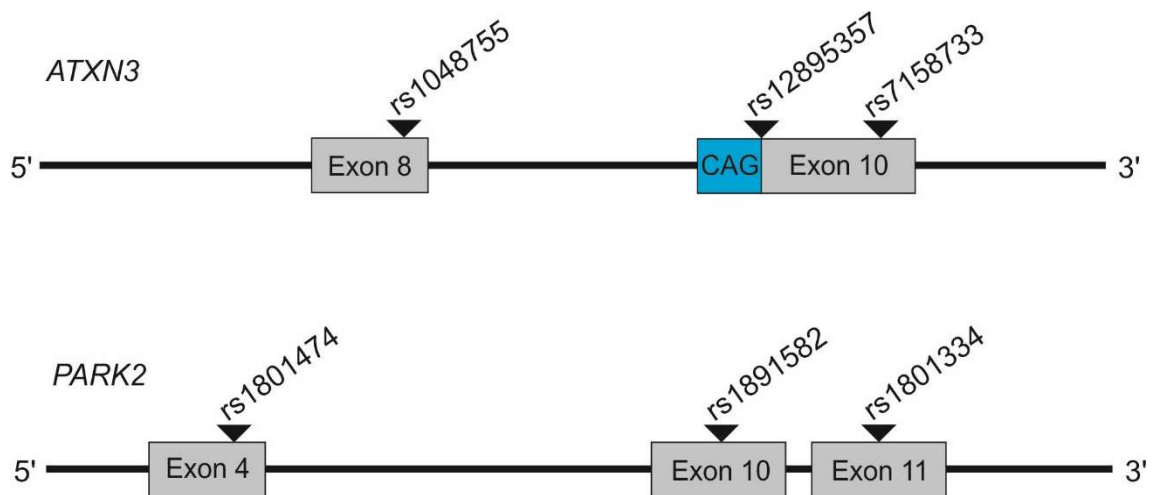


Abbildung 4: Lokalisation der analysierten SNPs auf dem ATXN3- und PARK2-Gen. Die SNPs sind mit der jeweiligen rs-Nummer angegeben. Der ATXN3-SNP rs12895357 liegt am 3'-Ende der CAG-Wiederholungssequenz (CAG, blau), (modifiziert nach Martins et al., 2007).

Eine besondere Bedeutung kommt dem SNP Bp 1118 zu. Durch die Variante TAA¹¹¹⁸ kommt es zum vorzeitigen Stopcodon. Das dadurch entstehende ATXN3-Proteinprodukt besitzt eine verminderte Stabilität und ein reduziertes Expressionslevel (Weishaupt et al., 2019). Auch für den SNP Bp 987 wird ein Einfluss auf die Transkriptstruktur berichtet (Michlewski and Krzyzosiak, 2004).

Die Verteilungsmuster der Allelfrequenzen der drei ATXN3-SNPs unterscheiden sich in unterschiedlichen ethnischen Kohorten (Martins et al., 2006, Stevanin et al., 1997). Zudem ist auch eine erhebliche Divergenz der Allelfrequenz zwischen SCA3-Allelen und Kontroll-Allelen zu beobachten. So weisen in einer weltweiten Haplotypstudie 70 % der Mutationsträger einen A⁶⁶⁹C⁹⁸⁷A¹¹¹⁸-Haplotyp auf, während in den Kontroll-Allelen dessen Auftreten nur bei 2 % lag (Gaspar et al., 2001). Diese ungleichen Verteilungsmuster deuten auf ein altes Auseinanderbewegen der Haplotypen hin, insbesondere, da auch die Häufigkeitsverteilung weit von der CAG-Wiederholungssequenz entfernt liegender SNPs stark zwischen den expandierten und nicht expandierten Allelen variieren (Martins et al., 2006, Stevanin et al., 1997).

Tabelle 1: Übersichtsdarstellung der analysierten SNPs

Gen	Code	Exon	Bp	AS	Varianten Base/AS	Allelfrequenz (global)	Quelle
ATXN3	rs1048755	8	669	212	<u>G</u> T <u>C</u> \triangleq Val <u>A</u> T <u>G</u> \triangleq Met	G=0,75 A=0,25	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1048755
	rs12895357	10	987*	318*	<u>G</u> G <u>G</u> \triangleq Gly <u>C</u> G <u>G</u> \triangleq Arg	G=0,75 C=0,25	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs12895357
	rs7158733	10	1118*	361*	<u>T</u> A <u>C</u> \triangleq Tyr <u>T</u> A <u>A</u> \triangleq Stop	C=0,73 A=0,27	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs7158733
PARK2	rs1801474	4	601	167	<u>A</u> G <u>C</u> \triangleq Ser <u>A</u> A <u>C</u> \triangleq Asn	G=0,97 A=0,03	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1801474
	rs1891582	10	1239	380	<u>G</u> T <u>A</u> \triangleq Val <u>C</u> T <u>A</u> \triangleq Leu	G=0,96 C=0,04	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1891582
	rs1801334	11	1281	394	<u>G</u> A <u>T</u> \triangleq Asp <u>A</u> A <u>T</u> \triangleq Asn	G=0,96 A=0,04	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1801334

*Position gilt für eine CAG-Wiederholungsanzahl von 13 Triplets

Die SNPs Bp 987 und Bp 1118 scheinen Einfluss auf die CAG-Instabilität in der Transmission zu haben. Die Allel-Kombination $\text{expandiertC}^{987}/\text{normalG}^{987}$ ist dabei mit einer größeren Instabilität assoziiert. Für den SNP Bp 1118 wurde ein Effekt für C^{1118} in trans auf die Instabilität der CAG-Wiederholungssequenz nachgewiesen (Igarashi et al., 1996, Maciel et al., 1999, Takiyama et al., 1997). Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Haplotyp $\text{C}^{987}\text{A}^{1118}$ sowohl in den expandierten Allelen überwiegt als auch in den nicht-expandierten Allelen mit besonders großer Anzahl an CAG-Wiederholungen. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass De-Novo-Mutationen aus Allelen mit großer CAG-Wiederholungsanzahl hervorgehen (Stevanin et al., 1997). Unterstützt wird diese These dadurch, dass selbiges für Chorea Huntington gezeigt werden konnte (Myers et al., 1993).

Bei den SNPs des *PARK2*-Gens handelt es sich um rs1801474, rs1891582 und rs1801334 (Tab.1). Äquivalent zu den *ATXN3*-SNPs werden auch die *PARK2*-SNPs in dieser Arbeit mit ihren Bp-Position im Gen bezeichnet (rs1801474 \triangleq Bp 601, rs1891582 \triangleq Bp 1239, rs1801334 \triangleq Bp 1281). Die *PARK2*-SNPs liegen in den Exonen 4 (SNP Bp 601), 10 (SNP Bp 1239) und 11 (SNP Bp 1281), (Abb. 4). Die Varianten der Basen und der daraus resultierenden Aminosäuren sind Folgende: $\text{A}\underline{\text{G}}^{601}\text{C}/\text{Ser}^{167}$ ($f_g = 0,97$) \rightarrow $\text{A}\underline{\text{A}}^{601}\text{C}/\text{Asn}^{167}$ ($f_g = 0,03$),

$\underline{G}^{1239}\text{TA}/\text{Val}^{380}$ ($f_g = 0,96$) \rightarrow $\underline{C}^{1239}\text{TA}/\text{Leu}^{380}$ ($f_g = 0,04$), $\underline{G}^{1281}\text{AT}/\text{Asp}^{394}$ ($f_g = 0,96$) \rightarrow $\underline{A}^{1281}\text{AT}/\text{Stop}^{394}$ ($f_g = 0,04$), (Lucking et al., 2003, NCBI/SNP). Es bestehen Assoziationen zwischen den unterschiedlichen Varianten und dem ARJP. So ist bei Patienten die heterozygote Variante des SNP Bp 601 deutlich häufiger zu finden, als bei Kontrollen (Sato and Kuroda, 1999). In den SNPs Bp 1239 und Bp 1282 scheinen die seltenen Varianten protektiv gegen ARJP zu sein (Lucking et al., 2003). Vorstudien in unserer Abteilung konnten zudem zeigen, dass der SNP Bp 1239 einen Einfluss auf das AAO bei SCA3-Patienten hat (unveröffentlichte Diplomarbeit Jonasz J. Weber).

1.9. Die Bedeutung von Biomarkern in der SCA3-Forschung

Eine Arbeitsgruppe des *National Institute of Health* (USA) definierte Biomarker 2001 als Parameter, die objektiv gemessen und als Indikator für biologische und pathogene Prozesse oder pharmakologische Reaktionen auf therapeutische Interventionen evaluiert werden (Biomarkers Definitions Working, 2001). Biomarker spielen insbesondere für klinische Studien eine große Rolle, da sie früher und schneller gemessen werden können als klinische Endpunkte (Aronson, 2005). Es wird dabei zwischen *Trait*- und *State*-Biomarkern unterschieden. Erstere dienen als Indikator für das Vorhandensein einer Krankheit, während letztere Rückschlüsse auf die Schwere der Erkrankung zulassen (Weir et al., 2011). Biomarker können also unterschiedliche Funktionen erfüllen. Sie können der Diagnosestellung dienen, wie etwa die Anzahl der CAG-Wiederholungen im Falle der SCA3. Außerdem können sie zur Erfassung der Krankheitsprogression, als prognostischer Marker oder als Indikator für das Ansprechen auf therapeutische Interventionen genutzt werden (Biomarkers Definitions Working, 2001). In der SCA3 ist bislang der SARA-Score die Methode der Wahl zur Bewertung der Krankheitschwere (Saute and Jardim, 2018, Schmitz-Hubsch et al., 2006). Daneben existieren weitere klinische Bewertungsskalen, wie zum Beispiel der *Neurological Examination Score for Spinocerebellar Ataxia* (NESSCA), der *Spinocerebellar Ataxia Functional Index* (SCAFI), der *Composite cerebellar functional severity score* (CCFS) oder der *International Cooperative Ataxia Rating Scale* (ICARS); (du Montcel et al., 2008, Kieling et al., 2008, Schmitz-Hubsch et al., 2008b,

Trouillas et al., 1997).

Die Nachteile der klinischen *Scores* bestehen darin, dass sie einer nicht zu vermeidenden Subjektivität unterliegen und zudem wenig sensitiv für geringfügige Änderungen im Krankheitsprogress sind (Weir et al., 2011). Letzteres führt dazu, dass für SCA3-Studien, die klinische Bewertungsskalen als Parameter benutzen, große Stichproben benötigt werden, um Effekte zuverlässig messen zu können. So beträgt die geschätzte Stichprobengröße, um in einer einjährigen Therapiestudie für SCA3 eine 50-prozentige Reduktion der Krankheitsprogression mittels *SARA-Score* zu detektieren 175-202 Probanden. Für den *NESSCA* werden dafür 130 benötigte Probanden geschätzt und für den *SCAFI* 275. Die Rekrutierung solcher Stichprobengrößen stellt bei seltenen Erkrankungen wie der SCA3 eine große Herausforderung dar (Saute and Jardim, 2018). Ein weiterer Nachteil der klinischen Bewertungsskalen für SCA3 ist, dass präataktische Mutationsträger nicht erfasst werden können, was aber für zukünftige Therapiestudien mit dem Ziel einen symptomatischen Krankheitsausbruch zu verhindern von großer Bedeutung wäre (Lima and Raposo, 2018).

Neben den klinischen Bewertungsskalen sind auch bildbegebende Verfahren gut als Marker für die Krankheitsprogression in SCA3 evaluiert. So kann beispielsweise durch volumetrische Messungen im MRT eine Quantifizierung der Kleinhirnatrophie erfolgen. Die gemessene Kleinhirnatrophie korreliert dabei mit der, mittels klinischer *Scores* erhobenen, Schwere der Symptomatik (Adanyeguh et al., 2018, Klaes et al., 2016).

Auf der Suche nach Biomarkern, die sich für geringfügige Änderungen der Krankheitsprogression sowie für die präataktische Phase sensitiv zeigen, wurden in den letzten Jahren viele neurophysiologische und molekulare Parameter getestet (Furtado et al., 2019). So konnten beispielsweise oculomotorische und kortikale Auffälligkeiten bereits bei präataktischen Mutationsträgern detektiert werden (Farrar et al., 2016, Wu et al., 2017). Auf molekularer Ebene wurde bei SCA3-Patienten unter anderem eine erhöhte Serumkonzentration der Neuronenspezifischen Enolase festgestellt, welche zudem mit der Krankheitsdauer korreliert (Zhou et al., 2011). Das Zytokin Eotaxin ist bei asymptomatischen Mutationsträgern signifikant höher als bei Kontrollen und Patienten, zeigt dafür aber keine

Korrelation mit dem Krankheitsverlauf (da Silva Carvalho et al., 2016). Ein sehr vielversprechender molekularer Biomarker für SCA3 ist das Leichte Neurofilament, ein Marker für Neurodegeneration. Seine Serumkonzentration ist bereits bei präataktischen Mutationsträgern signifikant erhöht und nimmt mit fortschreitendem Krankheitsprogress zu (Li et al., 2019, Wilke et al., 2018, Wilke et al., 2020). Als weiterer potenzieller Biomarker gilt das lösliche ATXN3, dessen cerebelläre Konzentration im Mausmodell eine inverse Korrelation mit Aggregatbildungen und symptomatischem Phänotyp zeigt (Nguyen et al., 2013). Auch für SCA3-Patienten konnte eine Korrelation mit dem Krankheitsverlauf beobachtet werden (Gonsior et al., 2020). Gestützt werden diese Ergebnisse von vergleichbaren Beobachtungen für lösliches Huntingtin, dem Erkrankungsprotein bei Chorea Huntington (Baldo et al., 2012). Es existieren also einige potenzielle neurophysiologischen und molekularen Biomarker für SCA3, denen aber noch eine ausreichende Validierung fehlt. Diese kann durch Studien mit ausreichend großen Stichproben und passendem Design erfolgen, die genauere Charakteristiken der potenziellen Biomarker, wie zum Beispiel die Änderungsrate pro Zeit und das Ansprechen des Markers auf therapeutische Interventionen untersuchen (Furtado et al., 2019).

1.10. Das ESMI-Projekt

ESMI steht für *European Spinocerebellar Ataxia Type 3/Machado-Joseph Disease Initiative* und ist ein multizentrisches europäisches Projekt, an dem sechs europäische Zentren teilnehmen, deren Standorte sich in Deutschland (Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen, Bonn und Universitätsklinikum Tübingen), den Niederlanden (*Radboud University Medical Center*, Nijmegen), Großbritannien (*University College London*) und Portugal (*Universidade de Coimbra* und *Universidade dos Azores*, Ponta Delgada) befinden. Ziel der Initiative ist die Rekrutierung einer großen Kohorte an SCA3-Patienten und präataktische Mutationsträgern, welche im späteren Verlauf als potenzielle Kohorte für Therapiestudien und Studien zur Evaluierung und Validierung von Biomarkern genutzt werden kann.

Außerdem soll anhand dieser Kohorte ein besseres Verständnis der SCA3, der

präataktischen Phase und von möglichen krankheitsmodifizierenden Faktoren gewonnen werden. Weitere Ziele von ESMI sind die Entwicklung von Markern aus dem Bereich der bildgebenden Verfahren und von funktionalen Tests. Um eine größtmögliche Vergleichbarkeit zwischen den Zentren zu gewährleisten, wurden standardisierte Protokolle und Methoden für die Gewinnung von Biomaterialien erarbeitet (www.dzne.de/forschung/studien/klinische-studien/esmi/).

1.11. Ziele dieser Arbeit

Die SCA3 ist eine seltene autosomal dominant vererbare neurodegenerative Erkrankung. Bei Betroffenen kommt es zur Expansion einer CAG-Wiederholungssequenz im *ATXN3*-Gen, was einen verlängerten PolyQ-Bereich im ATXN3-Protein zur Folge hat. Es kommt zu Aggregatbildung des expandierten Proteins und dessen Spaltprodukte im Nukleus und Zytosol und damit einhergehend zur Beeinträchtigung unterschiedlicher Zellfunktionen. Dies führt zu einer cerebellär-betonten Neurodegeneration mit dem klinischen Leitsymptom der Ataxie. Zum aktuellen Zeitpunkt stehen keine kurativen Therapieoptionen zur Verfügung, sodass die Erkrankung eine deutlich reduzierte Lebenserwartung mit sich bringt. Für *ATXN3* sind SNPs beschrieben, deren Genotypen zum Teil mit expandierten Allelen assoziiert sind. Auch SNPs aus dem *PARK2*-Gen können einen Einfluss auf SCA3 haben. *PARK2* codiert für das Parkin-Protein, das mit ATXN3 interagiert. Um weitere Erkenntnisse über die SCA3 zu erlangen und um sensitive Parameter der Krankheitsprogression für zukünftige Therapiestudien zur Verfügung zu haben, werden molekulare Biomarker benötigt. Ein solcher könnte das lösliche ATXN3-Protein (L-ATXN3) darstellen. Die multizentrische europäische Initiative ESMI stellt eine große Kohorte von präataktischen und ataktischen Mutationsträgern bereit, um unter anderem Biomarker- und Therapiestudien zu gewährleisten.

Dieser Arbeit liegen Proben und Daten von Probanden der ESMI-Kohorte zugrunde. Unter der Frage, ob es sich bei der ESMI-Kohorte um eine homogene Kohorte handelt, wird in dieser Arbeit dabei untersucht, inwieweit Unterschiede zwischen den Kohorten der einzelnen teilnehmenden Zentren beziehungsweise Länder existieren, was durch statistische Analysen bereits erhobener Daten

geschieht. Dabei sollen Merkmale wie das Geschlechterverhältnis, das AAO, der SARA-Score und das L-ATXN3-Level einbezogen werden. Zudem wird die Verteilung der Genotypen der *ATXN3*-SNPs Bp 669, Bp 987 und Bp 1118 zwischen den unterschiedlichen Zentren und zwischen Mutationsträgern und Kontrollen verglichen. Dies geschieht mit der Fragestellung, ob eine genotypische Homogenität der ESMI-Kohorte vorliegt und ob die in der Literatur beschriebene Assoziation bestimmter Genotypen mit einer CAG-Expansion für die ESMI-Kohorte bestätigt werden kann. Weiter soll untersucht werden, inwieweit sich die jeweiligen Genotypen auf das AAO und das L-ATXN3-Level auswirken. Aufgrund der Interaktion zwischen Parkin und *ATXN3*, sowie der beschriebenen Auswirkung von *PARK2*-SNP Bp 1239 auf das AAO bei SCA3-Patienten, sollen auch die *PARK2*-SNPs Bp 601, Bp 1239 und Bp 1281 näher betrachtet werden. Auch hier werden die Häufigkeitsverteilung bei Mutationsträgern und Kontrollen, sowie mögliche Einflüsse auf AAO und L-ATXN3-Level untersucht. Die Bestimmung der *ATXN3*- und *PARK2*-SNPs erfolgt durch Fragmentlängenanalyse mittels spezifischer *Primer*, Sanger-Sequenzierung und Restriktionsfragmentlängenanalyse, wofür DNA aus Blutproben isoliert wird.

Schließlich soll das L-ATXN3 in seiner Rolle als potenzieller Biomarker für SCA3 näher betrachtet werden. Anhand von bereits für die ESMI-Kohorte erhobenen Daten soll untersucht werden, ob eine Korrelation zwischen *ATXN3*-Level und SARA-Score oder Krankheitsdauer besteht, die eventuell Hinweise darauf geben kann, welche der möglichen Funktionen eines Biomarkers das L-ATXN3 erfüllen kann.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Probandenrekrutierung, Probengewinnung und Datenerhebung

In dieser Arbeit verwendeten patientenbezogenen und klinischen Daten, sowie Blutproben stammen alle von Probanden der bereits vorab, nach hochstandardisierten Protokollen, rekrutierten ESMI-Kohorte. An den jeweiligen Zentren wurden im Rahmen einer Erstuntersuchung anamnestische Daten erhoben, sowie klinische Bewertungen mittels SARA- und INAS-Score durchgeführt. Diese Daten wurden in einer gemeinsamen Datenbank der ESMI-Partner fusioniert. Den Probanden wurden nach standardisiertem Protokoll 1 ml EDTA-Blut, sowie ein CPT™-Röhrchen zur Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMC), venös abgenommen und zu genetischen und proteinbezogenen Analysen an das Universitätsklinikum Tübingen geschickt. Das Aktenzeichen des Ethikvotums für die Probandenrekrutierung, Datenerhebung und Probengewinnung und -verarbeitung am Universitätsklinikum Tübingen ist dabei 598/2011BO1. Zur Bestimmung der L-ATXN3-Level wurde ein separates Ethikvotum eingeholt (Aktenzeichen: 911/2019BO2). Für die anderen ESMI-Zentren lagen jeweils Ethikvoten lokaler Ethikkommissionen vor. Bei der Anzahl der CAG-Wiederholungen, den Werten des L-ATXN3, sowie den Genotypen eines Teils der Polymorphismen wurde auf bereits zuvor erfolgte Analysen zurückgegriffen. Zur Ermöglichung von longitudinalen Studien, sind im ESMI-Protokoll im Verlauf weitere Untersuchungen und venöse Blutentnahmen im jährlichen Rhythmus vorgesehen.

2.1.2. Chemikalien/Reagenzien

Tabelle 2: Verzeichnis aller verwendeten Chemikalien/Reagenzien

Chemikalie	Hersteller, Hauptsitz, Ursprungsland
Betainlösung	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Borsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>CutSmart™ Restriction Enzyme Buffer</i>	New England Biolabs, Ipswich, USA
Ethanol absolut, Qualität für Molekularbiologie, 99,8 % (CAS: 64-17-5)	Pan Reac Appli Chem ITW Reagents, Glenview, USA

Chemikalie	Hersteller, Hauptsitz, Ursprungsland
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Dinatriumsalzlösung	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Ficoll™PM400	GE Healthcare, Chicago, USA
Formamid	Applied Biosystems, Foster City, USA
<i>GeneRuler DNA Ladder Mix</i>	Thermo Scientific, Waltham, USA
<i>GenomeLab DNA Size Standard Kit – 600</i>	Beckman Coulter, Brea, USA
<i>GenomeLab Separation Buffer</i>	Beckman Coulter, Brea, USA
<i>GenomeLab Separation Gel</i>	Beckman Coulter, Brea, USA
Glykogen	Beckman Coulter, Brea, USA
H ₂ O Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg vor der Höhe, Deutschland
Isopropanol, 99,9 % (CAS: 67-63-0)	Honeywell International Inc., Morristown, USA
Mineralöl	Beckman Coulter, Brea, USA
Orange G	Omikron, Neckarwestheim, Deutschland
<i>PCR Grade Nucleotide Mix</i>	Roche, Basel, Schweiz
Pwo-DNA-Polymerase mit 10x Reaktionspuffer	VWR, Radnor, USA
<i>Q-Solution (5x)</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>Quick Start Mix</i>	Beckman Coulter, Brea, USA
<i>Sample Loading Solution (SLS)</i>	Beckman Coulter, Brea, USA
SeaKem Agarose	VWR, Radnor, USA
Natriumacetat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Taq DNA Polymerase mit PCR Puffer 10x	Qiagen, Hilden, Deutschland
TRIS-Base	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

2.1.3. Kits

Tabelle 3: Verwendete Kits

Kit	Hersteller, Hauptsitz, Ursprungsland
<i>FlexiGene DNA Kit</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.1.4. Primer

Alle im Folgenden aufgeführten *Primer* stammen von der Firma Metabion International AG aus Planegg, Deutschland.

Tabelle 4: Auflistung der Primer für die Fragmentlängenanalyse mittels spezifischer Primer (die Produktlänge ist für die Rückwärtsprimer jeweils in Kombination mit dem Vorwärtsprimer angegeben)

Primer	Sequenz (5' - 3')	Produktlänge (bp)
ATXN3 SNP Bp 987 und Bp 1118 vorwärts (B014)	CCA GTG ACT ACT TTG ATT CG	
ATXN3 SNP Bp 987 rückwärts 1 (G654), 5'IRD 700 fluoreszenzmarkiert	ACT CTG TCC TGA TAG GTC CCC	181*
ATXN3 SNP Bp 987 rückwärts 2 (G655), 5'Cy5 fluoreszenzmarkiert	ACT CTG TCC TGA TAG GTC CCG	
ATXN3 SNP Bp 1118 rückwärts 1 (G656), 5'Cy5 fluoreszenzmarkiert	GCA AAA ATC ACA TGG AGC TCT	312*
ATXN3 SNP Bp 1118 rückwärts 2 (G657), 5'IRD 700 fluoreszenzmarkiert	GCA AAA ATC ACA TGG AGC TCG	

*abhängig von Anzahl der CAG-Wiederholungen, angegeben für 10 CAG-Wiederholungen

Tabelle 5: Primer für die Sanger-Sequenzierung (die Produktlänge ist für die Kombination von Vorwärts- und Rückwärtsprimer angegeben)

Primer	Sequenz (5' - 3')	Produktlänge (bp)
ATXN3 SNP Bp 1118 vorwärts (R478)	CCA GTG ACT ACT TTG ATT CG	405*
ATXN3 SNP Bp 1118 rückwärts (R479)	GGT AAC TGC TCC TTA ATC CAG GG	

*abhängig von Anzahl der CAG-Wiederholungen, angegeben für 10 CAG-Wiederholungen

Tabelle 6: Auflistung der Primer für die Restriktionsfragmentlängenanalyse (die Produktlänge ist jeweils für zusammengehörige Vorwärts- und Rückwärtsprimer angegeben)

Primer	Sequenz (5' - 3')	Produktlänge (bp)
PARK2 SNP Bp 601 vorwärts (T890)	GCC CGA TTC TCT TGG CAG TA	696
PARK2 SNP Bp 601 rückwärts (T891)	TCA CAC CGT AAC AGA AGC CC	
PARK2 SNP Bp 1239 vorwärts (T886)	TGT TGC ACA AGC CAG AGG AA	648
PARK2 SNP Bp 1239 rückwärts (T887)	GGG CAT GAT GCT GCT AAA GG	
PARK2 SNP Bp 1281 vorwärts (T892)	ATC TCT TCC CCG CTC CTA CG	441
PARK2 SNP Bp 1281 rückwärts (T893)	AGG CAC CTT CAG ACA GCA TC	

2.1.5. Restriktionsendonukleasen

Die folgenden Restriktionsendonukleasen stammen von der Firma New England Biolabs aus Ipswich, USA.

Tabelle 7: Verwendete Restriktionsendonukleasen für den Restriktionsenzymverdau

Restriktionsendonuklease	Schnittstelle	Ideale Arbeitstemperatur
AlwNI	5'...CAGNNN*CTG...3' 3'...GTC*NNNGAC...5'	37 °C
BaeGI	5'...GKGCM*C...3' 3'...C*MCGKG...5'	37 °C

Restriktionsendonuklease	Schnittstelle	Ideale Arbeitstemperatur
Taq ^{qI}	5'...T*CGA...3' 3'...AGC*T...5'	65 °C

2.1.6. Lösungen und Puffer

Tabelle 8: Verzeichnis aller verwendeten Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Herstellung
0,5 M EDTA pH 8,0	0,5 M EDTA ddH ₂ O ad 1 l pH auf 8,0 einstellen
TBE-Puffer (10x)	890 mM TRIS Base 890 mM Borsäure 4 % 0,5 M EDTA-Na ₂ pH 8,0 ddH ₂ O ad 1 l
TBE-Puffer (1x)	10 % TBE-Puffer (10x) ddH ₂ O ad 2 l
Orange G Ladepuffer (6x)	0,044 mM Orange G 0,35 mM Ficoll TM PM400 ddH ₂ O ad 50 ml
3 M NaAcetat pH 5,2	3 M NaAcetat H ₂ O ad 250 ml pH auf 5,2 einstellen
100 mM EDTA-Na ₂ pH 8,0	100 mM EDTA-Na ₂ H ₂ O ad 250 ml pH auf 8,0 einstellen
Stopp-Mix	64,5 % H ₂ O Ampuwa 14,2 % 3 M NaAcetat pH 5,2 14,2 % 100 mM EDTA-Na ₂ pH 8,0 7,1 % Glykogen
Ethanol (70 %)	70 % Ethanol (100 %) H ₂ O ad 50 ml

2.1.7. Geräte

Tabelle 9: Verzeichnis aller verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller, Hauptsitz, Ursprungsland
<i>CEQ™8000 Genetic Analysis System</i>	Beckman Coulter, Brea, USA
G-Storm GS1	AlphaMetrix Biotech GmbH, Rödermark, Deutschland
<i>Centrifuge 5417C</i>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<i>Centrifuge 5424</i>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
<i>Concentrator plus</i>	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Elektrophorese Spannungsgerät, 300V – 500mA	Consort bvba, Turnhout, Belgien
<i>PerfectBlue™ gel system, Mini S</i>	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Darmstadt, Deutschland
<i>PerfectBlue™ gel system, Mini L</i>	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Darmstadt, Deutschland
Precisa Waage Serie 290 SCS	Precisa Instruments AG, Dietikon, Schweiz
UVP Gelstudio PLUS	Analytik Jena, Jena, Deutschland
UV-Transilluminator	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Darmstadt, Deutschland
ThermoStat plus	Eppendorf AG, Hamburg Deutschland
µCuvette G1.0	Eppendorf AG, Hamburg Deutschland
Vortexmixer 7-2020	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland

2.1.8. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller, Hauptsitz, Ursprungsland
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
<i>Safe-Lock</i> Reaktionsgefäße 1,5 ml, braun (UV-Licht-geschützt)	Eppendorf AG, Hamburg Deutschland

Verbrauchsmaterial	Hersteller, Hauptsitz, Ursprungsland
0,2 ml 8-Streifen PCR-Gefäße	STARLAB International GmbH, Hamburg, Deutschland
TipOne Pipettenspitzen 10µl	STARLAB International GmbH, Hamburg, Deutschland
TipOne Pipettenspitzen 200µl	STARLAB International GmbH, Hamburg, Deutschland
TipOne Pipettenspitzen 1000 µl	STARLAB International GmbH, Hamburg, Deutschland
GeXP Probenplatte	Beckman Coulter, Brea, USA
GeXP Pufferplatte	Beckman Coulter, Brea, USA

2.1.9. Softwares

Tabelle 11: Verwendete Softwares für die Datenauswertung und Literaturverwaltung

Softwares	Hersteller, Hauptsitz, Ursprungsland
<i>GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System</i>	Beckman Coulter, Brea, USA
<i>CorelDRAW Graphics Suite X5</i>	Corel Corporation, Ottawa, Kanada
<i>GraphPad Prism 6</i>	GraphPad Software, San Diego, USA
<i>VisionWorks Acquisition and Analysis Software</i>	Analytik Jena, Jena, Deutschland
<i>EndNote X9</i>	Clarivate Analytics, Philadelphia, USA

2.2. Methoden

2.2.1. DNA-Isolation aus Blutproben

Den Probanden der ESMI-Kohorte wurde am jeweiligen Zentrum EDTA-Blut entnommen, welches an das Universitätsklinikum Tübingen zur genetischen Analyse geschickt wurde. Für diese Arbeit wurde aus Blutproben von Probanden, für die nicht schon bereits vorab isolierte DNA zur Verfügung stand, die DNA isoliert. Dies geschah mit Hilfe des FlexiGene DNA Kits (Version Februar 2003) der Firma Qiagen (Hilden). Die Isolation erfolgte dabei gemäß der Anleitung des Handbuchs. Für die Zentrifugationsschritte wurde die *Centrifuge 5424* (Eppendorf AG, Hamburg) verwendet.

2.2.2. Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Das Überprüfen des Gelingens der DNA-Isolation, sowie die Qualitätskontrolle bereits vorliegender DNA-Isolate, erfolgte mittels photometrischer DNA-Konzentrationsbestimmung. Hierzu wurden 1,5 µl gelöster DNA auf die Mikroküvette pipettiert und mit dem Photometer (Biophotometer, Eppendorf AG, Hamburg) gemessen. Die Messung erfolgte dabei mit bereits vorprogrammierten Einstellungen für doppelsträngige DNA mit einer Wellenlänge von 260 nm. Als Leerwert dienten 1,5 µl FG3-Puffer, dem Lösungsmittel der isolierten DNA.

2.2.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur DNA-Amplifikation

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur *in vitro* Amplifikation von DNA-Sequenzabschnitten mittels einer hitzeresistenten DNA-Polymerase (Mullis et al., 1986). Es handelt sich bei der PCR um ein zyklisches Verfahren, welches in drei sich wiederholende Phasen gegliedert ist und damit eine exponentielle Vervielfältigung des entsprechenden DNA-Abschnittes erlaubt. Der erste Schritt besteht in der Auftrennung der beiden DNA-Doppelstränge durch Erhitzung auf 95 °C (Denaturierung). Danach erfolgt eine Abkühlung, in der Regel auf eine Temperatur zwischen 55 °C und 65 °C (*Annealing*). Diese Phase dient der Bindung von Vorwärts- und Rückwärts-*Primer*, die die zu vervielfältigende Sequenz flankieren und als Ansatzpunkt der hitzeresistenten Polymerase dienen. Die Polymerase synthetisiert im dritten Schritt, der Elongation, bei 68 °C bis 72 °C einen zum Matrizen-Strang komplementären Strang. Als Bausteine dienen Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs). Die Reaktionszyklen finden dabei in vorprogrammierten *Thermocyclern* statt.

In dieser Arbeit wurden für die Analysen von zwei *ATXN3*-SNPs (SNP Bp 987 und Bp 1118) und der drei *PARK2*-SNPs (SNP Bp 601, Bp 1239 und Bp 1281) PCRs eingesetzt. Mit diesen wurde jeweils der den entsprechenden SNP umgebende DNA-Abschnitt amplifiziert. Anschließend erfolgte dann aus dem PCR-Produkt die Analyse der SNPs mit unterschiedlichen Methoden: (I) Für die *ATXN3*-SNPs Bp 987 und Bp 1118 die Fragmentlängenanalyse. (II) Für den *ATXN3*-SNP Bp 1118 außerdem auch die Sanger-Sequenzierung; (III) Für die

PARK2-SNPs Bp 601, Bp 1239 und Bp 1281 die Restriktionsfragmentlängenanalyse.

Zur Durchführung der PCRs wurde zunächst ein Reaktionsansatz, der *Mastermix* (MM) für die zu amplifizierende Probenanzahl hergestellt. Auf einem Kühlblock wurde zu diesem die Polymerase (Taq-Polymerase oder Pwo-Polymerase) hinzugegeben. Danach wurde, ebenfalls auf einem Kühlblock, eine bestimmte Menge des MMs in 0,2 µl-PCR-Gefäße pipettiert und die entsprechende DNA-Menge hinzugegeben. Die Tabellen 12 und 13 enthalten eine übersichtliche Auflistung der jeweiligen Reaktionsansätze für die unterschiedlichen PCRs. Die dabei im Rahmen der Restriktionsfragmentlängenanalysen verwendeten Primer sind in Tabelle 14 aufgeführt. Bei der PCR für die Fragmentlängenanalysen handelt es sich um eine spezielle PCR, auf deren Besonderheiten und Details in Kapitel 2.2.6. eingegangen wird.

Tabelle 12: Reaktionsansatz der PCR für die Sanger-Sequenzierung (zur Bestimmung des ATXN3-SNP Bp 1118)

Reagenz	Volumen
H ₂ O Ampuwa	24,0 µl
PCR Puffer 10x	3,0 µl
dNTPs (10 mM)	0,33 µl
Vorwärts-Primer R478 (10 µM)	0,66 µl
Rückwärts-Primer R479 (10 µM)	0,66 µl
Pwo-Polymerase	0,5 µl
DNA	1,5 µl
Gesamtvolumen	30,65 µl

Tabelle 13: Reaktionsansatz der PCR für die Restriktionsfragmentlängenanalysen (zur Bestimmung der *PARK2*-SNPs 601, 1239 und 1281)

Reagenz	Volumen
H ₂ O Ampuwa	13,3 µl
PCR Puffer 10x	2,0 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
Vorwärts-Primer (10 µM)	1 µl
Rückwärts-Primer (10 µM)	1 µl

Reagenz	Volumen
Taq-Polymerase	0,2 µl
DNA	2,0 µl
Gesamtvolumen	20,0 µl

Tabelle 14: PARK2-SNPs und das jeweilige Primer-Paar für die PCR (siehe Tab. 13)

PARK2-SNP	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer
Bp 601	T890	T891
Bp 1239	T886	T887
Bp 1281	T892	T893

Die vollständigen Reaktionsansätze wurden in vorprogrammierten Thermocyclern (G-Storm GS1, AlphaMetrix Biotech GmbH, Rödermark) den zyklischen Temperaturveränderungen zugeführt. Die jeweiligen Programm-Einstellungen der Thermocycler für die unterschiedlichen PCRs kann den Tabellen 15 und 16 entnommen werden. Bei der PCR für die Sanger-Sequenzierung wurde mit einer sogenannten *Touchdown*-PCR gearbeitet (Tab. 15). Hierbei wird durch eine zunächst sehr hohe *Annealing*-Temperatur eine hohe Spezifität der *Primer*-Bindung forciert. Die *Annealing*-Temperatur wird dann in den nachfolgenden Zyklen schrittweise verringert, sodass die *Primer*, bei bereits vorliegenden spezifischen Produkten, auch wieder unspezifischer binden.

Tabelle 15: Thermocycler-Programm der Touchdown-PCR für die Sanger-Sequenzierung (zur Bestimmung des ATXN3-SNPs Bp 1118)

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	94 °C	5 min	1
Denaturierung	94 °C	30 s	10
<i>Annealing</i>	65 °C (-1 °C/Zyklus)	30 s	
Elongation	68 °C	45 s	
Denaturierung	94 °C	30 s	25
<i>Annealing</i>	55 °C	30 s	
Elongation	68 °C	45 s	

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Finale Elongation	68 °C	5 min	1
Kühlung	10 °C	∞	1

Tabelle 16: Thermocycler-Programm der PCR für die Restriktionsfragmentlängenanalysen (zur Bestimmung der PARK2-SNPs Bp 601, Bp 1239 und Bp 1281)

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	1
Denaturierung	95 °C	45 s	35
<i>Annealing</i>	55 °C	1 min	
Elongation	72 °C	45 s	
Finale Elongation	72 °C	10 min	1
Kühlung	10 °C	∞	1

2.2.4. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose Gelelektrophorese ist ein molekularbiologisches Verfahren, um DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen. Das Agarosegel besitzt die Funktion eines Netzes, durch dessen Struktur sich kleinere Moleküle schneller fortbewegen können als größere. Für die Gelelektrophorese wird aufzutrennende DNA in sogenannten Taschen im Gel platziert und anschließend ein elektrisches Feld an das Gel angelegt. Die negativ geladene DNA wandert in Richtung der Anode, wobei, entsprechend der beschriebenen Netzfunktion des Gels, sich kleinere Fragmente schneller fortbewegen als größere und eine Größenauftrennung erreicht wird. Um die Auftrennung zu visualisieren wird Ethidiumbromid (EtBr) verwendet. Dieser Farbstoff interkaliert in die große Furche der DNA und kann durch UV-Licht sichtbar gemacht werden.

In dieser Arbeit wurde die Gelelektrophorese zur Qualitätskontrolle der PCR-Produkte für die Fragmentlängentanalysen, zur Fragment-Auftrennung für die Sanger-Sequenzierung und für die Restriktionsfragmentlängenanalyse verwendet. Dabei wurden unterschiedlich prozenthaltige Gele hergestellt. So betrug der Prozentgehalt der Gele zur Qualitätskontrolle für die Fragmentlängenanalyse 1 %, für die Sanger-Sequenzierung 1,5 % und für die Restriktionsfragmentlängenanalyse 2,5 %. Zur Herstellung eines einprozentigen Agarosegels wurden 0,5 g

(1,5 % = 0,75 g, 2,5 % = 1,25 g) Agarose in 50 ml 1x Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer durch Aufkochen in einer Mikrowelle gelöst. Anschließend wurden 3 µl EtBr hinzugegeben und das Gemisch in einen Gelschlitten (*PerfectBlue™ gel system, Mini S*, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Darmstadt) gegossen. Für die Herstellung eines größeren Gels (*PerfectBlue™ gel system, Mini L*) wurde jeweils die doppelte Menge Agarose und 1x TBE-Puffer, sowie 4,5 µl EtBr verwendet. Je nach gewünschter Anzahl an Probenaschen wurden ein oder zwei Kämmen der entsprechenden Größe eingesetzt. Nach Festwerden des Gels wurde der Gelschlitten mit dem Gel in die Gelkammer gesetzt, diese mit 1x TBE-Puffer aufgefüllt und die Kämmen aus dem Gel gezogen. Pro Gelaschenreihe wurde eine Tasche mit einem Längenstandard (*GeneRuler DNA Ladder Mix*, Thermo Scientific, Waltham) befüllt. In die anderen Taschen wurden die mit Orange G Ladepuffer versehenen Proben pipettiert. Bei den Gelelektrophoresen der Fragmentlängenanalysen und der Sanger-Sequenzierung wurden dabei 7,5 µl PCR-Produkt mit 3 µl Orange G Ladepuffer beladen, bei der Restriktionsfragmentlängenanalyse wurden 5 µl Orange G Ladepuffer zu 9,5 µl Probe gegeben. Mit Hilfe eines Elektrophorese Spannungsgeräts (Consort bvba, Turnhout) wurde ein elektrisches Feld mit 90-120 mV an die Gelkammer angelegt. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte dabei über einen Zeitraum von 30-60 Minuten. Anschließend wurden die DNA-Fragmente im UVP Gelstudio (Analytik Jena) visualisiert, fotografiert und als Bilddateien abgespeichert.

2.2.5. Gelextraktion

Die Gelextraktion ist die Isolierung von Biomolekülen aus einem Agarosegel. In dieser Arbeit wurde sie verwendet, um für die Sanger-Sequenzierung aufgetrennte PCR-Produkte zu isolieren. Zur Gelextraktion wurde dabei das *QIAquick Gel Extraction Kit* (Version September 2010) der Firma Qiagen (Hilden) verwendet. Die Extraktion erfolgte dabei gemäß dem Handbuch des Herstellers. Die Zentrifugationsschritte wurden bei 17.900 x g durchgeführt.

2.2.6. Fragmentlängenanalyse mittels spezifischer *Primer*

Die Fragmentlängenanalyse mittels spezifischer *Primer* ist eine Methode, um den Genotyp eines SNPs zu bestimmen. Hierbei wird zunächst eine PCR mit zwei unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Rückwärts-*Primern* durchgeführt. Diese Rückwärts-*Primer* unterscheiden sich nur in einer Base, die an der Position des entsprechenden SNPs bindet. In Abhängigkeit der vorliegenden SNP-Variante wird also in die PCR-Produkte eines Allels der eine oder der andere Rückwärts-*Primer* eingebaut. Somit enthalten die PCR-Produkte je nach vorliegenden SNP-Variante eine entsprechende Fluoreszenzmarkierung, welche in einem entsprechenden Analysegerät durch Laser angeregt und detektiert werden kann.

Diese Methode wurde zur Analyse der *ATXN3*-SNPs Bp 987 und Bp 1118 angewendet. In Tabelle 17 ist die Fluoreszenzmarkierung für die jeweilige SNP-Varianten aufgelistet. Bei den Fluoreszenzfarbstoffen handelte es sich um den Cyaninfarbstoff Cy5 und IRD 700, ein *near infrared dye*.

Tabelle 17: Fluoreszenzmarkierungen der entsprechenden SNP-Varianten (die Fluoreszenzmarkierung ist an die entsprechenden Rückwärts-*Primer* angehängt, die bei Vorliegen der jeweiligen Variante binden)

ATXN3-SNP	Variante	Fluoreszenzfarbstoff
Bp 987	C	Cy5
	G	IRD 700
Bp 1118	C	IRD 700
	A	Cy5

2.2.6.1. PCR für die Fragmentlängenanalyse

Der Fragmentlängenanalyse geht eine für den entsprechenden SNP spezifische PCR voraus. Das Vorgehen bei der Durchführung der PCR entspricht dabei dem in Kapitel 2.2.3. beschriebenen Prozedere. Die Zusammensetzungen der Reaktionsansätze sind in Tabelle 18 und 19 dargestellt. Aus Tabelle 20 sind die Programmeinstellungen des Thermocyclers zu entnehmen. Da bei der PCR für die Fragmentlängenanalyse des *ATXN3*-SNPs Bp 1118 die DNA-Abschnitte, die einen expandierten PolyQ-Bereich enthalten, teilweise unzureichend amplifiziert

wurden, erfolgte zwischenzeitlich zu Optimierungszwecken die PCR mit einem *Touchdown*-Protokoll (Tab. 21).

Tabelle 18: Reaktionsansatz der PCR für die Fragmentlängenanalyse des ATXN3-SNP Bp 987

Reagenz	Volumen
H ₂ O Ampuwa	13,4 µl
PCR Puffer 10x	2,0 µl
Formamide	0,5 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
Vorwärts-Primer B014 (10 µM)	0,8 µl
Rückwärts-Primer G654 (10 µM)	0,8 µl
Rückwärts-Primer G655 (10 µM)	0,8 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl
DNA	1,0 µl
Gesamtvolumen	20,0 µl

Tabelle 19: Reaktionsansatz der PCR für die Fragmentlängenanalyse des ATXN3-SNP Bp 1118

Reagenz	Volumen
H ₂ O Ampuwa	8,0 µl
PCR Puffer 10x	2,0 µl
Q-Solution	4,0 µl
dNTPs (2 mM)	1,6 µl
Vorwärts-Primer B014 (10 µM)	1,6 µl
Rückwärts-Primer G656 (10 µM)	0,8 µl
Rückwärts-Primer G657 (10 µM)	0,8 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl
DNA	1,0 µl
Gesamtvolumen	20,0 µl

Tabelle 20: Thermocycler-Programm der PCR für die Fragmentlängenanalysen (zur Bestimmung der ATXN3-SNPs Bp 987 und Bp 1118)

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	94 °C	4 min	1

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	94 °C	15 s	
<i>Annealing</i>	58/59,5 °C*	30 s	35
Elongation	72 °C	1 min	
Finale Elongation	72 °C	6 min	1
Kühlung	10 °C	∞	1

*58 °C für die PCR zur Bestimmung des SNPs Bp 1118; 59,5 °C für die PCR zur Bestimmung des SNPs Bp 987

Tabelle 21: Thermocycler-Programm der Touchdown-PCR für die Fragmentlängenanalyse (zur Bestimmung des ATXN3-SNPs Bp 1118)

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min	1
Denaturierung	95 °C	30 s	
<i>Annealing</i>	65 °C (-1 °C/Zyklus)	45 s	10
Elongation	72 °C	1 min	
Denaturierung	95 °C	30 s	
<i>Annealing</i>	55 °C	45 s	25
Elongation	72 °C	1 min	
Finale Elongation	72 °C	7 min	1
Kühlung	10 °C	∞	1

Mittels Gelelektrophorese mit einem einprozentigen Agarosegel wurde anschließend das Vorhandensein von spezifischen PCR-Produkten kontrolliert (2.2.4.). Bei einem positiven Ergebnis dieser Kontrolle folgte dann die Fragmentlängenanalyse.

2.2.6.2. Fragmentlängenanalyse

Das Analysegerät, sowie die spezifischen Reagenzien und Verbrauchsmaterialien für die Fragmentlängenanalyse stammen von der Firma Beckman Coulter aus Brea. Zunächst wurde das PCR-Produkt mit H₂O im Verhältnis 1:20 verdünnt. Konnten in der Gelelektrophorese nur wenig spezifische PCR-Produkte detektiert werden, so erfolgte eine 1:10-Verdünnung oder die Verwendung der

unverdünnten PCR-Produkte. Die *Wells* der Probenplatte wurden, wie in Tabelle 22 dargestellt, befüllt. Anschließend wurde jeweils ein Tropfen Mineralöl auf das Gemisch getropft. Die den Positionen der befüllten *Wells* auf der Probenplatte entsprechenden *Wells* der Pufferplatte wurden zu dreiviertel mit *GenomeLab Separation Buffer* beladen. Proben- und Pufferplatte wurden in das *CEQTM8000 Genetic Analysis System* gesetzt. Hier wurde das Programm *Frag2* (Programmeinstellungen siehe Tab. 23) gewählt. Es erfolgte eine voll automatisierte Auftrennung der Proben mittels Kapillar-Gelelektrophorese (*GenomeLab Separation Gel*), sowie eine Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe und die entsprechende Detektion des entstehenden Fluoreszenzsignals. Aufgrund des detektierten Fluoreszenzsignals konnten somit Aussagen über den Genotyp des jeweiligen SNPs getroffen werden.

Tabelle 22: Beladung der Wells der Probenplatten für die Fragmentlängenanalyse

Reagenz	Volumen
<i>Sample Loading Solution</i>	34,5 µl
<i>GenomeLab DNA Size Standard Kit - 600</i>	0,5 µl
PCR-Produkt (1:20)	5,0 µl

Tabelle 23: Einstellungen des *Frag2*-Programms im *CEQTM8000 Genetic Analysis System*

Kapillare	Denaturieren	Injizieren	Trennen
Temperatur: 35 °C	Temperatur: 90 °C	Spannung: 2,0 kV	Spannung: 6,0 kV
Auf Temperatur warten: Ja	Dauer: 120 s	Dauer: 30 s	Dauer: 60 min

2.2.7. Sanger-Sequenzierung

Die Sanger-Sequenzierung, auch bekannt als Kettenabbruchmethode nach Sanger, ist ein molekularbiologisches Verfahren, um die Basenfolge eines DNA-Abschnittes zu bestimmen (Sanger et al., 1977). Die den zu sequenzierenden Abschnitt enthaltende DNA wird dabei in vier unterschiedlichen Reaktionsansätzen nach erfolgter Hitzedenaturierung amplifiziert. Die Ansätze enthalten jeweils einen *Primer*, eine DNA-Polymerase und dNTPs. Zusätzlich enthält jeder Ansatz

jeweils eine der vier Basen in Form eines Didesoxynukleosidtriphosphats (ddNTP). Den ddNTPs fehlt die 3'Hydroxygruppe der Ribose, sodass bei Einbau eine Verlängerung des neusynthetisierten Strangs durch die Polymerase nicht mehr möglich ist, es also zu einem Kettenabbruch kommt. In jedem Ansatz entstehen also Syntheseprodukte unterschiedlicher Länge, die jeweils auf dasselbe ddNTP enden. Durch eine Größenaufftrennung der Fragmente mittels Gelelektrophorese kann dann eine Sequenzbestimmung erfolgen. In der hier verwendeten Variante der Sanger-Sequenzierung wurden je nach Base unterschiedlich fluoreszenzmarkierte ddNTPs aller vier Basen in demselben Ansatz eingesetzt. Die Abbruchprodukte wurden dann in einer Kapillar-Gelelektrophorese aufgetrennt und die laserinduzierten Fluoreszenzsignale der aufgetrennten Fragmente gemessen.

Die Sanger-Sequenzierung wurde zur Bestimmung des *ATXN3*-SNPs Bp 1118 eingesetzt, da für manche Proben die Bestimmung des SNPs auf dem expandierten Allel mittels Fragmentlängenanalyse nicht gelang. Für die Sanger-Sequenzierung wurde der betreffende DNA-Abschnitt zunächst in einer spezifischen PCR vervielfältigt (2.2.3.). Die PCR-Produkte wurden dann mittels Gelelektrophorese in einem 1,5-prozentigen Agarosegel aufgetrennt (2.2.4.). Damit wurden die Allele mit unterschiedlich langen CAG-Wiederholungen voneinander separiert. Die DNA-Fragmente wurden unter UV-Beleuchtung (UV-Transilluminator, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Darmstadt) ausgeschnitten und aus dem Gel extrahiert (2.2.5.).

2.2.7.1. Sequenzierungs-PCR

Die genaue Zusammensetzung des Reaktionsansatzes der Sequenzierungs-PCR kann aus Tabelle 24 entnommen werden. Der *Quick Start Mix* (Beckman Coulter, Brea) enthält dabei DNA-Polymerase, Puffer, dNTPs und die fluoreszenzmarkierten ddNTPs. Von den Produkten der vorausgegangenen PCR wurden in Abhängigkeit der detektierten Bandenstärke in der Gelelektrophorese zwischen 3 µl und 6 µl eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden zunächst mit H₂O gemischt, anschließend erfolgte ein initialer Denaturierungsschritt bei 98 °C für 3 Minuten im Thermocycler (G-Storm GS1, AlphaMetrix Biotech GmbH,

Rödermark). Danach wurden die restlichen Reagenzien dazugegeben und die PCR gestartet, deren genaue Programmeinstellungen in Tabelle 25 dargestellt sind.

Tabelle 24: Reaktionsansatz der Sequenzierungs-PCR (die Menge des eingesetzten PCR-Produkts hängt von der Bandenstärke in der Gelelektrophorese ab)

Reagenz	Volumen
Q-Solution	4 µl
Quick Start Mix	4 µl
Primer R478 (10 µM)	1 µl
PCR-Produkt + H ₂ O Ampuwa	11 µl

Tabelle 25: Thermocycler-Programm der Sequenzierungs-PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	96 °C	20 s	31
Annealing	55 °C	20 s	
Elongation	60 °C	4 min	
Kühlung	10 °C	∞	1

2.2.7.2 Aufreinigung der Sequenzierungs-PCR

Um die Abbruch-Fragmente der Sequenzierungs-PCR aufzureinigen, wurden zu je 10 µl der PCR-Produkte 15,5 µl Stopp-Mix und 60 µl eiskaltes Ethanol (100 %) gegeben. Die Proben wurden anschließend für 30 Minuten bei 4 °C und 17 900 x g zentrifugiert (*Centrifuge 5417C*, Eppendorf AG, Hamburg). Daraufhin wurde der Überstand verworfen und 190 µl eiskaltes Ethanol (70 %) hinzugefügt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 20 Minuten bei 4 °C und 17 900 x g. Nach Verwerfen des Überstandes wurden 90 µl eiskaltes Ethanol dazu pipettiert. Dann wurde bei denselben Bedingungen für 15 Minuten zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand verworfen und das verbleibende Ethanol wurde durch Rotation für 12 Minuten bei 30 °C im *Concentrator plus* (Eppendorf AG, Hamburg) entfernt. Die Proben wurden anschließend in 42 µl *Sample Loading Solution* (Beckman Coulter, Brea) für eine Stunde in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.7.3. Sequenzierung

Die für die Sequenzierung verwendeten Materialien und Chemikalien, sowie das Analysegerät sind Produkte der Firma Beckman Coulter aus Brea. Es wurden 40 µl der inkubierten Proben in die *Wells* der Probenplatte pipettiert. Die befüllten *Wells* wurden mit einem Tropfen Mineralöl bedeckt. Die entsprechenden *Wells* der Pufferplatte wurden zu dreiviertel mit *GenomeLab Separation Buffer* befüllt. Die Analyse erfolgte im *CEQ™8000 Genetic Analysis System* mittels voll automatisierter Kapillar-Gelelektrophorese (*GenomeLab Separation Gel*) und Detektion laserinduzierter Fluoreszenzsignale. Dazu wurde das LFR-b-Programm verwendet, dessen Einstellungen Tabelle 26 zu entnehmen sind.

Tabelle 26: Einstellungen des LFR-b-Programms im CEQ™8000 Genetic Analysis System

Kapillare	Denaturieren	Injizieren	Trennen
Temperatur: 57 °C	Temperatur: 90 °C	Spannung: 2,0 kV	Spannung: 6,0 kV
Auf Temperatur warten: Ja	Dauer: 120 s	Dauer: 15 s	Dauer: 60 min

2.2.8. Restriktionsfragmentlängenanalyse (RFLA)

Bei der Restriktionsfragmentlängenanalyse (RFLA) werden SNPs anhand der - in Abhängigkeit vom Genotyp entstehenden - unterschiedlichen Produkte eines Enzymverdau des betreffenden DNA-Abschnittes bestimmt. Als Enzyme kommen Restriktionsendonukleasen (REN) zum Einsatz. Diese erkennen und spalten DNA an für die jeweilige REN spezifischen Sequenzen. Zur Bestimmung der SNPs werden RENs eingesetzt, die abhängig vom Genotyp des SNPs schneiden oder nicht schneiden. Dadurch entstehen eine Haplotyp-spezifische Anzahl und Größe von Fragmenten, welche in einer Gelelektrophorese aufgetrennt und detektiert werden.

Die RFLA wurde zur Bestimmung der *PARK2*-SNPs Bp 601, Bp 1239 und Bp 1281 eingesetzt. Tabelle 27 gibt einen Überblick über die für die einzelnen SNPs verwendeten RENs, ihren Schnittstellen(-Positionen) und entstehenden Produkte in Abhängigkeit vom Haplotyp.

Tabelle 27: Übersicht der SNPs und ihrer Restriktionsendonukleasen (die Position der Schnittstelle entspricht der Bp-Position im für den Enzymverdau verwendeten PCR-Produkt)

SNP	Endo-nuklease	Schnittstelle	Position der Schnittstelle	Haplotyp	Erwartete Fragmente
Bp 601	AlwNI	5'...CAGNNN*CTG...3' 3'...GTC*NNNGAC...5'	(360/357)	A/A	696 bp
				G/A	339 bp, 357 bp, 696 bp
				G/G	339 bp, 357 bp
Bp 1239	BaeGI	5'...GKGCM*C...3' 3'...C*MCGKG...5'	(161/157), (367/363)	C/C	161 bp, 206 bp, 281 bp
				G/C	161 bp, 206 bp, 281 bp, 367 bp
				G/G	281 bp, 367 bp
Bp 1281	Taq ^{ql}	5'...T*CGA...3' 3'...AGC*T...5'	(228/230)	A/A	441 bp
				G/A	213 bp, 228 bp, 441 bp
				G/G	213 bp, 228 bp

Für die RFLA wurde zunächst der den SNP enthaltende DNA-Abschnitt in einer PCR amplifiziert (2.2.3.). Die dabei entstandenen PCR-Produkte wurden dem Enzymverdau zugeführt. Der Reaktionsansatz dafür ist in Tabelle 28 dargestellt. Dieser wurde dann im Thermocycler (G-Storm GS1, AlphaMetrix Biotech GmbH, Rödermark) für 90 Minuten bei der idealen Arbeitstemperatur, welche für AlwNI und BaeGI 37 °C und für Taq^{ql} 65 °C ist, inkubiert. Danach erfolgte eine Hitzeinaktivierung der RENs bei 80 °C für 20 Minuten.

Tabelle 28: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für den Restriktionsenzymverdau

Reagenz	Volumen
PCR-Produkt	8,75 µl
CutSmart Buffer	1,0 µl
Restriktionsendonuklease	0,25 µl

Die Produkte des Enzymverdau wurden anschließend in einem 2,5-prozentigen Agarosegel mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und im UVP Gelstudio

(Analytik Jena) detektiert (2.2.4.). Aufgrund der Anzahl und der Länge der Fragmente konnte der Haplotyp bestimmt werden.

2.2.9. Statistik

Die statistischen Auswertungen wurden mit dem Programm *GraphPad Prism 6* (GraphPad Software, San Diego) durchgeführt.

2.2.9.1. Verwendete Tests zur statistischen Auswertung

Zu analysierende Datensätze wurden zunächst mittels Shapiro-Wilk-Test auf ihre Normalverteilung geprüft. In Abhängigkeit des Ergebnisses wurden dann entsprechend parametrische oder nicht-parametrische Tests für die statistische Auswertung verwendet. Zum Vergleich zweier unabhängiger Stichproben wurde als parametrischer Test der ungepaarte t-Test und als nicht-parametrische Alternative der Mann-Whitney-Test eingesetzt. Für die Varianzanalysen von mehr als zwei unabhängigen Stichproben, wurden der einfaktorielle ANOVA-Test (parametrischer Test) und der Kruskal-Wallis-Test (nicht-parametrischer Test) herangezogen.

Kontingenzanalysen zwischen zwei mal zwei Merkmalen erfolgten mittels exaktem Fisher-Test, für Kontingenzanalysen mit mehr als zwei mal zwei Merkmalen wurde der Chi-Quadrat-Test verwendet. Zur Testung von Korrelationen zwischen zwei Merkmalen kamen der Pearson-Test als parametrischer Test und der Spearman-Test als nicht-parametrische Alternative zum Einsatz. Bei bestätigten Korrelationen wurde eine lineare Regression durchgeführt.

Die Signifikanzniveaus wurden für alle Tests dabei wie folgt gewählt:

$p \leq 0,05$:	signifikant (*)
$p \leq 0,01$:	hoch signifikant (**)
$p \leq 0,001$:	höchst signifikant (***)

2.2.9.2. Überprüfung der SNPs auf eine Hardy-Weinberg-Verteilung

Das Hardy-Weinberg-Gesetz beschreibt den Zusammenhang zwischen Allelfrequenz und der Genotypen-Verteilung.

Bei einer gegebenen Allelfrequenz	$p + q = 1$
gilt	$p^2 + 2pq + q^2 = 1$

Dabei wird allerdings eine ideale Population (große Population mit zufälliger Paarung und Vererbung nach den Mendelschen Regeln, keine evolutionären Einflüsse, wie z. B. Selektion, Gendrift etc.) vorausgesetzt.

Für die analysierten Genotypen der SNPs wurde jeweils überprüft, ob eine Verteilung nach Hardy-Weinberg vorliegt. Dabei wurde die reale Allelfrequenz für p und q bestimmt. Diese wurden in die Hardy-Weinberg-Formel ($p^2 + 2pq + q^2 = 1$) eingesetzt. Die Formel wurde nun mit der insgesamten Anzahl der in der Realität für die ESMI-Kohorte vorliegenden Genotypen des entsprechenden SNP multipliziert. Damit wurde die ideale Verteilung nach Hardy-Weinberg für die gegebene Anzahl an Genotypen berechnet. Anschließend erfolgte mittels Chi-Quadrat-Test eine Kontingenz-Prüfung zwischen der realen und der berechneten idealen Genotypen-Verteilung. Das Ergebnis des Chi-Quadrat-Test zeigt, ob sich die reale Verteilung signifikant vom berechneten Hardy-Weinberg-Gleichgewicht unterscheidet.

3. Ergebnisse

Die Spinocerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3) ist eine seltene, autosomal dominant vererbte Erkrankung, die zur Neurodegeneration, insbesondere des Kleinhirns und anderer zentral-nervösen Strukturen, führt. Krankheitsverursachend ist eine Expansion der CAG-Wiederholungssequenz auf dem *Ataxin-3*-Gen (*ATXN3*), welche einen vermehrten Einbau der Aminosäure Glutamin in das Ataxin-3-Protein (*ATXN3*) zur Folge hat. Dies bedingt eine Aggregation des Proteins und seiner Spaltprodukte. Ein wichtiger Interaktionspartner des *ATXN3* stellt das Protein Parkin dar, welches von dem *PARK2*-Gen codiert wird.

Klinisch manifestiert sich die SCA3 vor allem in einem ataktischen Symptomkomplex, wobei Alter bei Symptombeginn (*Age at onset*, AAO) und Schwere der Symptomatik mit der Anzahl der CAG-Wiederholungen korrelieren. Um weitere Einflussfaktoren auf die Erkrankung, sowie mögliche Therapeutika zu testen, werden sensitive Biomarker, sowie multizentrische Kohorten mit ausreichender Stichprobengröße benötigt. Eine solche Kohorte stellt das ESMI-Projekt (*European Spinocerebellar Ataxia Type 3/Machado-Joseph Disease Initiative*) zur Verfügung.

Die ESMI-Kohorte stellt die Grundlage für alle erhobenen Daten dieser Arbeit dar. Abbildung 5 gibt einen Überblick über den *Workflow* der Arbeit. Für die ESMI-Kohorte lagen bereits demographische und klinische Daten, die Protein-Level des löslichen *ATXN3* (L-*ATXN3*) und zum Teil die Genotypen der *ATXN3*- und *PARK2*-Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) vor. Die Analysen der Genotypen der SNPs wurden mit unterschiedlichen molekulargenetischen Methoden fortgeführt. Mit den somit komplettierten Daten wurde mittels statistischer Verfahren mehreren Fragestellungen nachgegangen:

- Handelt es sich bei der ESMI-Kohorte in Bezug auf demographische und klinische Daten, sowie die *ATXN3*-Level und die Genotypen der SNPs, um eine homogene Kohorte?
- Bestätigt sich die Korrelation bestimmter Genotypen der *ATXN3*-SNPs mit einer CAG-Expansion?
- Kann eine Korrelation bestimmter Genotypen mit einer CAG-Expansion auch für *PARK2*-SNPs gefunden werden?

- Haben die Genotypen der *ATXN3*- und *PARK2*-SNPs eine Auswirkung auf klinische Daten oder das L-ATXN3-Level?
- Stellt das L-ATXN3-Level einen möglichen Biomarker für SCA3 dar? Korrelieren die Werte mit klinischen Daten?

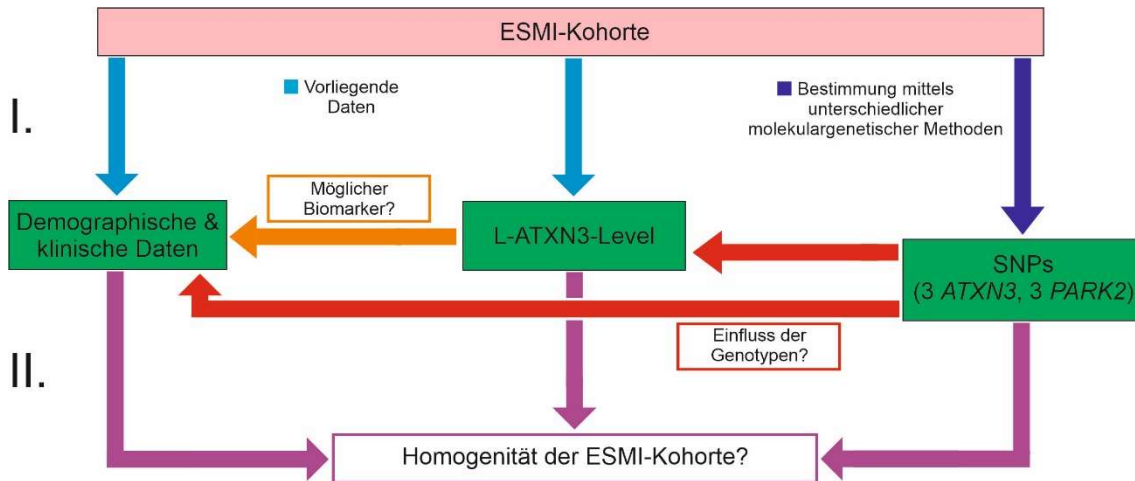


Abbildung 5: Workflow dieser Arbeit. Aus der ESMI-Kohorte wurden im ersten Schritt aus den europäischen klinischen Zentren (I.) klinische standardisierte Daten erhoben (hell- und dunkelblaue Pfeile). Die klinischen Daten der Kohorte (grüne Rechtecke) wurden dann im zweiten Schritt (II.) mittels statistischer Verfahren auf unterschiedliche Fragenstellungen, wie beispielsweise, ob die ESMI-Kohorte eine homogene Kohorte ist, analysiert (lila Pfeile). Der orangene und die beiden roten Pfeile zeigen dabei an, welche Daten zur Beantwortung der entsprechenden Fragestellung auf mögliche Korrelationen/Abhängigkeiten untereinander untersucht wurden.

3.1. Kohortenanalyse der ESMI-Kohorte

3.1.1. Zusammensetzung der ESMI-Kohorte

Die ESMI-Kohorte setzt sich aus sechs Einzelkohorten zusammen, die an den Standorten der ESMI-Zentren Tübingen (Tü), Bonn (Bo), Nijmegen (Ni), London (Lo), Coimbra (Co) und den Azoren (Az) rekrutiert wurden. Für zukünftige klinische Studien anhand der ESMI-Kohorte ist es relevant zu überprüfen, inwieweit die Zusammenführung der Einzelkohorten eine homogene Gesamtkohorte ergibt. Die Rekrutierung der ESMI-Kohorte stellte zum Zeitpunkt dieser Auswertungen keinen abgeschlossenen Prozess dar. Somit kann sich die Zusammensetzung der Kohorte im zeitlichen Verlauf möglicherweise verändern. Umgekehrt besteht jedoch auch die Möglichkeit, gegebenenfalls mangelnde Homogenität der Kohorte durch Angleichen von Rekrutierungsstrategien entgegenzuwirken.

Dieser Arbeit lagen Daten von 308 Studienteilnehmern zugrunde. Davon wurden 33 in Tübingen, 48 in Bonn, 27 in Nijmegen, 73 in London, 63 in Coimbra und 64 auf den Azoren rekrutiert. Es handelte sich dabei um 145 Männer und 162 Frauen (für eine(n) Studienteilnehmer/in lag keine Angabe zum Geschlecht vor), die im Median 48 Jahre alt waren. Das Alter bezieht sich hierbei und auch in allen folgenden Analysen auf das Alter zum Zeitpunkt der Datenerhebung im Rahmen ihrer Rekrutierung. In der Gesamtkohorte und in der Einzelkohorte aus London war das Alter nicht normalverteilt, weshalb im Sinne der Vereinheitlichung für die Gesamt-Kohorte und für alle Einzelkohorten mit dem Median operiert wurde. Bei 229 Studienteilnehmern lag eine CAG-Expansion vor, die Gruppe der gesunden Kontrollen umfasste 79 Individuen. Erwähnenswert ist hierbei, dass auf den Azoren ausschließlich Mutationsträger rekrutiert wurden. Die Mutationsträger wurden anhand des SARA-Scores in nicht-ataktisch (nicht-atakt.) und ataktisch (atakt.) unterteilt. Studienteilnehmer mit einem SARA-Score ≥ 3 galten dabei als ataktisch, während Personen mit einem SARA-Score $\leq 2,5$ der nicht-ataktischen Gruppe zugeteilt wurden. Die Einteilung anhand dieses Kriteriums ergab für die ESMI-Kohorte 190 ataktische und 39 nicht-ataktische Mutationsträger. Tabelle 29 gibt einen umfassenden Überblick über die Zusammensetzung der ESMI-Kohorte. In manchen der in dieser Arbeit folgenden Analysen unterscheidet sich die Anzahl der eingeschlossenen Studienteilnehmer von der in Tabelle 29 für die jeweilige Einzelkohorte gemachten Angabe. Dies liegt darin begründet, dass demographische und klinische Daten zum Teil nicht für alle Studienteilnehmer bekannt waren und somit jeweils nur Probanden, deren für die entsprechende Analyse benötigten Daten vollständig vorlagen, eingeschlossen werden konnten.

Tabelle 29: Zusammensetzung der ESMI-Kohorte (*m = männlich, w = weiblich*)

	Ges.	Tü	Bo	Ni	Lo	Co	Az
Studienteilnehmer	308	33	48	27	73	63	64
m	145	12	26	20	26	30	31
w	162	21	21	7	47	33	33
medianes Alter (in Jahren)	48	51	48,5	51	49	51	44
Kontrollen	79	12	18	6	29	14	0
m	35	5	10	4	12	4	-

	Ges.	Tü	Bo	Ni	Lo	Co	Az
w	44	7	8	2	17	10	-
medianes Alter (in Jahren)	44	43	46,5	48	42	46	-
Nicht-atakt. Mutationsträger	39	4	5	1	5	5	19
m	15	3	1	0	1	2	8
w	24	1	4	1	4	3	11
medianes Alter (in Jahren)	34	32,5	30	29	34	46	35
Atakt. Mutationsträger	190	17	25	20	39	44	45
m	95	4	15	16	13	24	23
w	94	13	9	4	26	20	22
medianes Alter (in Jahren)	52	55	51	51	54	53,5	47

3.1.2. Untersuchung der Homogenität der demographischen Daten

Für die Überprüfung der Homogenität der demographischen Daten der ESMI-Kohorte wurden Geschlecht und Alter der Studienteilnehmer näher betrachtet. In Abbildung 6A ist das Geschlechterverhältnis der gesamten ESMI-Kohorte als Kreisdiagramm dargestellt. Dabei war mit 47,2 % Männern und 52,8 % Frauen das Geschlechterverhältnis für die Gesamt-Kohorte ausgeglichen. Die Betrachtung des Geschlechterverhältnisses für die jeweiligen Zentren, ergab ein heterogenes Bild (Abb. 6B). So zeigten die Zentren Bonn (55 % männlich, 45 % weiblich), Coimbra und die Azoren (jeweils 48 % männlich, 52% weiblich) ebenfalls ein ausgeglichenes Verhältnis, während dies in Tübingen, London (jeweils 36 % männlich, 64 % weiblich) und Nijmegen (74 % männlich, 26 % weiblich) deutlich unausgeglichener war. Eine Aufschlüsselung des Geschlechterverhältnisses an den Zentren in Kontrollen und Mutationsträger ergab jeweils ein vergleichbares Bild (Daten nicht gezeigt).

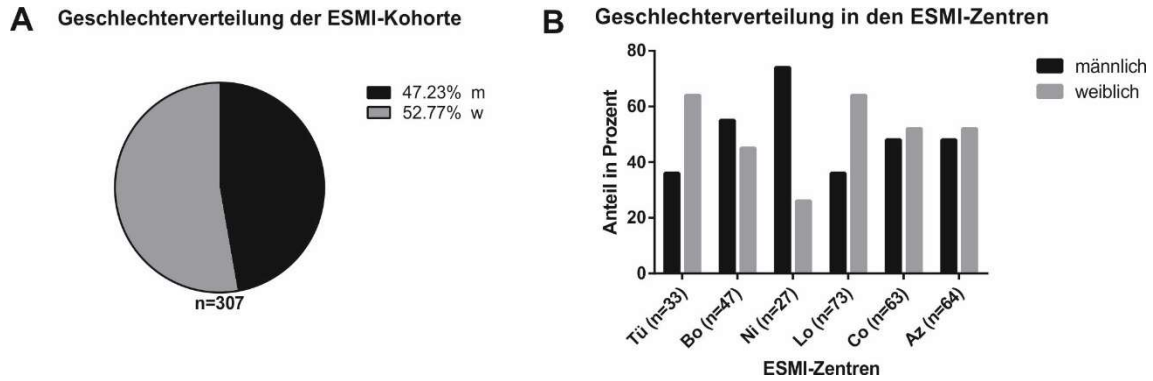


Abbildung 6: Geschlechterverhältnis in der ESMI-Kohorte und in den einzelnen Zentren. A: Geschlechterverhältnis der gesamten ESMI-Kohorte, m = männlich, w = weiblich. Für eine(n) Studienteilnehmer(in) der ESMI-Kohorte war das Geschlecht nicht bekannt, weshalb nur 307 statt der 308 Studienteilnehmer der Gesamtkohorte in die Geschlechterverteilung einbezogen wurden. **B:** Geschlechterverhältnis der einzelnen ESMI-Zentren. n gibt in beiden Grafiken die Anzahl der Studienteilnehmer an.

Die Studienteilnehmer der ESMI-Kohorte waren zum Zeitpunkt der Rekrutierung im Median 48 Jahre (Minimum 21 Jahre, Maximum 82 Jahre) alt. Zwischen der Altersverteilung der an den jeweiligen Zentren rekrutierten Teilnehmern gab es keine signifikanten Abweichungen (Kruskal-Wallis-Test, $p = 0,1167$); (Abb. 7A). Teilte man die Gesamt-Kohorte in Kontrollen und Mutationsträger ein und verglich die Altersverteilung der beiden Gruppen, so war auch hier kein signifikanter Unterschied zu beobachten (ungepaarter t-Test, $p = 0,2117$); (Abb. 7B). Bei den Mutationsträgern konnte des Weiteren zwischen nicht-ataktischen und ataktischen Mutationsträgern unterschieden werden. Der Vergleich zwischen diesen beiden Gruppen und den Kontrollen, ergab ein höchst signifikanter Unterschied im einfaktoriellen ANOVA-Test ($p < 0,0001$); (Abb. 7C). Da nicht-ataktische Mutationsträger zwangsläufig eine junge Kohorte bilden, war dies ein zu erwartendes Ergebnis. Allerdings zeigte sich, wenn man jeweils zwei der drei Gruppen im ungepaarten t-Test miteinander verglich, dass nicht nur zwischen den nicht-ataktischen Mutationsträgern und den Kontrollen bzw. zwischen den nicht-ataktischen und ataktischen Mutationsträgern ein signifikanter Unterschied bestand (p jeweils $< 0,0001$), sondern auch zwischen den Kontrollen und den ataktischen Mutationsträger ($p = 0,0018$).

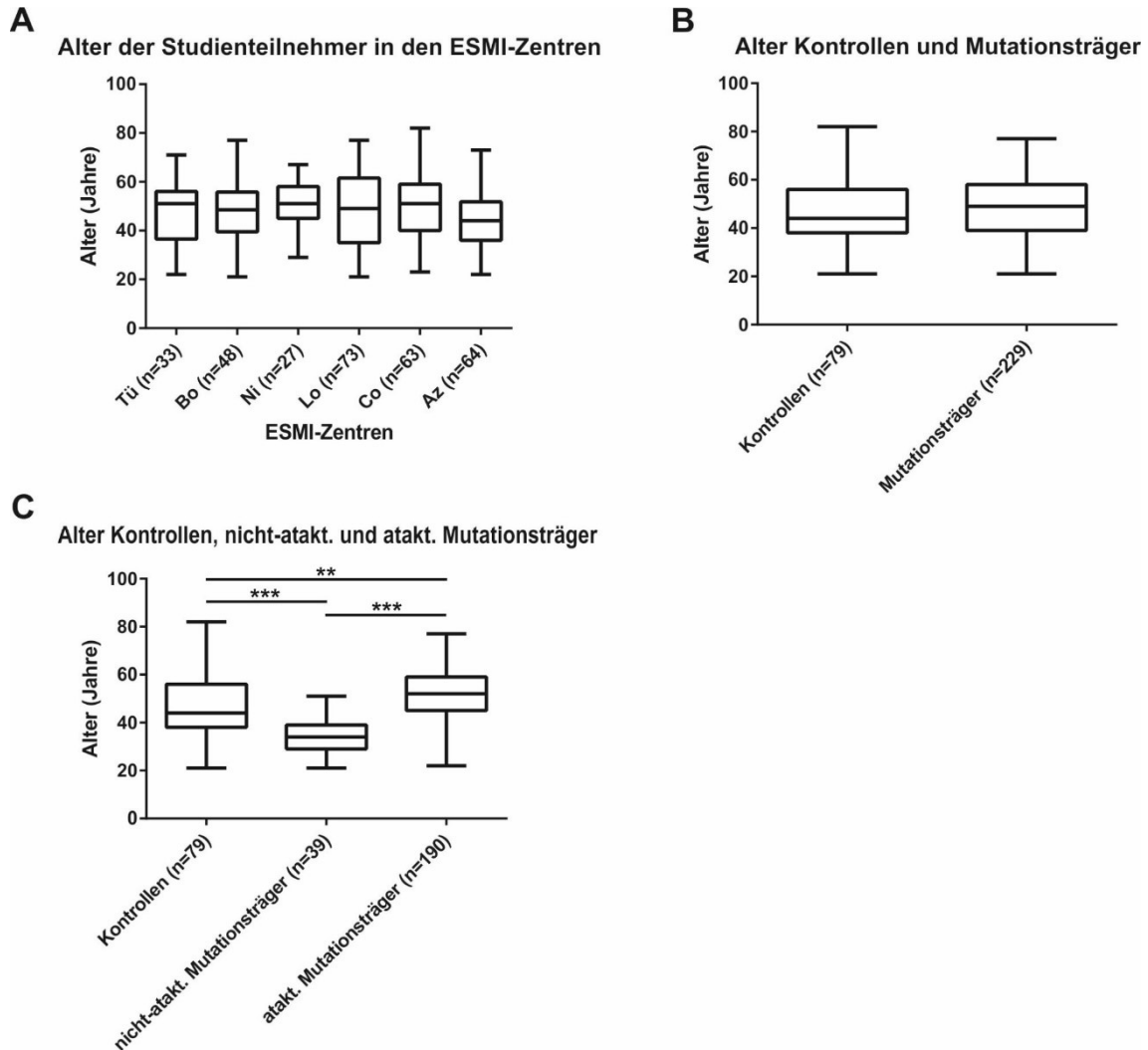


Abbildung 7: Alter in den ESMI-Zentren, sowie zwischen Kontrollen und Mutationsträger.
 A: Darstellung des medianen Alters (in Jahren) in den ESMI-Zentren: Tü = 51; Bo = 48,5; Ni = 51; Lo = 49; Co = 51; Az = 44. Der Kruskal-Wallis-Test zeigte keine signifikanten Abweichungen ($p = 0,1167$). B: Medianes Alter (in Jahren) der Kontrollen und Mutationsträger der gesamten ESMI-Kohorte: Kontrollen = 44; Mutationsträger = 49. Es ergab sich keine Signifikanz im ungepaarten t-Test ($p = 0,2117$). C: Medianes Alter (in Jahren) aufgeteilt in Kontrollen, sowie nicht-ataktischen und ataktische Mutationsträger: Kontrollen = 44; nicht-ataktische Mutationsträger = 34; ataktische Mutationsträger = 52. Im ungepaarten t-Test ergab sich zwischen den Kontrollen und den nicht-ataktischen Mutationsträger und zwischen den nicht-ataktischen und ataktischen Mutationsträgern ein höchst signifikanter Unterschied (p jeweils $< 0,0001$). Zwischen den Kontrollen und den ataktischen Mutationsträgern war der Unterschied hoch signifikant (ungepaarter t-Test, $p = 0,0018$). n steht in allen drei Grafiken für die Anzahl der Studienteilnehmer. Im Boxplot der Darstellungen wird der Median mit dem unteren und oberen Quartil gezeigt, die Whisker geben Minimum und Maximum an.

3.1.3. Untersuchung der Homogenität der klinischen Daten

Zur Untersuchung der Homogenität der klinischen Daten wurden der SARA-Score, das Age at onset (AAO) und die *Cross-sectional Disease Progression* (CSDP) herangezogen. Der SARA-Score ist eine klinische Bewertungsskala zur

Beurteilung der Schwere der ataktischen Symptomatik und besitzt eine Messbreite von 0 (asymptomatisch) bis 40 Punkte (schwerste Symptomatik). Der SARA-Score gibt somit Auskunft über die Schwere der Erkrankung zum Zeitpunkt der Erhebung. Für die Frage der Homogenität der ESMI-Kohorte ist es relevant, ob an den unterschiedlichen Zentren Patienten mit vergleichbarer Schwere der Symptomatik rekrutiert wurden. In die folgenden Analysen wurden nur die SARA-Scores der ataktischen Mutationsträger einbezogen.

Der mediane SARA-Score der ataktischen Mutationsträger der gesamten ESMI-Kohorte betrug 15 Punkte (Minimum 3 Punkte, Maximum 40 Punkte). In Abbildung 8 sind die SARA-Scores der Studienteilnehmer auf die entsprechenden Zentren bezogen dargestellt. Der höchste mediane SARA-Score fand sich mit 17 Punkten bei den Studienteilnehmern in London. Die Studienteilnehmer aus Nijmegen zeigten mit 10,5 Punkten den niedrigsten medianen SARA-Score. Hierbei ergab der Kruskal-Wallis-Test aber keine signifikanten Abweichungen zwischen den Zentren ($p = 0,1827$).

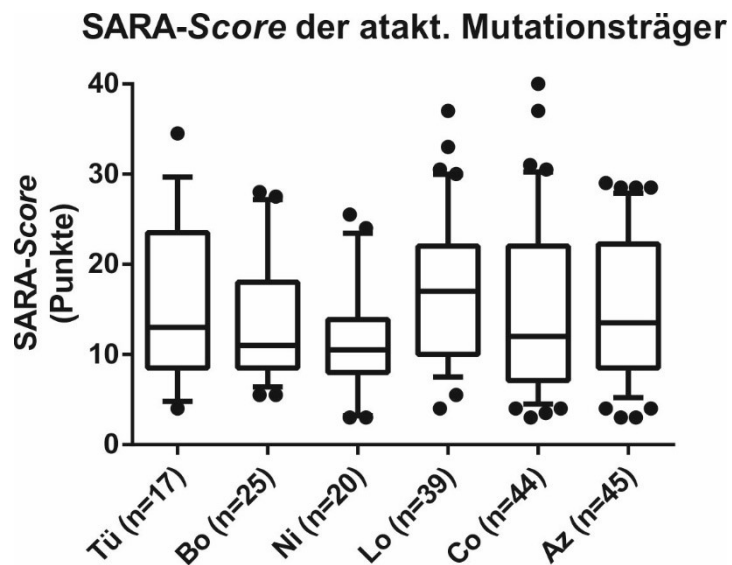


Abbildung 8: SARA-Score der ataktischen Mutationsträger in den ESMI-Zentren. Medianer SARA-Score in den unterschiedlichen ESMI-Zentren (in Punkten): Tü = 13; Bo = 11; Ni = 10,5; Lo = 17; Co = 12; Az = 13,5. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Kruskal-Wallis-Test ($p = 0,1827$). Darstellung im Boxplot mit Median, sowie dem unteren und oberen Quartil. Die Whisker geben die 10. und 90. Perzentile an. Die Punkte zeigen die Werte außerhalb dieses Bereiches an.

Das AAO zeigt das Alter bei Symptombeginn, gemessen am SARA-Score (≥ 3), an. Knapp die Hälfte des AAO kann mit der Anzahl der CAG-Wiederholungen erklärt werden, weitere Einflussfaktoren konnten bislang nicht bestimmt werden (van de Warrenburg et al., 2005). Da hier auch Umwelteinflüsse als Faktoren nicht auszuschließen sind, wurde überprüft, ob beim AAO signifikante Unterschiede zwischen den ESMI-Zentren existieren. Abbildung 9 zeigt eine Boxplot-Darstellung für das AAO in den ESMI-Zentren. Für die Analysen wurden ebenfalls nur ataktische Mutationsträger einbezogen. Im Median lag das AAO für die gesamte ESMI-Kohorte bei 39 Jahren (Minimum 13 Jahre; Maximum 69 Jahre). Den höchsten Median zeigte dabei die Einzelkohorte aus Bonn mit 42 Jahren, den niedrigsten die Einzelkohorte von den Azoren mit 35 Jahren, die Abweichungen waren dabei aber nicht statistisch signifikant (einfaktorieller ANOVA-Test, $p = 0,2628$).

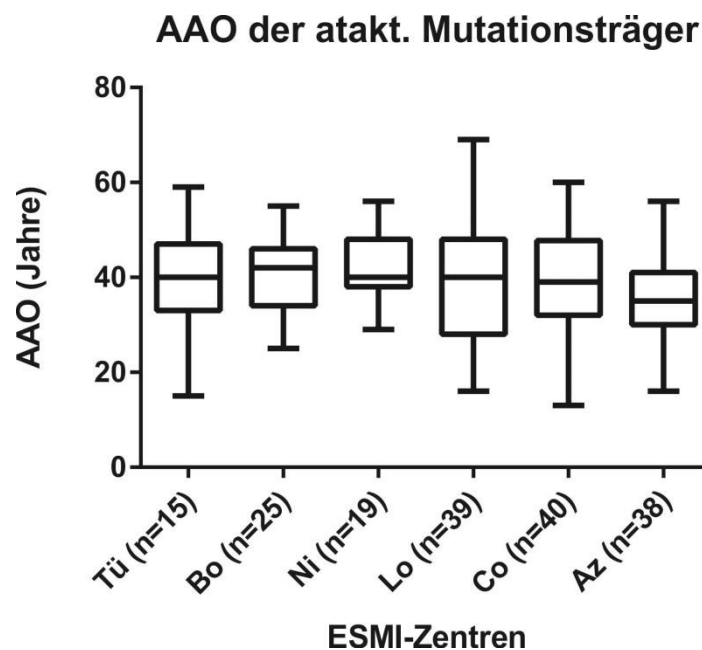


Abbildung 9: AAO der ataktischen Mutationsträger in den ESMI-Zentren. Der einfaktorielle ANOVA-Test ergab keine signifikante Abweichung zwischen den Zentren ($p = 0,2628$). n steht für die Anzahl der Studienteilnehmer. Mediane AAOs (in Jahren): Tü = 40; Bo = 42; Ni = 40; Lo = 40; Co = 39; Az = 35. Darstellung des Medians, sowie dem unteren und oberen Quartil mittels der Box. Die Whisker entsprechen dem Minimum und Maximum.

Die CSDP ist ein Maß für die durchschnittliche Geschwindigkeit der Krankheitsprogression. Es handelt sich dabei um den Quotienten aus SARA-Score und der

Krankheitsdauer und gibt damit an, um wie viele Punkte sich der SARA-Score durchschnittlich pro Jahr seit symptomatischem Krankheitsbeginn verändert hat. Der Wert wurde nur für die ataktischen Mutationsträger berechnet. Im Median lag die CSDP für die ESMI-Kohorte bei 1,4 Punkten/Jahr (Minimum 0,3 Punkte/Jahr; Maximum 6,0 Punkte/Jahr). Bei der gesonderten Betrachtung der einzelnen Länder-Kohorten zeigte Bonn mit 1,6 Punkten/Jahr im Median die höchste CSDP. Die niedrigste mediane CSDP ergab sich für Tübingen und Coimbra mit jeweils 1,3 Punkten/Jahr (Abb. 10). Zwischen den einzelnen Zentren zeigte sich dabei kein signifikanter Unterschied (Kruskal-Wallis-Test, $p = 0,3133$).

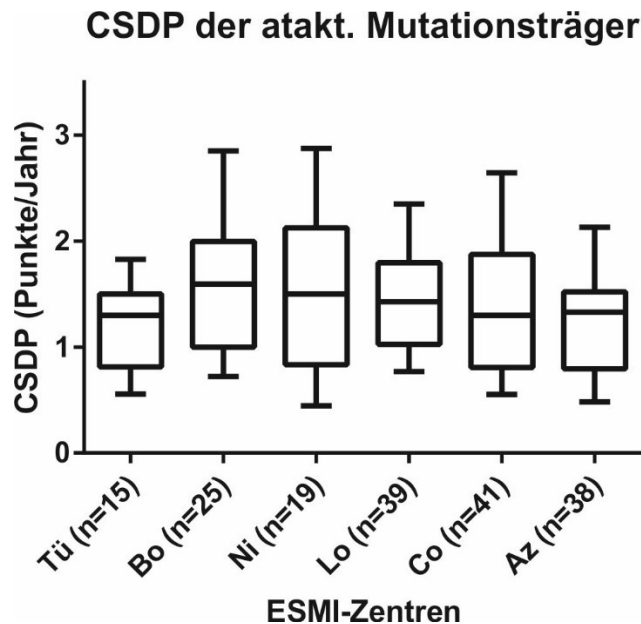


Abbildung 10: CSDP der ataktische Mutationsträger in den ESMI-Zentren. Darstellung der CSDP (SARA-Score/Krankheitsdauer) in den ESMI-Zentren. Die CSDP wurde nur für ataktische Studienteilnehmer berechnet. Mediane CSDP (in Punkte/Jahr): Tü = 1,3; Bo = 1,6; Ni = 1,5; Lo = 1,4; Co = 1,3; Az = 1,3. Die Box zeigt jeweils den Median mit oberem und unterem Quartil an. Die Whisker entsprechen der 10. und 90. Perzentile.

3.1.4. Häufigkeit der CAG-Wiederholungen in der ESMI-Kohorte

Die CAG-Wiederholungsanzahl im *ATXN3*-Gen variiert sowohl in nicht-expandierten als auch in den expandierten Allelen. Für die ESMI-Kohorte wurde die Verteilung der CAG-Wiederholungsanzahl geprüft. In Abbildung 11 ist die Häufigkeit der CAG-Wiederholungen als Balkendiagramm dargestellt, wobei im nicht-expandierten Bereich zwischen den normalen Allelen der Mutationsträger und

den Allelen der Kontrollen unterschieden wurde. Im nicht-expandierten Bereich fanden sich Allele mit Wiederholungsanzahlen von 14 bis 35 Wiederholungen. Dabei fiel auf, dass sowohl bei den nicht-expandierten Allelen der Mutationsträger als auch den Allelen der Kontrollen die Wiederholungsanzahlen 14, 23 und 27 besonders häufig vorkamen. Betrachtete man alle Allele im nicht-expandierten Bereich, so traten 23 Wiederholungen mit 94 Allelen am häufigsten auf, gefolgt von 14 Wiederholungen mit 81 Allelen und 27 Wiederholungen mit 49 Allelen. Für die getrennte Betrachtung der nicht-expandierten Allele der Mutationsträger und der Allele der Kontrollen ergaben sich vergleichbare Verteilungsmuster. Bei den expandierten Allelen traten CAG-Wiederholungslängen von 57 bis 78 Wiederholungen auf. Hierbei waren die häufigsten Wiederholungsanzahlen 69, 70 (jeweils 30 Allele), 71 (25 Allele) und 72 (24 Allele).

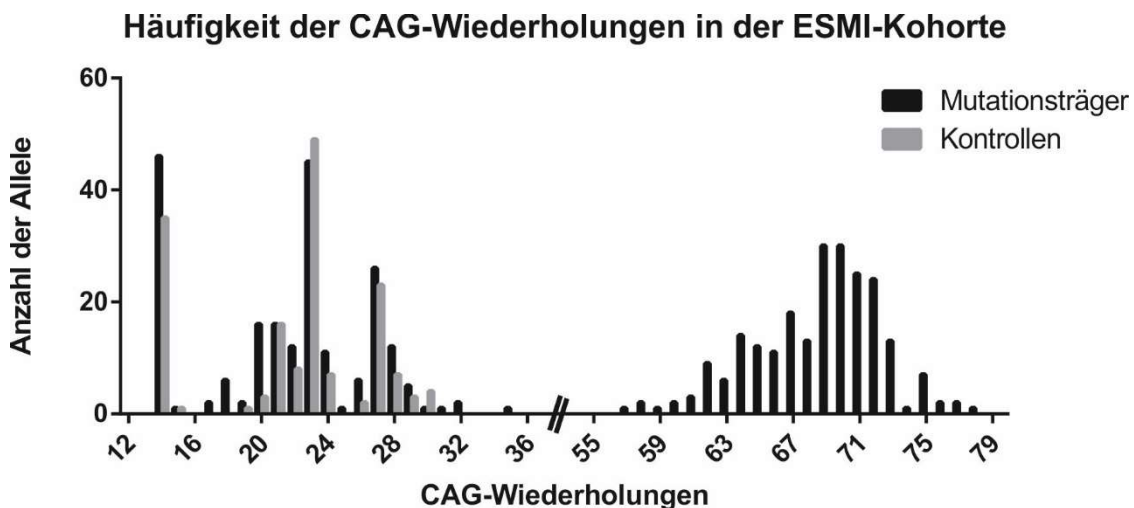


Abbildung 11: Häufigkeit der CAG-Wiederholungen in der ESMI-Kohorte. Im nicht expandierten Bereich traten bei den Allelen der Kontrollen und den nicht-expandierten Allelen der Mutationsträger CAG-Wiederholungen von 14 bis 35 auf. Bei den expandierten Allelen der Mutationsträger betrug die Wiederholungsanzahl 57 bis 78.

3.1.5. Anzahl der CAG-Wiederholungen und Age at onset

Es wurde für die ESMI-Kohorte untersucht, welcher Anteil der Varianz des AAOs mit der Anzahl der CAG-Wiederholungen im *ATXN3*-Gen erklärt werden kann. Dazu wurde für 172 ataktische Studienteilnehmer das AAO gegen die Anzahl der CAG-Wiederholungen aufgetragen (Abb. 12). Es zeigte sich im Pearson-Test eine höchst signifikante negative Korrelation zwischen den beiden Merkmalen

($r = -0,6500$, $p < 0,0001$). In der linearen Regression ergab sich ein R^2 -Wert von 0,4226.

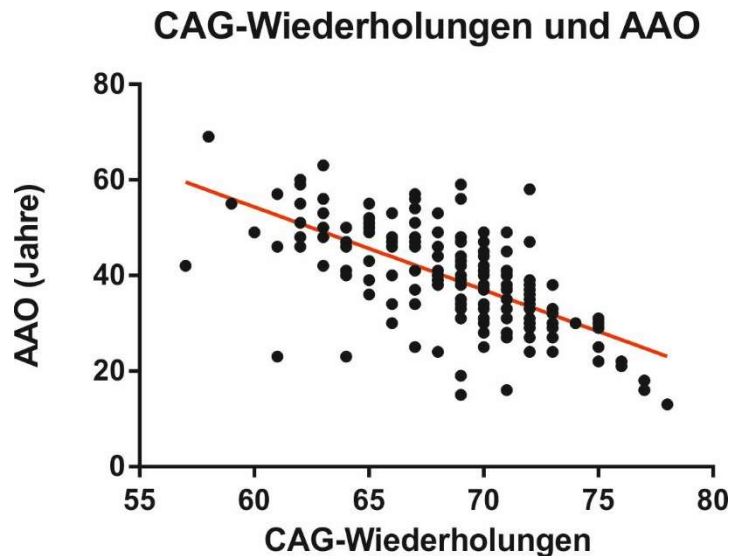


Abbildung 12: Korrelation der CAG-Wiederholungsanzahl und des AAOs. Es wurde für 172 ataktische Studienteilnehmer das AAO (in Jahren) gegen die CAG-Wiederholungen aufgetragen. Die Punkte stellen jeweils das Datenpaar eines Studienteilnehmers dar. Im Pearson-Test ergab sich eine höchst signifikante negative Korrelation ($r = -0,6500$, $p < 0,0001$). Die rote Gerade zeigt die lineare Regression an. Der R^2 -Wert betrug 0,4226.

3.2. Genotypen-Verteilungen der SNPs

Bei SNPs handelt es sich um Varianten einzelner Basen im Genom, deren Allelfrequenz in einer Population $\geq 1\%$ ist. Für diese Arbeit wurden die Genotypen jeweils dreier SNPs des *ATXN3*-Gens (rs1048755, rs12895357, rs7158733) und des *PARK2*-Gens (rs1801474, rs1891582, rs1801334) analysiert.

3.2.1. *ATXN3*-SNP Bp 669

Der SNP Bp 669 (rs1048755) liegt auf dem *ATXN3*-Gen in 5'-Richtung vor der CAG-Wiederholungssequenz auf Exon 8. Es kommt dabei zum Basenaustausch $\underline{G}^{669}TC \rightarrow \underline{C}^{669}TC$, wodurch auf Proteinebene an AS-Position 212 Valin durch Methionin ersetzt wird. Global gesehen tritt dabei die Variante $\underline{G}^{669}TC$ ($\rightarrow \text{Val}^{212}$) in 75 % der Allele auf (NCBI/SNP). Dieser Arbeit lagen Daten bereits zuvor analysierter Genotypen des SNP Bp 669 zugrunde. Für die Genotypen war dabei aufgrund der Bestimmungs-Methode keine Zuordnung der einzelnen Haplotypen zum jeweiligen Allel möglich. Es konnte also für Mutationsträger nicht zwischen

der Variante des nicht-expandierten Allels und des expandierten Allels differenziert werden.

Die Genotypen des SNP Bp 669 lagen für 258 Studienteilnehmer der ESMI-Kohorte vor, wovon 191 Mutationsträger und 67 gesunde Kontrollen waren. Insgesamt zeigte sich bei 51,2 % der Genotyp A/G, bei 32,6 % G/G und bei 16,3 % A/A. Dieses Verteilungsmuster entsprach dem berechneten Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (Chi Quadrat-Test, $p = 0,8626$). Da der Anteil der Mutationsträger deutlich größer war, ähnelte die Verteilung der gesamten Kohorte der der Mutationsträger. Bei diesen wiesen 59,2 % A/G und jeweils 20,4 % G/G und A/A auf. Für die Kontrollen ergab sich mit 28,4 % A/G, 67,2 % G/G und 4,5 % A/A ein deutlich anderes Verteilungsmuster (Abb. 13). Zur Untersuchung von Kontingenzen wurde der Chi-Quadrat-Test eingesetzt. In diesem zeigte sich dabei eine höchst signifikante Abhängigkeit zwischen den Merkmalen Genotyp des SNPs und genetischer SCA3-Status (gesunde Kontrolle oder Mutationsträger), ($p < 0,0001$). Die Allelfrequenz für die Kontrollen betrug $f_G = 0,81$ und $f_A = 0,19$ und für die Mutationsträger $f_A/f_G = 0,5$.

SNP Bp 669

Gesamte ESMI-Kohorte

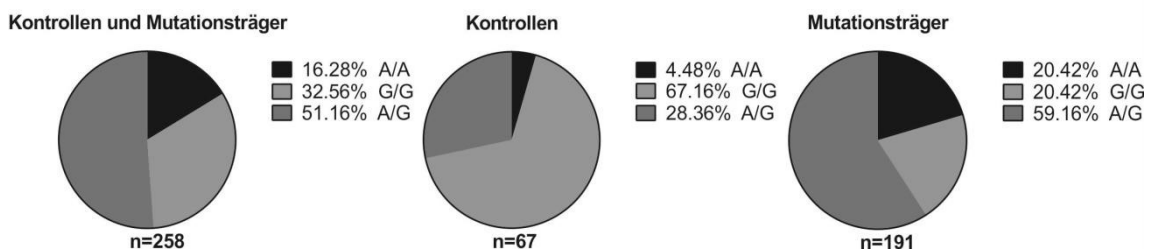
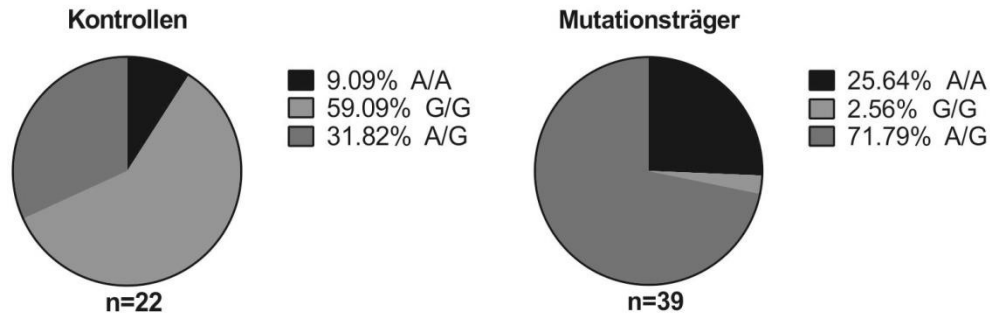


Abbildung 13: Verteilung der Genotypen des ATXN3-SNP Bp 669 in der ESMI-Kohorte. Verteilung der Genotypen für die gesamte ESMI-Kohorte mit Kontrollen und Mutationsträger, sowie für jeweils beide Gruppen einzeln. n gibt die Anzahl der Studienteilnehmer an. Der Chi-Quadrat-Test mit den Merkmalen Kontrollen/Mutationsträger und Genotyp war höchst signifikant ($p < 0,0001$).

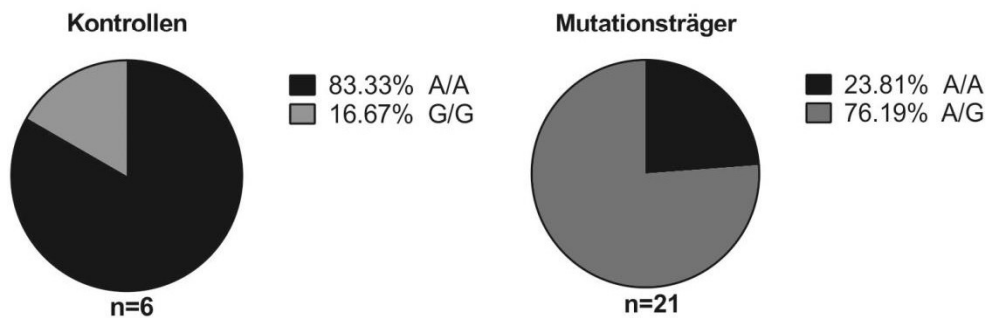
Ergebnisse

SNP Bp 669

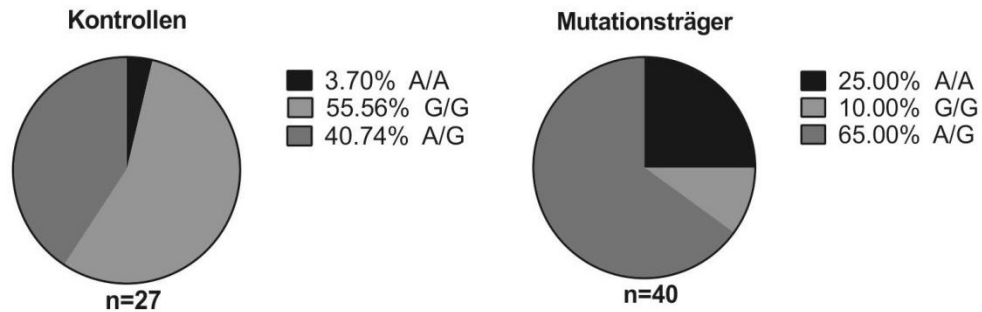
Deutschland



Niederlande



Großbritannien



Portugal

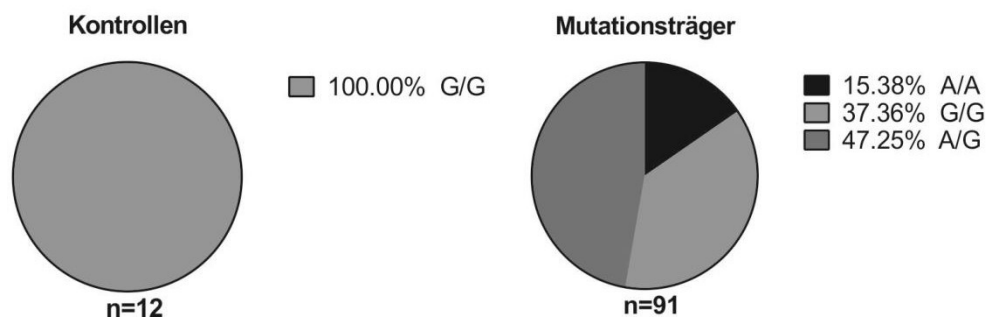


Abbildung 14: Genotypen-Verteilungen des ATXN3-SNPs Bp 669 nach Ländern aufgeteilt. Genotypen-Verteilung für die einzelnen Länder der ESMI-Zentren, jeweils in Kontrollen und Mutationsträger aufgeteilt. Für Deutschland, Großbritannien und Portugal bestand eine höchst signifikante Abhängigkeit im Chi-Quadrat-Test zwischen dem genetischen SCA3-Status (gesunde

Kontrolle oder Mutationsträger) und dem SNP-Genotyp (p jeweils $\leq 0,0002$). Aufgrund der kleinen Größe der Kontrollgruppe war der Chi-Quadrat-Test für die Niederlande nicht aussagekräftig. Eine Kontingenz konnte auch für die Mutationsträger zwischen den Merkmalen Herkunftsland und Genotyp nachgewiesen werden (Chi-Quadrat-Test $p < 0,0001$). Für die Kontrollen wiederum war das Ergebnis des entsprechenden Chi-Quadrat-Tests wegen zu kleiner Stichproben nicht aussagekräftig.

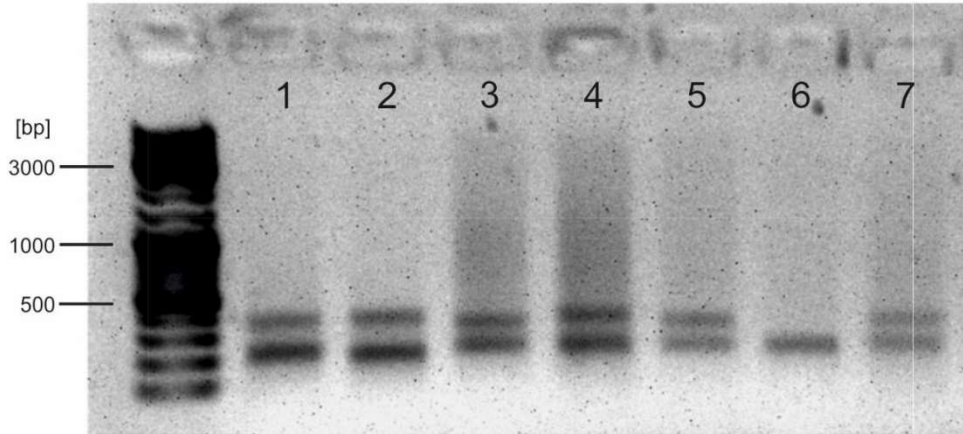
Die Genotypen-Verteilung des SNPs Bp 669 wurde weiterhin in den einzelnen regionalen Kohorten untersucht. Dafür wurden die Studienteilnehmer nach den Ländern, in welchen sie rekrutiert wurden, aufgeteilt. Somit ergaben sich die Kohorten Deutschland (ESMI-Zentren Tübingen und Bonn), Niederlande (ESMI-Zentrum Nijmegen), Großbritannien (ESMI-Zentrum London) und Portugal (ESMI-Zentren Coimbra und Azoren). Diese Aufteilung nach Ländern wurde auch für die Analysen der anderen SNPs angewendet. Die genaue Verteilung der Genotypen für die einzelnen Länder, jeweils nach Kontrollen und Mutationsträger separiert, ist Abbildung 14 zu entnehmen. Wie in der gesamten Kohorte war auch für alle Länder A/G der häufigste Genotyp bei den Mutationsträger (47,3 % bis 76,2 %), während er bei den Kontrollen vergleichsweise selten auftrat (0% bis 40,7 %). Hier dominierte in Deutschland, Großbritannien und Portugal G/G (55,6 % bis 100 %). Die Genotypen-Verteilung der Kontrollen aus den Niederlanden fiel mit 83,3 % A/A aus dem Muster. Hierbei muss jedoch auf die sehr kleine Stichprobengröße von lediglich sechs Studienteilnehmern hingewiesen werden. Die Merkmale genetischer SCA3-Status und Genotyp wurden für die einzelnen Länder mittels Chi-Quadrat-Test auf Kontingenz getestet. Dabei ergab sich für Deutschland, Großbritannien und Portugal eine höchst signifikante Abhängigkeit dieser Merkmale (p jeweils $\leq 0,0002$). Für die Niederlande konnte aufgrund der kleinen Anzahl an Kontrollen kein aussagekräftiges Ergebnis erzielt werden. Weiter wurde eine Abhängigkeit zwischen den Herkunftsländern und den Genotypen untersucht. Dafür wurden ein Chi-Quadrat-Test jeweils für die Kontrollen und Mutationsträger durchgeführt. Wegen zu geringer Stichprobengrößen konnte dieser für die Kontrollen kein aussagekräftiges Ergebnis liefern, für die Mutationsträger dagegen ergab sich eine höchst signifikante Abhängigkeit ($p < 0,0001$).

3.2.2. ATXN3-SNP Bp 987

Der SNP Bp 987 (rs12895357) liegt auf dem Exon 10 des *ATXN3*-Gens und entspricht der Bp-Position unmittelbar am 3'-Ende der CAG-Wiederholungssequenz. Aufgrund dieser Lage hängt die genaue Bp-Position des SNPs von der Anzahl der CAG-Wiederholungen ab. Im Folgenden gemachte Angaben beziehen sich auf eine Referenz-Anzahl von 13 Triplett-Wiederholungen. Für den SNP Bp 987 existieren die Varianten $\underline{G}^{987}GG$ und $\underline{C}^{987}GG$. Erstere führt auf Proteinebene zu einem Einbau von Glycin an AS-Position 318, während letztere für Arginin codiert. Weltweit liegt bei 75 % der Allele die Variante $\underline{G}^{987}GG$ (\rightarrow Gly³¹⁸) vor (NCBI/SNP). Für diese Arbeit wurde zum einen Teil auf bereits analysierte Genotypen von 163 Studienteilnehmern zurückgegriffen, zum anderen Teil wurden weitere 120 Genotypen selbst bestimmt. Die Bestimmung erfolgte mit einer Fragmentlängenanalyse mittels spezifischer *Primer*. Dafür fand zunächst eine PCR zur Vervielfältigung der entsprechenden DNA-Abschnitte statt, wobei zwei unterschiedlich fluoreszenzmarkierte Rückwärts-*Primer* verwendet wurden. Diese unterschieden sich in der komplementären Base zum SNP Bp 987 und wurden somit in Abhängigkeit der SNP-Variante eingebaut. Es erfolgte die Nachweiskontrolle der PCR-Produkte in einem einprozentigen Agarosegel. Daraufhin wurden die PCR-Produkte in einem entsprechenden Analysegerät aufgetrennt, die Fluoreszenzfarbstoffe angeregt und die induzierten Fluoreszenzsignale detektiert. In Abbildung 15 sind Beispiele für ein Kontrollgel und Ergebnisse der Fragmentlängenanalyse dargestellt.

A

Ergebnisse Kontrollgel SNP Bp 987



B

Ergebnisse Fragmentlängenanalyse SNP Bp 987

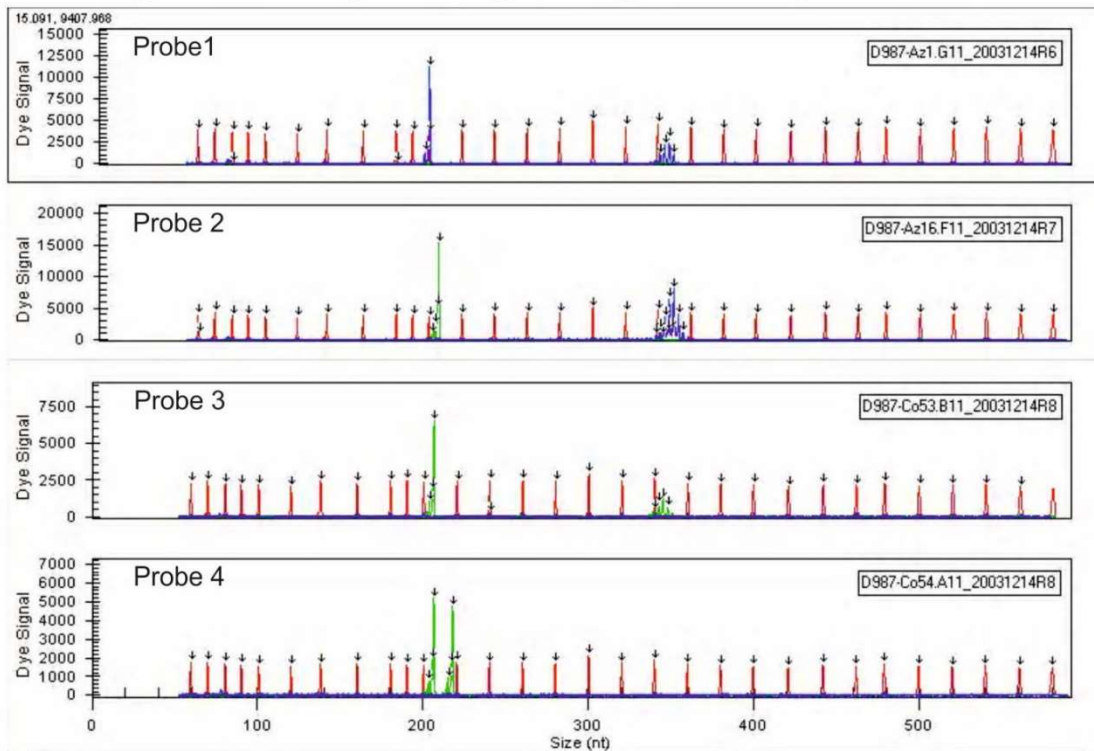


Abbildung 15: Exemplarische Ergebnisse von Kontrollgel und Fragmentlängenanalyse für den SNP Bp 987. A: Exemplarische Ergebnisse eines Kontrollgels. Die Banden ganz links zeigen den Längenstandard. Für die Proben 1-5 und 7 sind jeweils zwei Banden detektierbar, was einem heterozygoten Genotyp entspricht. Probe 6 dagegen stammt von einer gesunden Kontrolle, da sich beide Allele nur gering in der Anzahl der CAG-Wiederholungen unterscheiden, bildet sich dies als nur eine Bande im Agarosegel ab. B: Beispiele für Ergebnisse der Fragmentlängenanalyse. Auf den Abszissen ist die Größe der Fragmente in Anzahl der Nukleotide (Size (nt)) angegeben, auf den Ordinaten ist das detektierte Fluoreszenzsignal (Dye Signal) aufgetragen. Die roten Signale entsprechen einem Längenstandard zur Größenbestimmung der Fragmente. Grüne Fluoreszenz-Peaks zeigen ein Fragment mit der Variante G und blaue ein Fragment mit der

Variante C an. Damit ergeben sich folgende Genotypen: Probe 1: nicht-exp. C/exp. C; Probe 2: nicht-exp. G/exp. C; Probe 3: nicht-exp. G/exp. G; Probe 4: nicht-exp. G/G (Kontrolle). Die exemplarischen Ergebnisse für das Kontrollgel und die Fragmentlängenanalyse sind unabhängig voneinander gewählt. Proben aus Grafik A können somit nicht den Proben mit derselben Nummer in Grafik B (bzw. umgekehrt) zugeordnet werden.

Die Methode der Fragmentlängenanalyse erlaubte bei Mutationsträgern die SNP-Varianten jeweils dem nicht-expandierten und expandierten Allel zuzuordnen. Dadurch konnte in den statistischen Analysen nicht nur die Genotypen der Kontrollen und der Mutationsträger unterschieden werden, sondern es konnte zwischen drei Allel-Gruppen, nämlich den Allelen der Kontrollen, den nicht-expandierten Allelen der Mutationsträger und den expandierten Allelen der Mutationsträger differenziert werden. Für die statistische Analyse lagen die Haplotypen von 566 Allelen vor, wovon 142 Allele von gesunden Kontrollen kamen. 210 waren nicht-expandierte Allele und 214 expandierte Allele von Mutationsträger. Die Differenz zwischen den nicht-expandierten und expandierten Allelen der Mutationsträger erklärt sich durch zwei homozygote Mutationsträger in der Kohorte (aus dem ESMI-Zentrum Tübingen und von den Azoren). In der Gesamtkohorte zeigten 58,3 % der Allele die Variante G und entsprechend 41,7 % C. Die Genotypen waren dabei nach Hardy-Weinberg verteilt ($G/G = 32,9\%$, $G/C = 50,9\%$, $C/C = 16,2\%$; Chi-Quadrat-Test, $p = 0,8540$). Bei den Allelen der Kontrollen betrug die Allelfrequenz für G 80,3 % und für C 19,7 %. Eine ähnliche Verteilung wiesen die nicht-expandierten Allele der Mutationsträger mit 72,4 % G und 27,6 % C auf. Gegenläufig dazu war das Muster für die expandierten Allele. Hier lag bei 70,1 % der Allele die Variante C und nur bei 29,9 % G vor (Abb. 16).

SNP Bp 987

Gesamte ESMI-Kohorte

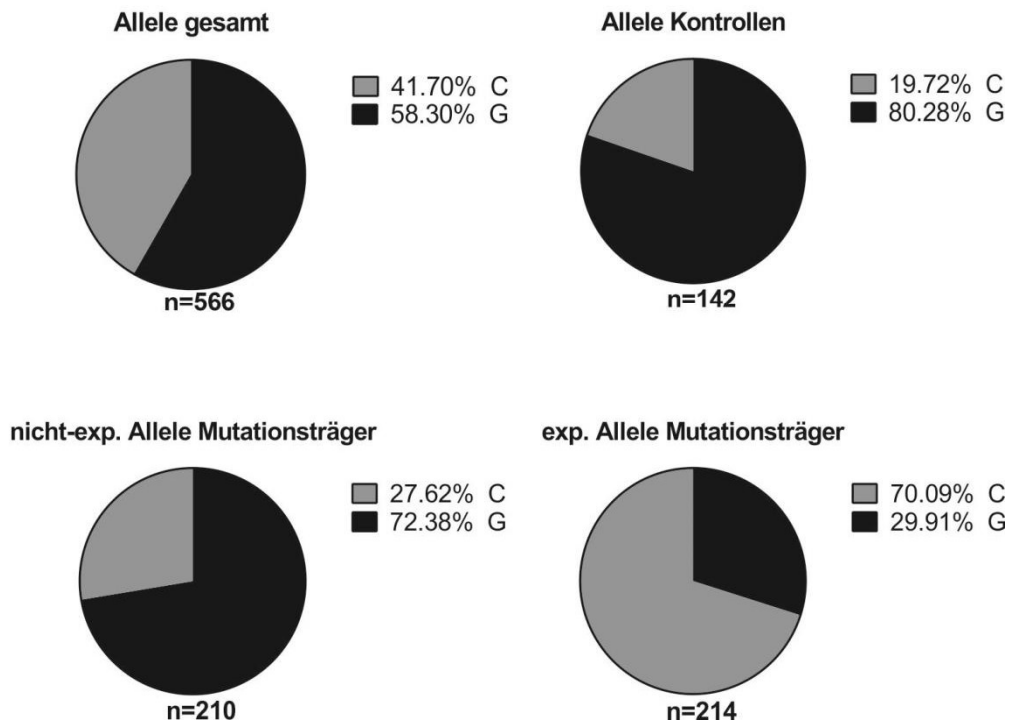


Abbildung 16: Haplotypen-Verteilung des ATXN3-SNP Bp 987 in der ESMI-Kohorte. Darstellung der Verteilung der Haplotypen des SNP Bp 987 für die gesamte ESMI-Kohorte, sowie die Allele aller Kontrollen und die nicht-expandierten und expandierten Allele der Mutationsträger. *n* gibt die Anzahl der Allele an. Im Exakten Fisher-Test bestand eine Abhängigkeit zwischen den Allelen der Kontrollen und den expandierten Allelen der Mutationsträger und den Haplotypen, genauso zwischen den nicht-expandierten und expandierten Allelen und den Haplotypen (p jeweils $< 0,0001$). Keine Kontingenz konnte dagegen zwischen den Allelen der Kontrollen und den nicht-expandierten Allelen der Mutationsträger und den Haplotypen nachgewiesen werden ($p = 0,1010$).

Zur Untersuchung von Abhängigkeiten zwischen den unterschiedlichen Allel-Gruppen und den jeweiligen Verteilungen der SNP-Varianten wurde für den SNP Bp 987 der Exakte Fisher-Test verwendet. Es wurde hierfür also nicht wie beim SNP Bp 669 der Chi-Quadrat-Test angewandt. Dies liegt in der Tatsache begründet, dass beim SNP Bp 987, wie bereits beschrieben, für die Mutationsträger eine Zuordnung der SNP-Variante zum Allel möglich war. Dadurch konnte die Unterteilung in Allel-Gruppen mit nur zwei möglichen Haplotypen, erfolgen. Da der Exakte Fisher-Test lediglich die Untersuchung der Kontingenz von zwei mal zwei Merkmalen erlaubt, war eine Anwendung für den SNP Bp 987 möglich. Dies war für den SNP Bp 669 nicht der Fall, da bei diesem durch die Angabe der SNP-

Varianten als biallelische Genotypen zwei mal drei Merkmale für vergleichbare Kontingenz-Testungen entstanden.

Für den SNP Bp 987 wurde also die Kontingenz zwischen jeweils zwei Allel-Gruppen und den jeweiligen Verteilungen der Haplotypen mittels Exaktem Fisher-Test geprüft. Zwischen den Allelen der Kontrollen und den nicht-expandierten Allelen der Mutationsträger, sowie den beiden Haplotypen bestand keine signifikante Abhängigkeit ($p = 0,1010$). Dagegen bestand sowohl zwischen den Allelen der Kontrollen, den expandierten Allelen der Mutationsträger und der Haplotypen-Verteilung, als auch zwischen den nicht-expandierten Allelen und den expandierten Allelen der Mutationsträger sowie den Haplotypen eine höchst signifikante Kontingenz (p jeweils $< 0,0001$).

Es folgte eine differenzierte Betrachtung der Verteilung für die unterschiedlichen Länder. Hier zeigte sich für alle vier Länder, wie schon für die Gesamt-Kohorte, ein Dominieren der Variante G bei den Allelen der Kontrollen ($f_G = 0,69 - 1,0$) und den nicht-expandierten Allelen der Mutationsträger ($f_G = 0,65 - 0,79$) und umgekehrt ein Dominieren der Variante C bei den expandierten Allelen der Mutationsträger ($f_C = 0,55 - 0,98$), (Abb. 17). Letzteres war besonders in Deutschland (97,6 % C) und in den Niederlanden (96,2 % C) ausgeprägt, wohingegen die Verteilung in Großbritannien (68,2 % C) und insbesondere in Portugal (55,1 % C) erheblich ausgeglichener war. Für alle Länder ergaben die Exakten Fisher-Tests zwischen den Allelen der Kontrollen, den expandierten Allelen der Mutationsträger und den jeweiligen Verteilungen der Haplotypen, sowie zwischen den Allelen der Kontrollen, den nicht-expandierten Allelen der Mutationsträger und den Haplotypen jeweils eine höchst signifikante Kontingenz (p jeweils $< 0,0001$). Zwischen den Allelen der Kontrollen, den nicht-expandierten Allelen der Mutationsträger und der Haplotypen-Verteilung war für Deutschland, die Niederlande und Großbritannien keine Abhängigkeit nachweisbar (Exakter Fisher-Test p jeweils $\geq 0,37$). Für die Studienteilnehmer aus Portugal dagegen konnte eine Kontingenz zwischen den Allelen der Kontrollen und den nicht-expandierten Allelen der Mutationsträgern, sowie den Haplotypen beobachtet werden (Exakter Fisher-Test $p = 0,0011$). Aufgrund dieser Abweichung von den Ergebnissen für die Gesamtkohorte und für die anderen Länder-Kohorten, erfolgte eine genauere

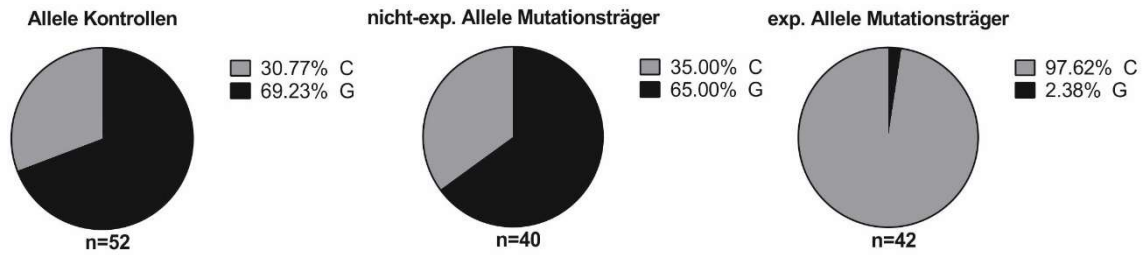
Untersuchung der portugiesischen Kohorte. Diese bestand, wie bereits beschrieben, aus den rekrutierten Studienteilnehmern der ESMI-Zentren Coimbra und Azoren, wobei gesunde Kontrollen ausschließlich in Coimbra rekrutiert wurden. Somit wurde zunächst die Kontingenz zwischen den Allelen der Kontrollen, den nicht-expandierten Allelen der Mutationsträger und den Haplotypen für Coimbra geprüft. Hier zeigte sich eine Abhängigkeit höchster Signifikanz (Exakter Fisher-Test $p = 0,0007$). Keine Abhängigkeit ergab sich im Exakten Fisher-Test jeweils für die nicht-expandierten und expandierten Allele der Mutationsträger zwischen den Zentren Coimbra und Azoren und der Haplotypen-Verteilung (p jeweils $\geq 0,51$; Daten nicht gezeigt).

Nach der genaueren Überprüfung der portugiesischen Kohorte wurde schließlich für die drei Allel-Gruppen die Abhängigkeit zwischen den Länderkohorten und jeweils der Haplotyp-Verteilung untersucht. Da sich dabei durch die vier Länder eine Kontingenz-Prüfung von zwei mal vier Merkmalen ergab, wurde wiederum auf den Chi-Quadrat-Test zurückgegriffen. Für die Allele der Kontrollen und die expandierten Allele der Mutationsträger lag jeweils eine Abhängigkeit zwischen den Länder-Kohorten und den Haplotypen vor (p jeweils $\leq 0,0123$), während sich für die nicht-expandierten Allele der Mutationsträger keine signifikante Kontingenz zwischen Ländern und Haplotyp-Verteilungen ergab ($p = 0,1060$).

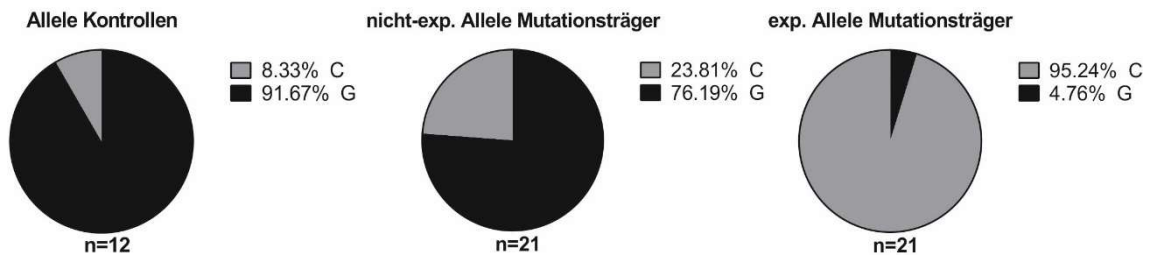
Ergebnisse

SNP Bp 987

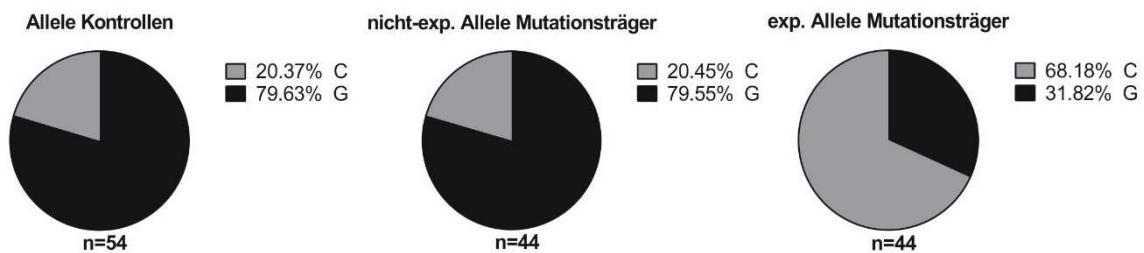
Deutschland



Niederlande



Großbritannien



Portugal

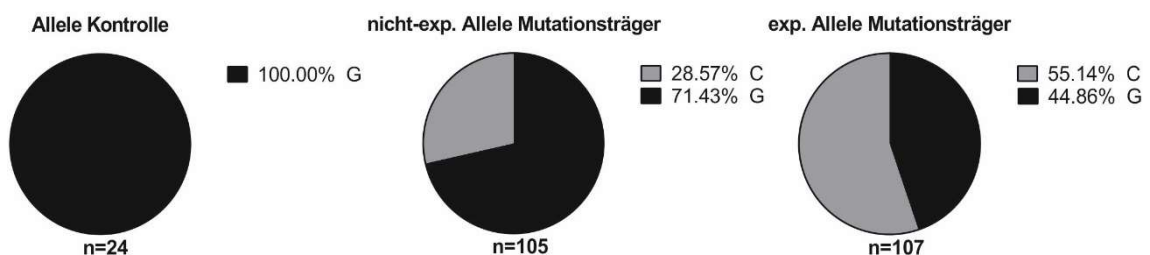


Abbildung 17: Verteilungen der Haplotypen des ATXN3-SNPs Bp 987 nach Ländern aufgeteilt. Die Kreisdiagramme zeigen die Verteilung der Haplotypen des SNP Bp 987 in den unterschiedlichen Ländern der ESMI-Kohorte. Es erfolgte die Aufteilung in Allele der Kontrollen, den nicht-expandierten und den expandierten Allelen der Mutationsträger. n gibt die Anzahl der Allele an. Im Exakten Fisher-Test ergab sich für alle Länder eine Kontingenz zwischen den Allelen der Kontrollen, den expandierten Allelen der Mutationsträger und der jeweiligen Haplotypen-Verteilung (p jeweils $< 0,0001$), ebenso zwischen den nicht-expandierten Allelen und den expandierten Allelen der Mutationsträger und den Haplotypen (p jeweils $< 0,0001$). Für Deutschland, die Niederlande und Großbritannien bestand zwischen den Allelen der Kontrollen und den nicht-expandierten Allelen der Mutationsträger keine Abhängigkeit (p jeweils $\geq 0,37$), wohingegen für Portugal eine solche Abhängigkeit zu beobachten war ($p = 0,0001$). Es zeigte sich eine Kontingenz zwischen den Ländern und den jeweiligen Haplotypen-Verteilungen für die Allele der Kontrollen und die expandierten Allele der Mutationsträger (Chi-Quadrat-Test, p jeweils $\leq 0,0123$). Für die nicht-

expandierten Allele der Mutationsträger war keine Abhängigkeit nachweisbar (Chi-Quadrat-Test, $p = 0,1060$).

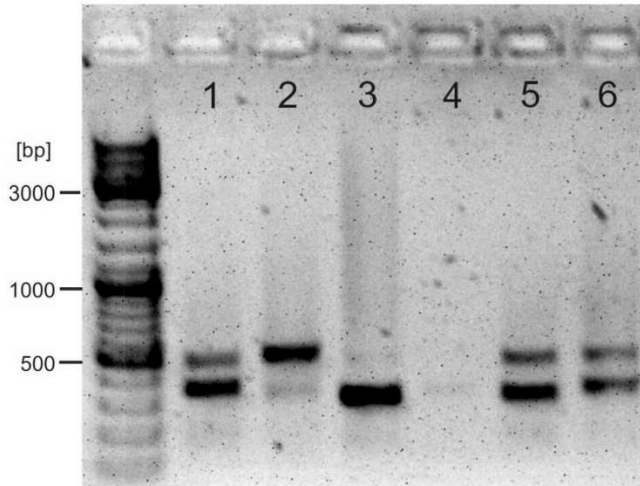
3.2.3. ATXN3-SNP Bp 1118

Der SNP Bp 1118 (rs7158733) ist auf dem Exon 10 des *ATXN3*-Gens in 3'-Richtung zur CAG-Wiederholungssequenz lokalisiert. Damit hängt auch für diesen SNP die genaue Bp-Position von der Anzahl der CAG-Wiederholungen ab. Für nachfolgende Angaben dienen 13 Triplet-Wiederholungen als Referenz. Weltweit tritt in 73 % der Allele die Variante TAC¹¹¹⁸ auf, welche für Tyrosin an AS-Position 361 im *ATXN3*-Protein codiert. Die übrigen 27 % der Allele zeigen die Variante TAA¹¹¹⁸. Dieses Triplet stellt ein Stopcodon dar und führt somit zur Synthese einer verkürzten *ATXN3*-Isoform (NCBI/SNP).

Die Genotypen dieses SNPs lagen für 228 Studienteilnehmer der ESMI-Kohorte bereits vor, für 61 wurden sie im Rahmen dieser Arbeit molekulargenetisch bestimmt. Dies erfolgte, analog zum SNP Bp 987, durch Fragmentlängenanalysen mittels fluoreszenzmarkierter Rückwärts-*Primer*. Hierbei ergab sich die Schwierigkeit, dass für einige Proben die DNA-Abschnitte, die eine expandierte CAG-Wiederholungssequenz enthielten, in der PCR nur unzureichend amplifiziert wurden. Da dieses Problem nicht in allen Fällen durch Änderung der PCR-Bedingungen behoben werden konnte, wurde als zusätzliche Methode die Sanger-Sequenzierung verwendet. Bei der Sanger-Sequenzierung wurden PCR-Produkte des zu sequenzierenden DNA-Abschnittes zunächst nach Allelen aufgetrennt, sodass die PCR-Produkte des nicht-expandierten und des expandierten Allels getrennt vorlagen. Diese wurden anschließend jeweils in einen Reaktionsansatz gegeben, der neben *Primern*, DNA-Polymerase und dNTPs auch fluoreszenzmarkierte ddNTPs enthielt. Es kam zur Synthese von Kettenabbruch-Produkten unterschiedlicher Länge, deren Fluoreszenzsignale nach Längen-Auftrennung im Analysegerät detektiert werden konnten. In den Abbildungen 18 und 19 sind beispielhaft Ergebnisse für das Kontrolllegel, die Fragmentlängenanalyse und die Sanger-Sequenzierung dargestellt.

A

Ergebnisse Kontrollgel SNP Bp 1118



B

Ergebnisse Fragmentlängenanalyse SNP Bp 1118

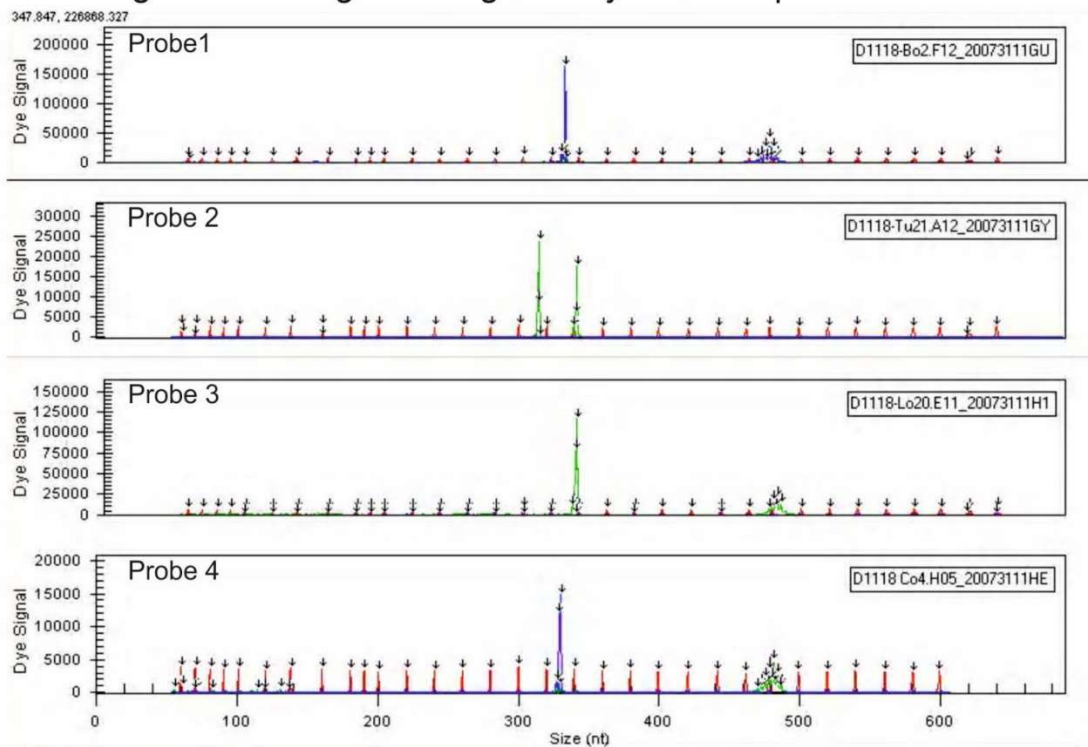


Abbildung 18: Exemplarische Ergebnisse von Kontrollgel und Fragmentlängenanalyse für den SNP Bp 1118. A: Beispielhafte Ergebnisse eines Kontrollgels. Die Banden ganz links entsprechen dem Längenstandard. Für die Proben 1,2,5 und 6 sind jeweils eine kleinere und eine größere Bande zu sehen, welche den PCR-Produkten mit der nicht-expandierten bzw. expandierten CAG-Wiederholungssequenz entsprechen. Probe 3 zeigt nur eine Bande. Hier wurde lediglich das nicht-expandierte Allel in der PCR ausreichend amplifiziert. Hingegen ist für Probe 4 gar kein PCR-Produkt vorhanden. B: Exemplarische Ergebnisse der Fragmentlängenanalyse. In den Diagrammen ist das Fluoreszenzsignal (Ordinate, Dye Signal) gegen die Fragmentgröße in Anzahl der Nukleotide (Abszisse, Size (nt)) aufgetragen. Die roten Signale entsprechen einem Längenstandard zur Größenbestimmung der Fragmente. Grüne Fluoreszenz-Peaks zeigen ein Fragment mit dem Haplotyp C und blaue ein Fragment mit dem Haplotyp G an. Damit können

Ergebnisse

folgende Genotypen bestimmt werden: Probe 1: nicht-exp. A/exp. A; Probe 2: nicht-exp. C/C (Kontrolle); Probe 3: nicht-exp. C/exp. C; Probe 4: nicht-exp. A/exp. C. Die exemplarischen Ergebnisse für das Kontrollgel und die Fragmentlängenanalyse sind unabhängig voneinander gewählt. Proben aus Grafik A können somit nicht den Proben mit derselben Nummer in Grafik B (bzw. umgekehrt) zugeordnet werden.

Ergebnis Sanger-Sequenzierung SNP Bp 1118

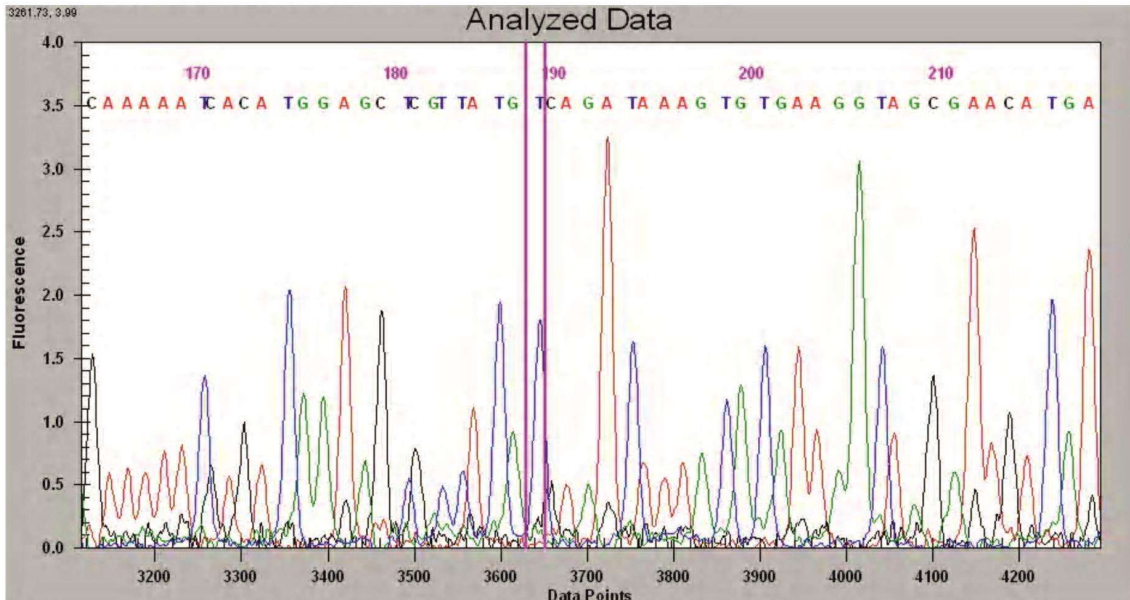


Abbildung 19: Exemplarische Ergebnisse einer Sanger-Sequenzierung für den SNP Bp 1118. Es sind die unterschiedlichen Fluoreszenzsignale der Kettenabbruch-Produkte für ein expandiertes Allel dargestellt. Diese präsentieren sich als blaue, rote, grüne und schwarze Peaks. Darüber ist jeweils die Base, die diesem Peak entspricht, angegeben (blau = T, rot = A, grün = G, schwarz = C). Da für die Sequenzierung ein Rückwärtsprimer verwendet wurde, entsprechen die angegebenen Basen den komplementären Basen des ATXN3-Gen-Abschnitts. Die lilafarbene Markierung zeigt die komplementäre Base des SNP Bp 1118 an (T). Im gezeigten Beispiel ist also der Haplotyp des expandierten Allels A.

Aufgrund der verwendeten Methodik konnte auch für die Varianten des SNP Bp 1118 zwischen den drei Allel-Gruppen (Allele der Kontrollen, nicht-expandierte und expandierte Allele der Mutationsträger) unterschieden werden. Für die Analysen wurden die Haplotypen von insgesamt 578 Allele einbezogen. Davon waren 152 Allele von gesunden Kontrollen, 211 waren nicht-expandierte und 215 expandierte Allele der Mutationsträger (einschließlich zweier homozygoter Mutationsträger). Für die gesamte ESMI-Kohorte zeigte sich eine Allelfrequenz von 0,57 für die Variante C und dementsprechend 0,43 für A. Die Genotypen-Verteilung (C/C = 32,5 %, C/A = 49,1 %, A/A = 18,3 %) entsprach dabei dem berechneten Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (Chi-Quadrat-Test, $p = 0,9927$). Bei

den Allelen der Kontrollen zeigten 80 % ein C an Bp 1118 und nur 20 % ein A. Auch bei den nicht-expandierten Allelen der Mutationsträger ergab sich ein deutliches Dominieren der Variante C mit 70 % gegenüber der Variante A mit 30 %. Für die expandierten Allele der Mutationsträger hingegen war eine nahezu umgekehrte Allelfrequenz mit 0,71 für A und 0,29 für C zu beobachten (Abb. 20). Mittels Exakter Fisher-Test wurden Abhängigkeiten zwischen den unterschiedlichen Allel-Gruppen und den jeweiligen Haplotyp-Verteilungen untersucht. Eine solche Abhängigkeit ergab sich zwischen den Allelen der Kontrollen und den nicht-expandierten Allelen der Mutationsträger ($p = 0,0287$), zwischen den Allelen der Kontrollen und den expandierten Allelen der Mutationsträger und zwischen den nicht-expandierten und expandierten Allelen der Mutationsträger (p jeweils $< 0,0001$).

SNP Bp 1118

Gesamte ESMI-Kohorte

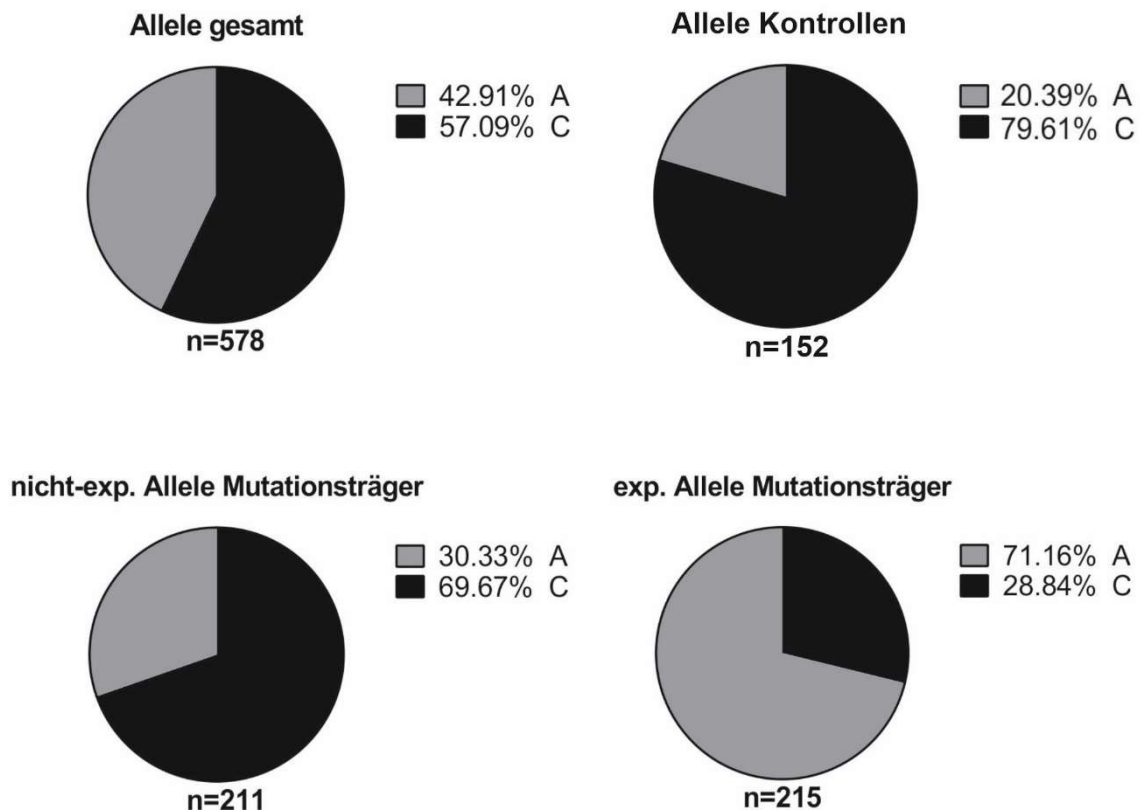


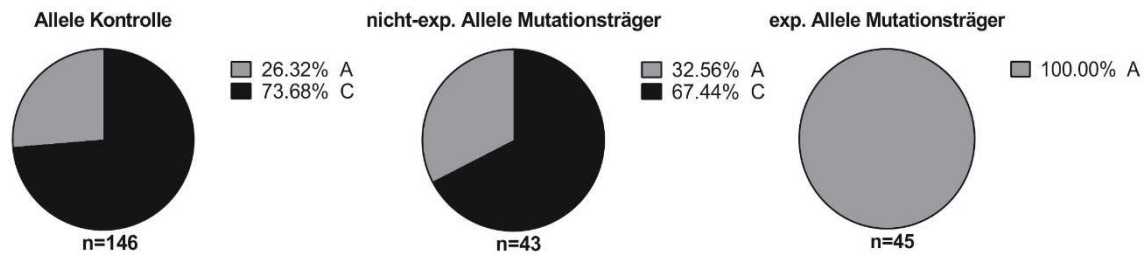
Abbildung 20: Haplotypen-Verteilung des ATXN3-SNP Bp 1118 in der ESMI-Kohorte. Die Verteilung der Varianten des SNP Bp 1118 für die gesamte ESMI-Kohorte, sowie aufgeteilt nach Allelen der Kontrollen, nicht-expandierten und expandierten Allelen der Mutationsträger. n steht für die Anzahl der Allele. Abhängigkeiten im Exakten Fisher-Test ergaben sich zwischen den

Ergebnisse

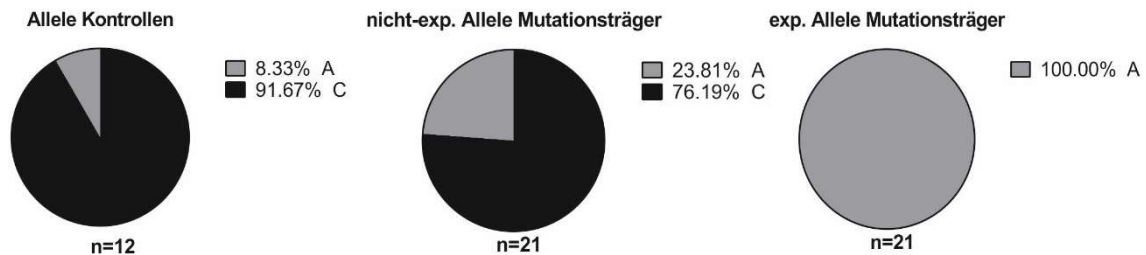
Allelen der Kontrollen, den nicht-expandierten Allelen der Mutationsträger und den jeweiligen Haplotyp-Verteilungen ($p = 0,0287$), zwischen den Allelen der Kontrollen, den expandierten Allelen der Mutationsträger und den Haplotypen und zwischen der nicht-expandierten und expandierten Allelen der Mutationsträger und den entsprechenden Verteilungen der Haplotypen (p jeweils $< 0,0001$).

SNP Bp 1118

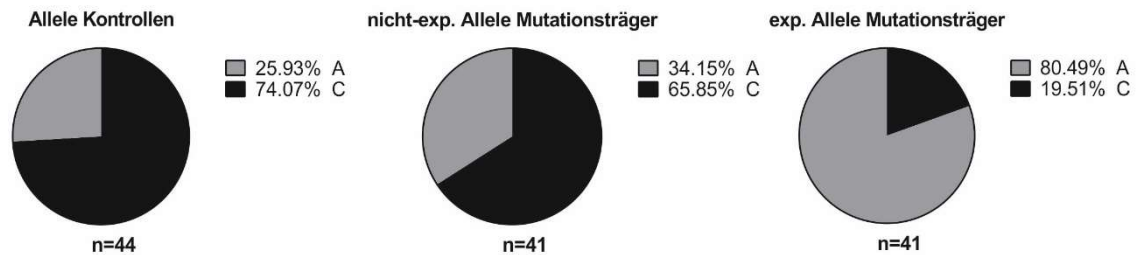
Deutschland



Niederlande



Großbritannien



Portugal

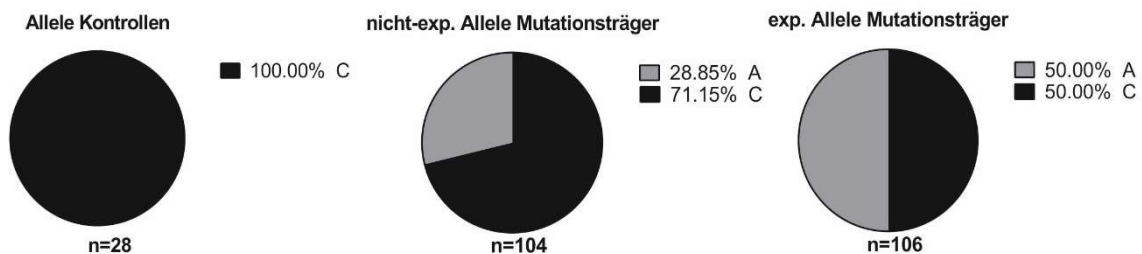


Abbildung 21: Verteilungen der Haplotypen des ATXN3-SNP Bp 1118 nach Ländern aufgeteilt. Verteilung der Haplotypen aufgeteilt nach Ländern. Dabei erfolgte eine Unterteilung in Allele der Kontrollen, nicht-expandierte und expandierte Allele der Mutationsträger. n steht für die Anzahl der Allele. Im Exakten Fisher-Test zeigte sich für alle vier Länder eine Kontingenz sowohl zwischen den Allelen der Kontrollen, den expandierten Allelen der Mutationsträger und den Haplotypen, als auch zwischen den nicht-expandierten und expandierten Allelen der Mutationsträger (p jeweils $\leq 0,0020$). Für Deutschland, die Niederlande und Großbritannien ergab sich

zwischen den Kontrollen, den nicht-expandierten Allelen der Mutationsträger und den jeweiligen Haplotyp-Verteilungen keine Abhängigkeit (Exakter Fisher-Test, p jeweils $\geq 0,3792$). Dagegen konnte für die portugiesische Kohorte eine Kontingenz zwischen diesen beiden Allel-Gruppen und den Haplotypen beobachtet werden (Exakter Fisher-Test, $p = 0,0003$). Eine Abhängigkeit bestand auch für alle Allel-Gruppen zwischen den Länder-Kohorten und der Verteilung der Haplotypen (Chi-Quadrat-Test, p jeweils $\leq 0,0136$).

In den einzelnen Ländern ergab sich ein größtenteils mit dem Verteilungsmuster der Gesamt-Kohorte vergleichbares Bild. So dominierte bei den Allelen der Kontrollen und bei den nicht-expandierten Allelen der Mutationsträger der Haplotyp C (73,7 % - 100 % bzw. 65,9 % - 76,2 %). Bei den expandierten Allelen der Mutationsträger lag stattdessen die Variante A in Deutschland, den Niederlanden und Großbritannien deutlich häufiger vor (80,5 % - 100 %). In der portugiesischen Kohorte dagegen ergab sich für die expandierten Allele der Mutationsträger mit jeweils 50 % A und C eine paritätische Verteilung der Haplotypen. Nichtsdestotrotz war der Anteil der Variante A damit erheblich größer als bei den Kontrollen (0 %) und den nicht-expandierten Allelen der Mutationsträger (29,3 %), (Abb. 21). Die Beobachtung wurde durch die Ergebnisse der statistischen Analysen gestützt. Diese zeigten für Portugal eine signifikante Kontingenz sowohl zwischen den Allelen der Kontrollen, den expandierten Allelen der Mutationsträger und den jeweiligen Verteilungen der Haplotypen, als auch zwischen den nicht-expandierten und expandierten Allelen der Mutationsträger und den Haplotypen (Exakter Fisher-Test, p jeweils $\leq 0,0020$). Für die anderen drei Länder ergab sich ebenfalls eine Abhängigkeit zwischen diesen Allel-Gruppen und den Haplotyp-Verteilungen (Exakter Fisher-Test, p jeweils $< 0,0001$). Zwischen den Allelen der Kontrollen, den nicht-expandierten Allelen der Mutationsträger und den Haplotypen zeigte sich dagegen für die Kohorten aus Deutschland, den Niederlanden und Großbritannien keine signifikante Kontingenz (Exakter Fisher-Test, p jeweils $\geq 0,3792$). Für Portugal ergab die Kontingenz-Analyse zwischen denselben Merkmalen wiederum eine höchst signifikante Abhängigkeit (Exakter Fisher-Test, $p = 0,0003$).

Wie schon beim SNP Bp 987 ließ sich hier also eine Abweichung der Ergebnisse der portugiesischen Kohorte von den Ergebnissen der anderen Länder-Kohorten beobachten. Aus diesem Grund erfolgte abermals eine eingehendere

Untersuchung der portugiesischen Kohorte. Eine isolierte Analyse der Teil-Kohorte Coimbra zeigt ebenfalls eine höchst signifikante Kontingenz zwischen den Allelen der Kontrollen, den nicht-expandierten Allelen der Mutationsträger und den jeweiligen Haplotyp-Verteilungen (Exakter Fisher-Test, $p = 0,0004$). Für die nicht-expandierten und expandierten Allele der Mutationsträger konnte keine Abhängigkeit zwischen den Haplotypen und den ESMI-Zentren Coimbra und Azoren beobachtet werden (Exakter Fisher-Test, p jeweils $\geq 0,6620$; Daten nicht gezeigt).

Abschließend wurde für alle drei Allel-Gruppen eine Kontingenz zwischen den vier Länder-Kohorten und den Verteilungen der Haplotypen untersucht. In allen drei Fällen ergab sich eine signifikante Abhängigkeit (Chi-Quadrat-Test, p jeweils $\leq 0,0136$).

3.2.4. Kombination der ATXN3-SNPs Bp 987 und Bp 1118

Neben den Einzelanalysen der ATXN3-SNPs wurde für die ESMI-Kohorte auch die kombinierte Verteilung der Haplotypen der SNPs Bp 987 und Bp 1118 untersucht. Eine kombinierte Betrachtung aller drei analysierten ATXN3-SNPs war nicht möglich, da die Varianten des SNP Bp 669 nur als Genotypen vorlagen und für diese keine allelspezifische Zuordnung vorgenommen werden konnte.

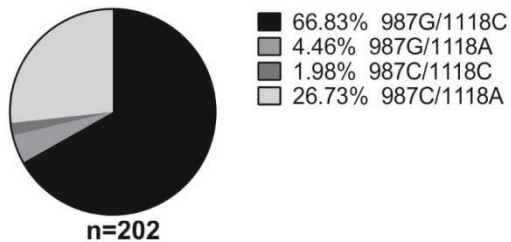
Für die SNPs Bp 987 und Bp 1118 lagen bei den Mutationsträger jeweils die Haplotypen der nicht-expandierten und expandierten Allele vor. Bei den gesunden Kontrollen war jedoch auch für diese beiden SNPs keine allelspezifische Zuordnung möglich. Demnach erfolgte nur für die Allele der Mutationsträger die kombinierte Betrachtung der SNPs Bp 987 und Bp 1118. In der ESMI-Kohorte waren für insgesamt 202 Mutationsträger die Haplotypen beider SNPs bestimmt. Pro Allel ergaben sich jeweils vier mögliche Haplotypen: G^{987}/C^{1118} , G^{987}/A^{1118} , C^{987}/C^{1118} und C^{987}/A^{1118} . Mit 66,8 % war G^{987}/C^{1118} die häufigste Kombination bei den nicht-expandierten Allelen, gefolgt von C^{987}/A^{1118} mit 26,7 %. G^{987}/A^{1118} und C^{987}/C^{1118} traten dagegen mit 4,5 % und 2,0 % nur relativ selten auf. Für die expandierten Allele ergab sich eine andere Verteilung. Hier dominierte C^{987}/A^{1118} (67,3 %) und nur 24,7 % der Allele zeigten die Kombination G^{987}/C^{1118} . G^{987}/A^{1118} und C^{987}/C^{1118} (jeweils 4,0 %) stellten auch bei den expandierten Allelen seltene

Kombinationen dar (Abb. 22). Im Chi-Quadrat-Test ließ sich eine höchst signifikante Abhängigkeit zwischen den beiden Allel-Gruppen und der Verteilung der Haplotyp-Kombinationen beobachten ($p < 0,0001$).

Kombination SNPs Bp 987 und Bp 1118

Gesamte ESMI-Kohorte

nicht-exp. Allele Mutationsträger



exp. Allele Mutationsträger

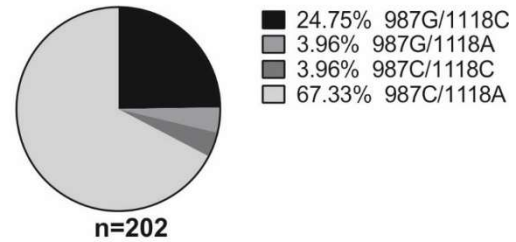


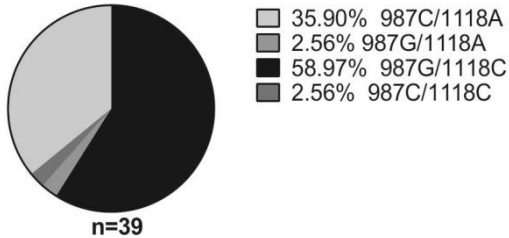
Abbildung 22: Verteilung der kombinierten Haplotypen der ATXN3-SNPs Bp 987 und Bp 1118 in der ESMI-Kohorte. Verteilung der Kombination der SNPs Bp 987 und 1118 aufgeteilt nach nicht-expandierte und expandierte Allele der Mutationsträger. *n* gibt die Anzahl der Allele an. Im Chi-Quadrat-Test bestand eine höchst signifikante Abhängigkeit zwischen den beiden Allel-Gruppen und den Haplotypen-Verteilungen ($p < 0,0001$).

Auch für die Kombination der beiden SNPs erfolgte eine differenzierte Betrachtung der Länder-Kohorten. Bei den nicht-expandierten Allelen ergab sich ein ähnliches Verteilungsmuster für die einzelnen Länder-Kohorten wie in der Gesamtkohorte. So war G^{987}/C^{1118} die häufigste Variante (59,0 % - 76,2 %), gefolgt von C^{987}/A^{1118} (19,5 % - 35,9 %). G^{987}/A^{1118} und C^{987}/C^{1118} traten in der deutschen, niederländischen und portugiesischen Kohorte nur selten bzw. gar nicht auf (jeweils 0 % - 2,6 %). Bei den Studienteilnehmern aus Großbritannien war dagegen bei 14,6 % die Variante G^{987}/A^{1118} zu beobachten. Für die Verteilung der Haplotypen bei den expandierten Allelen existierte eine deutliche Heterogenität zwischen den Länder-Kohorten. So zeigte sich für Portugal ein sehr ausgeglichenes Verhältnis zwischen den beiden dominierenden Kombinationen C^{987}/A^{1118} und G^{987}/C^{1118} (49,5 % und 41,6 %). In Großbritannien dagegen überwog die Variante von C^{987}/A^{1118} deutlich (65,9 %). Hier fiel zudem – wie schon bei den nicht-expandierten Allelen – ein vergleichsweise großer Anteil an G^{987}/A^{1118} auf (14,6 %). Für die Niederlande und Deutschland war eine absolute Dominanz von C^{987}/A^{1118} zu beobachten (95,5 % und 100 %), (Abb. 23).

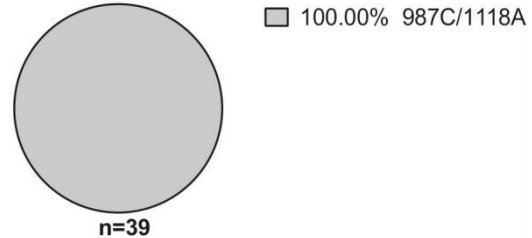
Kombination SNPs Bp 987 und Bp 1118

Deutschland

nicht-exp. Allele Mutationsträger

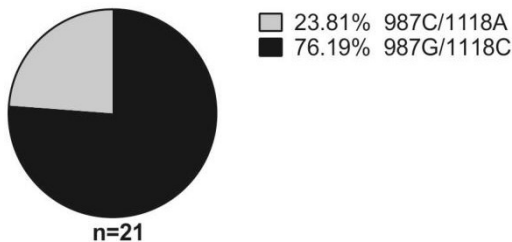


exp. Allele Mutationsträger

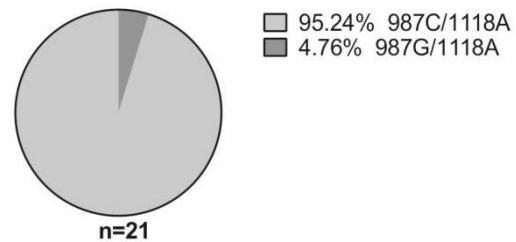


Niederlande

nicht-exp. Allele Mutationsträger

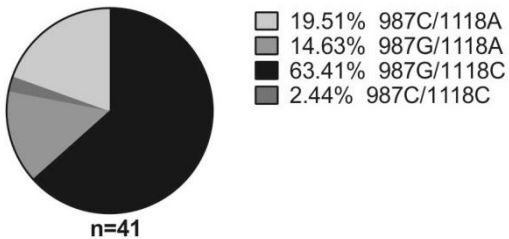


exp. Allele Mutationsträger

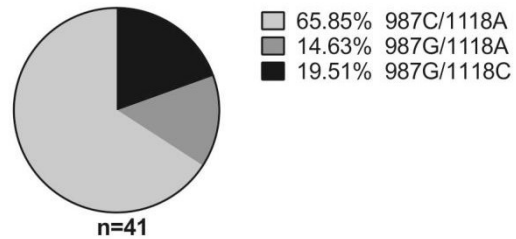


Großbritannien

nicht-exp. Allele Mutationsträger

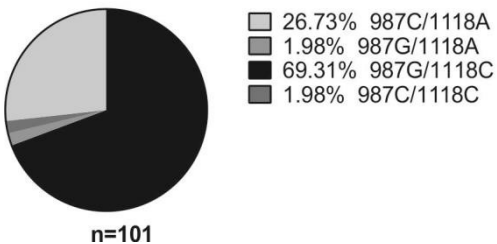


exp. Allele Mutationsträger



Portugal

nicht-exp. Allele Mutationsträger



exp. Allele Mutationsträger

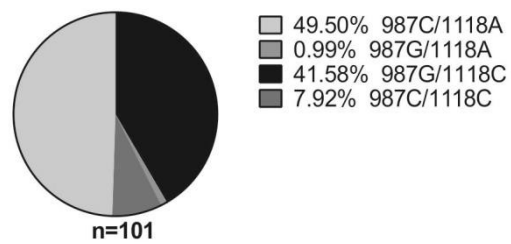


Abbildung 23: Verteilungen der kombinierten Haplotypen der ATXN3-SNPs Bp 987 und Bp 1118 nach Ländern aufgeteilt. Die Varianten der Kombination der SNPs Bp 987 und Bp 1118 für nicht-expandede und expandierte Allele der Mutationsträger. n steht für die Anzahl der Allele. Im Chi-Quadrat-Test ergab sich für alle vier Länder eine Abhängigkeit zwischen den nicht-expandeden und expandierten Allelen und den Haplotypen (p jeweils $< 0,0001$). Für die nicht-expandeden Allele ließ sich keine Kontingenz zwischen den Länder-Kohorten und den Verteilungen der Haplotyp-Kombinationen G^{987}/C^{1118} und C^{1118}/A^{1118} (in diese Analysen konnten die beiden seltenen Varianten aufgrund der geringen Häufigkeit nicht einbezogen werden) nachweisen (Chi-

Quadrat-Test, $p = 0,5242$), dagegen bestand eine höchst signifikante Abhängigkeit zwischen diesen Merkmalen bei den expandierten Allelen (Chi-Quadrat-Test, $p > 0,0001$).

Der Chi-Quadrat-Test ergab für alle vier Länder-Kohorten eine höchst signifikante Kontingenz zwischen den nicht-expandierten und expandierten Allelen und den Verteilungen der Haplotypen-Kombinationen (p jeweils $< 0,0001$). Weiterhin erfolgte eine Abhängigkeitsprüfung jeweils für die nicht-expandierten und die expandierten Allele zwischen den Länderkohorten und den jeweiligen Verteilungen der Haplotyp-Kombinationen. Aufgrund der geringen Häufigkeit der beiden seltenen Kombinationen konnten in diese Analysen lediglich die Varianten G^{987}/C^{1118} und C^{1118}/A^{1118} einbezogen werden. Während sich bei den nicht-expandierten Allelen keine Kontingenz zwischen den Ländern und den beiden Haplotyp-Kombinationen ergab (Chi-Quadrat-Test, $p = 0,5242$), war eine höchst signifikante Abhängigkeit zwischen diesen Merkmalen bei den expandierten Allelen zu beobachten (Chi-Quadrat-Test, $p < 0,0001$).

3.2.5. *PARK2*-SNP Bp 601

Wie in Kapitel 1.7. ausgeführt, interagiert das ATXN3-Protein mit dem Protein Parkin, welches durch das *PARK2*-Gen codiert wird. Mit Blick auf die Interaktion wurden drei – bereits in der Diplomarbeit von Dr. rer. nat. Jonasz J. Weber identifizierte - *PARK2*-SNPs analysiert (Bp 601, Bp 1239 und Bp 1281), um mögliche Assoziationen mit SCA3 zu untersuchen. Der SNP Bp 601 (rs1801474) liegt auf Exon 4 des *PARK2*-Gens. Die Varianten sind dabei $AG^{601}C$ und $AA^{601}C$ welche für Serin und Asparagin an AS-Position 167 codieren. Mit 97 % zeigt die große Mehrheit der menschlichen Allele dabei den Haplotypen G (NCBI/SNP).

Für die ESMI-Kohorte lagen die Genotypen des SNP Bp 601 für 277 Studienteilnehmer vor, für 22 weitere wurden sie mittels Restriktionsfragmentlängenanalyse (RFLA) in dieser Arbeit bestimmt. Bei dieser Methode wurde ein den SNP enthaltener Genabschnitt mittels PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden anschließend einem Restriktionsverdau zugeführt, wobei eine Restriktionsendonuklease in Abhängigkeit der vorliegenden SNP-Variante die Amplifikate schnitt. Die verdauten Fragmente wurden in einem 2,5-prozentigem Agarosegel aufgetrennt, sodass aufgrund der Anzahl der Banden und ihrer Längen ein

Rückschluss auf den Genotyp gezogen werden konnte. Tabelle 30 zeigt die zu erwartenden Fragmentlängen der unterschiedlichen Genotypen. In Abbildung 24 ist das Ergebnis einer RFLA exemplarisch dargestellt.

Tabelle 30: Genotypen des *PARK2*-SNPs Bp 601 und die erwarteten Fragmentlängen beim Restriktionsenzymverdau

Genotyp	Erwartete Fragmentlängen
A/A	696 bp
A/G	339 bp, 357 bp, 696 bp
G/G	339 bp, 357 bp

Ergebnisse RFLA SNP Bp 601

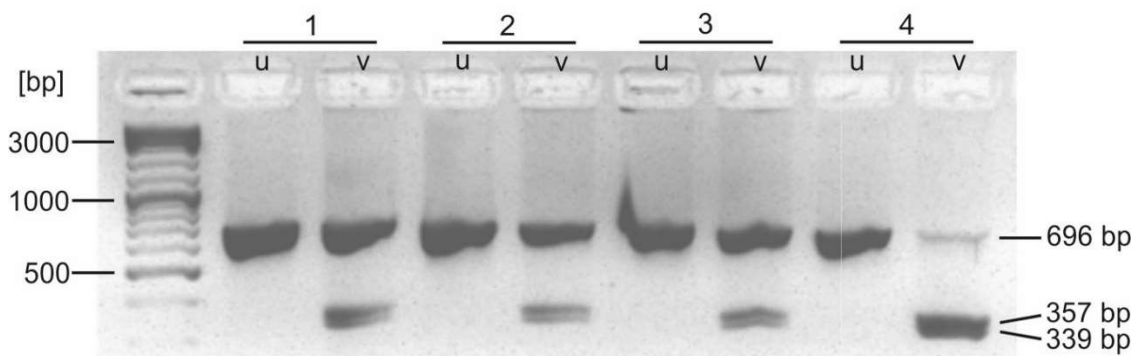


Abbildung 24: Exemplarische Ergebnisse einer Restriktionsfragmentlängenanalyse für den SNP Bp 601. Dargestellt ist das Ergebnis der RFLA für 4 Proben. Ganz links sind die Banden des Längenstandards zu sehen. Bei den Proben sind jeweils Banden für die unverdauten PCR-Produkte (u) und für die Produkte des enzymatischen Verdau (v) zu sehen. Die Länge der Fragmente der unverdauten PCR-Produkte beträgt 696 bp. Nach dem Verdau zeigen die Proben 1-3 jeweils drei Fragmente mit 339 bp, 357 bp und 696 bp Länge, was dem Genotypen G/A entspricht. Für Probe 4 hingegen zeigen sich nur zwei Banden mit 339 bp und 357 bp, was auf den Genotypen G/G rückschließen lässt.

Die Bestimmung der *PARK2*-SNPs erlaubte für die Mutationsträger keine Zuordnung der einzelnen Haplotypen zum nicht-expandierten und expandierten Allel des *ATXN3*-Gens, weswegen keine allelspezifische Aufteilung erfolgen konnte. Dementsprechend wurden die Genotypen nach Kontrollen und Mutationsträger aufgeteilt. In der gesamten ESMI-Kohorte zeigten 93,3 % der Studienteilnehmer den Genotyp G/G, 6,0 % A/G und 0,7 % A/A, was einer Verteilung nach Hardy-Weinberg gleichkommt (Chi-Quadrat-Test, $p = 0,6151$). Bei den Kontrollen trat G/G in 97,5 % und A/G in 2,5 % der Fälle auf. Für die Mutationsträger waren

91,8 % G/G, 7,3 % A/G und 0,91 % A/A zu beobachten (Abb. 25). Aufgrund der geringen Häufigkeit des Genotyps A/A ließ sich kein Chi-Quadrat-Test zur Kontingenz-Prüfung aller drei Genotypen durchführen. Darum wurden für die Untersuchung der Abhängigkeit nur die Genotypen G/G und A/G einbezogen. Zwischen den Kontrollen, den Mutationsträgern und den beiden Genotypen bestand keine signifikante Kontingenz (Exakter Fisher-Test, $p = 0,1702$).

SNP Bp 601

Gesamte ESMI-Kohorte

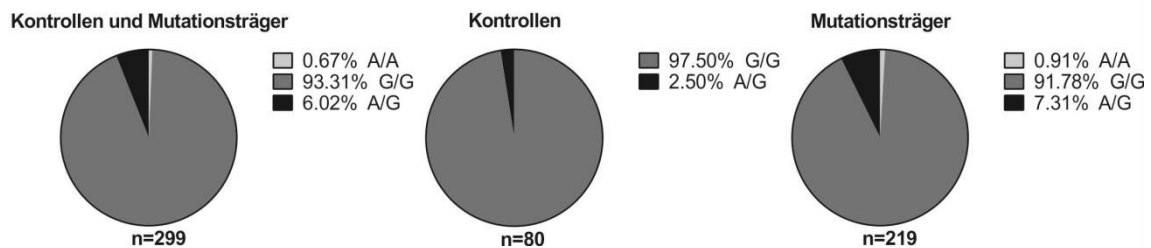
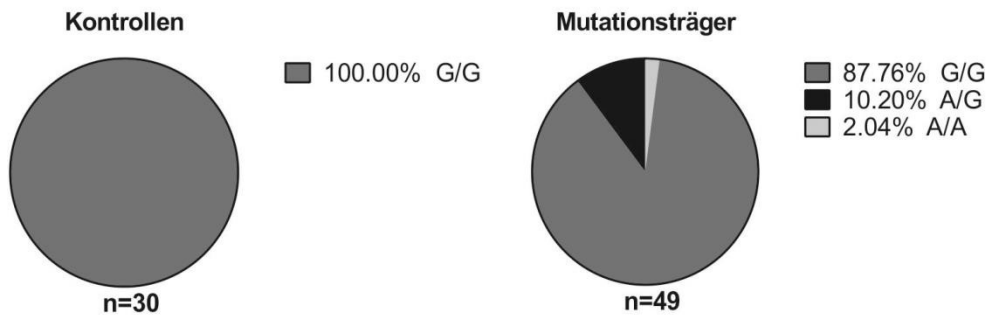


Abbildung 25: Verteilung der Genotypen des PARK2-SNP Bp 601 in der ESMI-Kohorte. Varianten des SNP Bp 601 in der gesamten ESMI-Kohorte und aufgeteilt nach Kontrollen und Mutationsträger. *n* gibt die Anzahl der Studienteilnehmer an. Aufgrund der geringen Häufigkeit der Variante A/A konnte kein Chi-Quadrat-Test zur Abhängigkeits-Prüfung durchgeführt werden. Deshalb wurden nur die Genotypen G/G und A/G in die statistische Analyse einbezogen. Es ergab sich keine Abhängigkeit zwischen den Kontrollen, den Mutationsträgern und den beiden Genotypen ($p = 0,1702$).

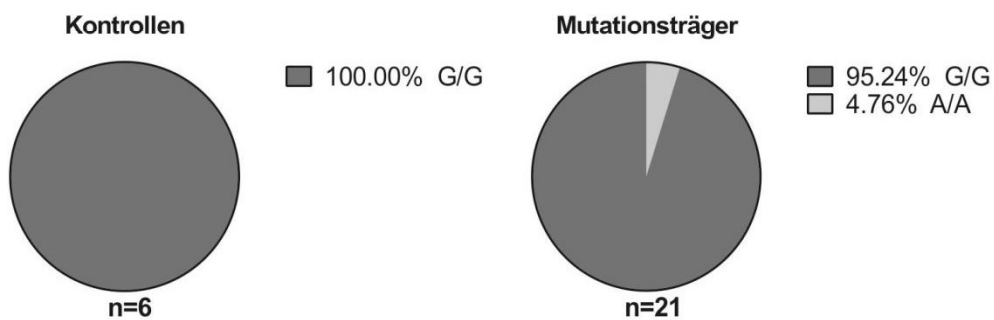
Ergebnisse

SNP Bp 601

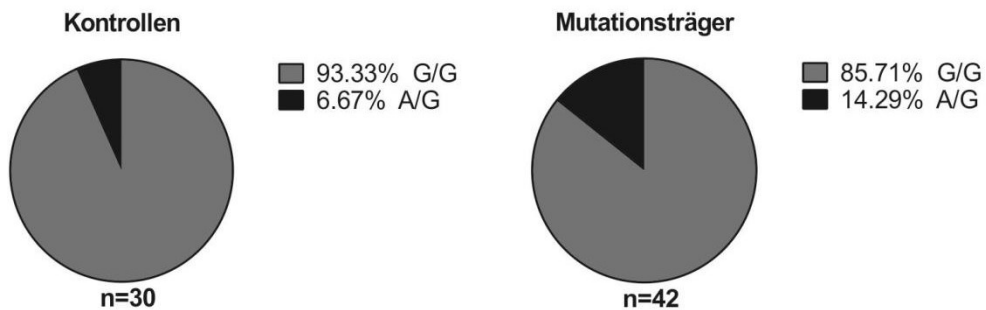
Deutschland



Niederlande



Großbritannien



Portugal

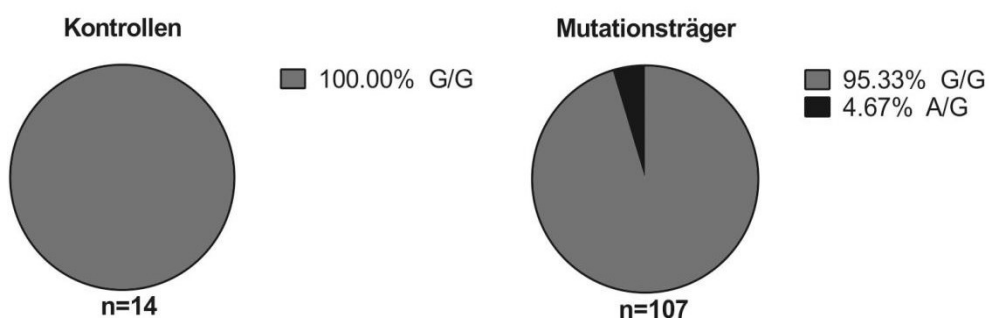


Abbildung 26: Genotypen-Verteilungen des PARK2-SNPs Bp 601 nach Ländern aufgeteilt. Die Verteilung der Varianten des SNPs Bp 601 in den unterschiedlichen Länderkohorten. *n* steht für die Anzahl der Studienteilnehmer. Bei den statistischen Untersuchungen wurde aufgrund der geringen Häufigkeit die Variante A/A nicht mit einbezogen. Für alle vier Länder ergab sich keine

signifikante Abhängigkeit zwischen den Kontrollen, den Mutationsträger und den Genotypen G/G und A/G (Exakter Fisher-Test, p jeweils $\geq 0,1502$). Bei den Mutationsträgern zeigte sich keine signifikante Kontingenz zwischen den Ländern und den Genotypen G/G und G/A ($p = 0,0969$). Für die Kontrollen war eine Kontingenz-Prüfung dieser Merkmale aufgrund des Verteilungsmusters nicht möglich.

Die spezifische Betrachtung der einzelnen Länder-Kohorten zeigte für Deutschland, die Niederlande und Portugal bei 100 % der Kontrollen die Variante G/G. In Großbritannien waren es 93,3 % G/G bei 6,7 % A/G. Bei den Mutationsträgern der britischen Kohorte trat der Genotyp G/G in 85,7 % und A/G in 14,3 % der Fälle auf. Auch in Deutschland und Portugal war ein Anstieg des A/G-Anteils in Mutationsträgern im Vergleich zu den Kontrollen zu beobachten (10,2 % und 4,7 %). In der niederländischen Kohorte dagegen zeigte keiner der Mutationsträger die Variante A/G, dafür aber 4,8 % den Genotyp A/A. Dieser trat ansonsten nur noch bei den Mutationsträgern der deutschen Kohorte auf (2,0 %), (Abb. 26).

Wie bereits in der Gesamt-Kohorte konnten auch bei den Länder-Kohorten Abhängigkeits-Untersuchungen nur für die häufigen Genotypen G/G und A/G durchgeführt werden. Für alle vier Länder ergaben sich zwischen den Kontrollen, den Mutationsträgern und den beiden Genotypen keine signifikanten Kontingenzen (Exakter Fisher-Test, p jeweils $\geq 0,1502$). Ein vergleichender Chi-Quadrat-Test für die Kontrollen zwischen den vier Ländern und den Genotypen, war aufgrund der gegebenen Verteilungsmuster nicht möglich. Bei den Mutationsträger zeigte sich keine signifikante Abhängigkeit zwischen den Länder-Kohorten und der Verteilung der beiden häufigen Genotypen (Chi-Quadrat-Test, $p = 0,0969$).

3.2.6. *PARK2*-SNP Bp 1239

Der SNP Bp 1239 (rs1891582) liegt auf dem Exon 10 des *PARK2*-Gens. Die möglichen Haplotypen sind dabei G¹²³⁹TA und C¹²³⁹TA, was auf Proteinebene zu den Varianten Val³⁸⁰ bzw. Leu³⁸⁰ führt. Mit 96 % zeigt die überwiegende Mehrheit der menschlichen Allele G an Bp 1239 des *PARK2*-Gens (NCBI/SNP). Für 266 Studienteilnehmer der ESMI-Kohorte lagen die Genotypen des SNPs Bp 1239 bereits vor, für weitere 32 wurden sie im Rahmen dieser Arbeit mittels RFLA bestimmt. Tabelle 31 gibt eine Übersicht über die Genotypen und die zu

erwartenden Fragmentlängen. In Abbildung 27 sind beispielhaft Ergebnisse der RFLA dargestellt.

Tabelle 31: Genotypen des PARK2-SNPs Bp 1239 und die zu erwartenden Fragmentlängen beim Restriktionsenzymverdau

Genotyp	Erwartete Fragmentlängen
C/C	161 bp, 206 bp, 281 bp
C/G	161 bp, 206 bp, 281 bp, 367 bp
G/G	281 bp, 367 bp

Ergebnisse RFLA SNP Bp 1239

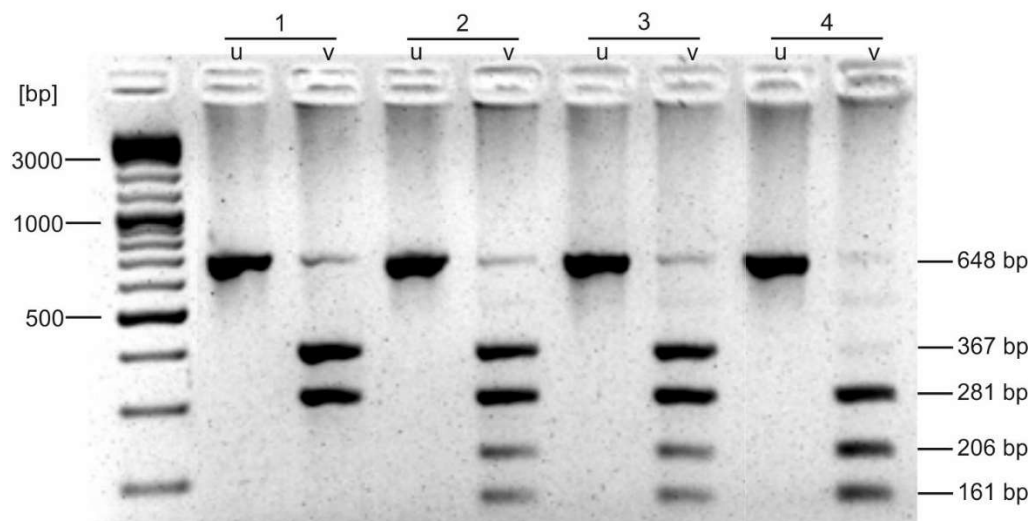


Abbildung 27: Exemplarische Ergebnisse einer Restriktionsfragmentlängenanalyse für den SNP Bp 1239. Exemplarisches RFLA-Ergebnis für 4 Proben. Für jede Probe sind jeweils Banden für die PCR-Produkte vor (u) und nach (v) dem Verdau dargestellt. Die Banden ganz links im Bild entsprechen dem Längenstandard. Die Fragmente der unverdauten PCR-Produkte besitzen eine Länge von 648 bp. Für Probe 1 sind nach dem Verdau zwei Banden mit den Längen 281 bp und 367 bp zu sehen, was durch einen Genotypen G/G verursacht wird. Die verdauten Proben 2 und 3 zeigen 4 Fragmente mit 161 bp, 206 bp, 281 bp und 367 bp Länge. Dies bedeutet den Genotyp G/C. Bei Probe 4 werden die PCR-Produkte im Verdau in 3 Fragmente gespalten (161 bp, 206 bp und 281 bp), was einem Genotypen C/C entspricht.

Entsprechend den Ausführungen zum PARK2-SNP Bp 601, war auch für den SNP Bp 1239 keine allelspezifische Aufteilung der Varianten möglich. In der gesamten ESMI-Kohorte trat der Genotyp G/G bei 74,2 %, C/G bei 22,1 % und C/C bei 3,7 % der Studienteilnehmer auf. Die Genotypen waren damit nach Hardy-Weinberg verteilt (Chi-Quadrat-Test, $p = 0,4326$). Sowohl für die Kontrollen als auch für die Mutationsträger ergab sich ein sehr ähnliches Verteilungsmuster. So

zeigten die Kontrollen zu 74,0 % G/G, zu 19,5 % C/G und zu 6,5 % C/C. Bei den Mutationsträger machte G/G 73,8 %, C/G 23,5 % und C/C 2,7 % der Genotypen aus (Abb. 28). Die statistische Analyse konnte zeigen, dass zwischen den Kontrollen und den Mutationsträger, sowie den jeweiligen Genotypen-Verteilungen keine signifikante Abhängigkeit bestand (Chi-Quadrat-Test, $p = 0,2691$).

SNP Bp 1239

Gesamte ESMI-Kohorte

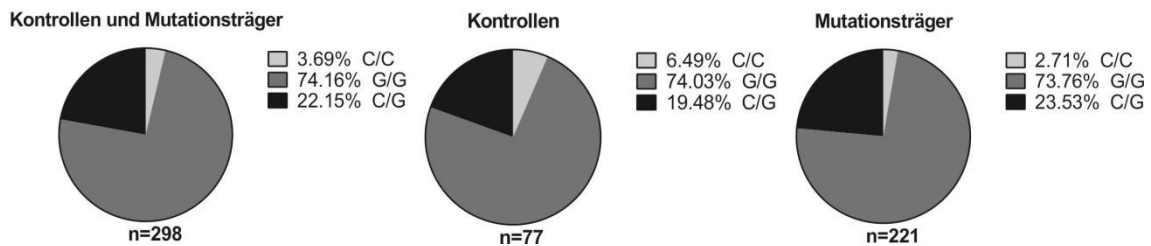
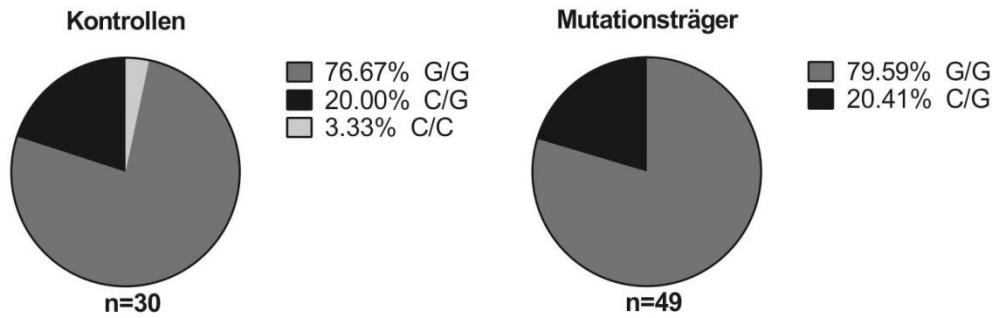


Abbildung 28: Genotypen-Verteilung des PARK2-SNPS Bp 1239 in der ESMI-Kohorte. Dargestellt ist die Verteilung der Genotypen des SNP Bp 1239 jeweils für die Kontrollen und die Mutationsträger, sowie für die beiden Gruppen zusammen. n steht für die Anzahl der Studienteilnehmer. Zwischen Kontrollen, Mutationsträger und der jeweiligen Genotypen-Verteilung ergab sich im Chi-Quadrat-Test keine signifikante Abhängigkeit ($p = 0,2691$).

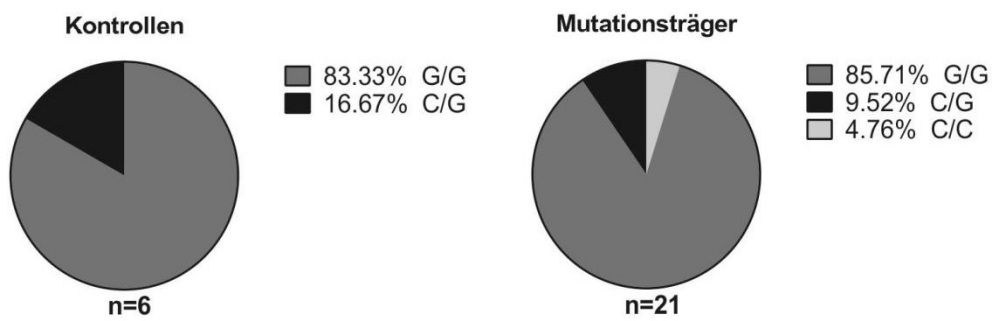
Für die einzelnen Länder ergab sich bei den Kontrollen jeweils am häufigsten G/G (69,2 % - 83,3 %), gefolgt von C/G (16,7 % - 23,1 %). C/C stellte in allen Länder-Kohorten die seltenste Variante bei den Kontrollen dar (0 % - 10,7 %). Die Mutationsträgern der deutschen, niederländischen und portugiesischen Kohorte zeigten mit 74,8 % bis 85,7 % G/G, 9,5 % bis 20,6 % C/G und 0 % bis 4,8 % C/C eine sehr ähnliche Verteilung, wie die Kontrollen. Anders verhielt es sich bei den Mutationsträgern aus Großbritannien. Hier wiesen 59,1 % der Studienteilnehmer den Genotyp G/G und 40,1 % C/G auf (Abb. 29).

SNP Bp 1239

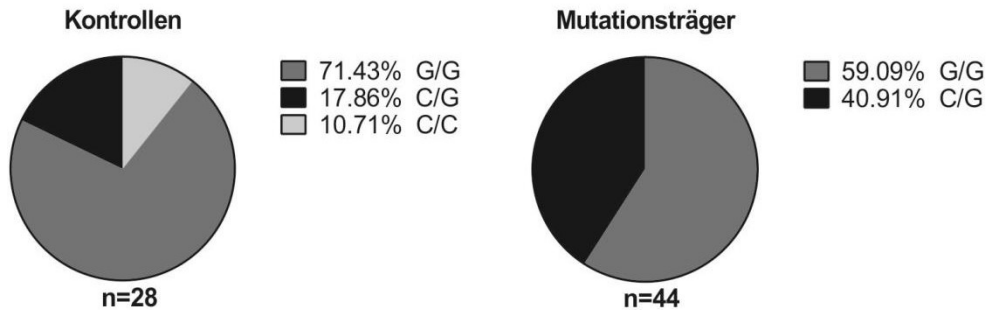
Deutschland



Niederlande



Großbritannien



Portugal

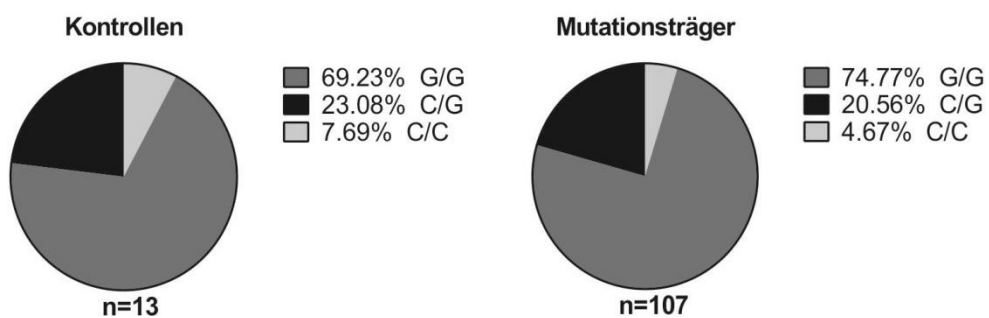


Abbildung 29: Genotypen-Verteilungen des PARK2-SNP Bp 1239 nach Ländern aufgeteilt. Verteilung der Genotyp-Varianten des SNP Bp 1239 in den unterschiedlichen Länderkohorten, jeweils für Kontrollen und Mutationsträger. n gibt die Anzahl der Studienteilnehmer an. Für Deutschland, die Niederlande und Portugal konnte aufgrund des seltenen Auftretens der Variante

C/C nur die Kontingenz zwischen Kontrollen, Mutationsträger und den beiden häufigeren Genotypen G/G und C/G geprüft werden. Hier ergab sich keine signifikante Abhängigkeit (Exakter Fisher-Test, p jeweils $\geq 0,7239$). Bei der britischen Kohorte war die Untersuchung einer Abhängigkeit zwischen den Kontrollen, den Mutationsträger und allen drei Genotyp-Varianten mittels Chi-Quadrat-Test möglich, wobei eine signifikante Kontingenz nachgewiesen werden konnte ($p = 0,0186$). Bei den Kontrollen bestand keine Abhängigkeit zwischen den Länder-Kohorten und den Genotypen G/G und G/C (Chi-Quadrat-Test, $p = 0,9775$). Hingegen war eine signifikante Kontingenz zwischen diesen Merkmalen für die Mutationsträger vorhanden (Chi-Quadrat-Test, $p = 0,0216$).

Aufgrund des seltenen Auftretens der Variante C/C konnte für Deutschland, die Niederlande und Portugal keine Abhängigkeits-Prüfungen für alle drei Varianten durchgeführt werden. Deshalb wurde für diese Länder lediglich die Kontingenz zwischen Kontrollen, Mutationsträger und den beiden häufigeren Genotypen G/G und C/G mittels Exaktem Fisher-Test untersucht. Für keine der drei Länderkohorten ergab sich eine signifikante Abhängigkeit (p jeweils $\geq 0,7239$). Die Verteilung der Genotypen in der britischen Kohorte erlaubte eine Kontingenz-Untersuchung zwischen Kontrollen, Mutationsträger und allen drei Genotyp-Varianten, wofür der Chi-Quadrat-Test angewandt wurde. Es konnte eine signifikante Abhängigkeit zwischen Kontrollen, Mutationsträger und den jeweiligen Genotyp-Verteilungen nachgewiesen werden ($p = 0,0186$). Zur Kontingenz-Prüfung jeweils für die Kontrollen und die Mutationsträger zwischen den Länderkohorten und den Genotypen konnten wiederum nur die Varianten G/G und G/C einbezogen werden. Bei den Kontrollen ergab sich keine Abhängigkeit zwischen den Länder-Kohorten und den Verteilungen der beiden Genotypen (Chi-Quadrat-Test, $p = 0,9775$). Dagegen zeigte sich bei den Mutationsträgern eine signifikante Kontingenz zwischen diesen Merkmalen (Chi-Quadrat-Test, $p = 0,0216$).

3.2.7. PARK2-SNP Bp 1281

Der SNP Bp 1281 (rs1801334) ist im *PARK2*-Gen auf dem Exon 11 lokalisiert. Als Haplotyp-Varianten existieren dabei G¹²⁸¹AT und A¹²⁸¹AT. Während erstere Variante zum Einbau von Asparagin an AS-Position 394 des Proteinprodukts Parkin führt, codiert der Haplotyp A für ein Stopcodon. In menschlichen Allelen tritt die Variante G zu 96 % auf (NCBI/SNP). Für 32 Studienteilnehmer konnte auf bereits bestimmte Genotypen des SNP Bp 1281 zurückgegriffen werden. Weitere 79 Genotypen wurden mittels RFLA analysiert. Die bei dem jeweiligen Genotyp

zu erwartenden Fragmentlängen sind in Tabelle 32 aufgelistet. In Abbildung 30 sind exemplarisch Ergebnisse der RFLA dargestellt.

Tabelle 32: Genotypen des PARK2-SNPs Bp 1281 und die zu erwartenden Fragmentlängen beim Restriktionsenzymverdau

Genotyp	Erwartete Fragmentlängen
A/A	441 bp
G/A	213 bp, 228 bp, 441 bp
G/G	213 bp, 228 bp

Ergebnisse RFLA SNP Bp 1281

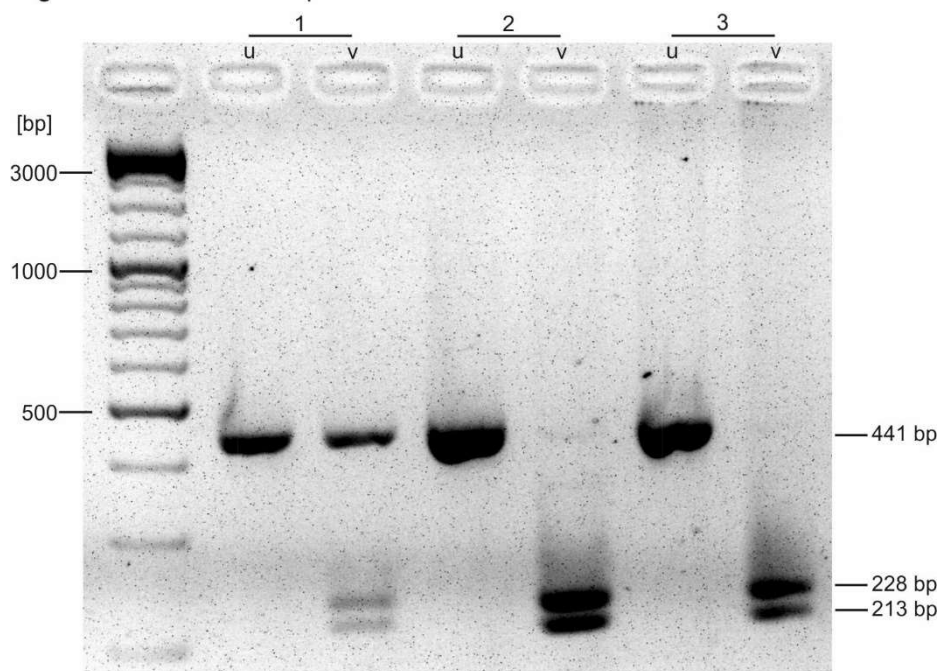


Abbildung 30: Exemplarische Ergebnisse einer Restriktionsfragmentlängenanalyse für den SNP Bp 1281. Exemplarische Darstellung der Ergebnisse einer RFLA für 3 Proben. Links sind die Banden des Längenstandards zu sehen. Die 3 Proben zeigen jeweils Banden für die unverdauten (u) und verdauten (v) PCR-Produkte. Die Länge der PCR-Produkte vor dem Verdau beträgt 441 bp. Für Probe 1 ergeben sich nach dem Enzym-Verdau 3 Fragmente mit den Längen 213 bp, 228 bp und 441 bp. Dies entspricht einem Genotypen G/A. Die Proben 2 und 3 zeigen verdaut jeweils 2 Banden der Längen 213 bp und 228 bp, was für einen Genotypen G/G spricht.

Es zeigte sich im Verlauf der Analysen, dass ausschließlich der Genotyp G/G auftrat. Die einzige Ausnahme hierzu bildeten einzelne Studienteilnehmer von den Azoren. Aufgrund dieser Beobachtung wurde die Analyse nur für die Kohorte der Azoren fortgesetzt und anschließend die azoreanische Kohorte mit den Studienteilnehmern der restlichen ESMI-Zentren verglichen. Die Kohorte aus den

Azoren umfasste 56 Studienteilnehmer, von denen 92,7 % den Genotyp G/G und 7,3 % A/G aufwiesen. Die Vergleichsgruppe aus den restlichen ESMI-Zentren bestand aus 55 Studienteilnehmer (16 aus Deutschland, 8 aus den Niederlanden, 23 aus Großbritannien und 8 aus Coimbra), für die sich zu 100 % die Variante G/G ergab (Abb. 31). In der Kontingenz-Analyse zwischen der azoreanischen Kohorte, der restlichen ESMI-Kohorte und den Genotypen mittels Exaktem Fisher Test zeigte sich keine signifikante Abhängigkeit. Jedoch lag der p-Wert nur knapp über dem Signifikanzniveau ($p = 0,0569$). Die Verteilung der Genotypen für die Azoren und die restlichen ESMI-Zentren gemeinsam betrachtet (96,4 % G/G, 3,6 % A/G, 0 % A/A) entsprach dem berechneten Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (Chi-Quadrat-Test, $p = 0,1529$).

SNP Bp 1281

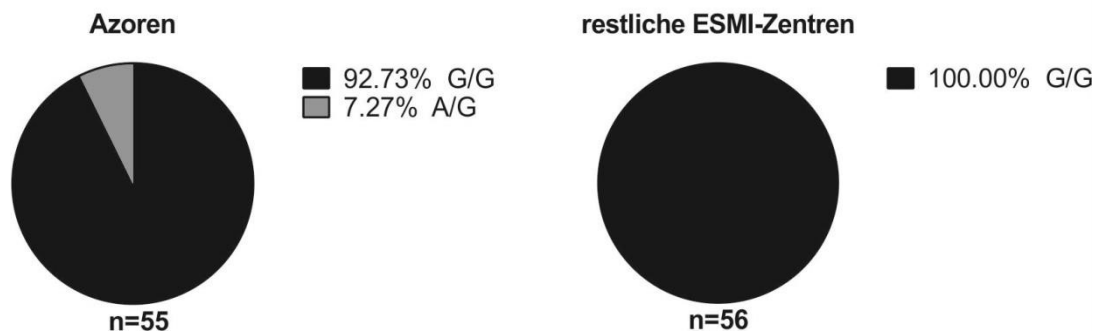


Abbildung 31: Verteilung der Genotypen des PARK2-SNPs Bp 1281 in der azoreanischen Kohorte und den restlichen ESMI-Zentren. Die Aufteilung erfolgte nach den Studienteilnehmern der Azoren und denen der restlichen ESMI-Zentren, da einzig in der azoreanischen Kohorte nicht ausschließlich der Genotyp G/G auftrat. n steht für die Anzahl der Studienteilnehmer. Im Exakten Fisher-Test zeigte sich keine signifikante Kontingenz zwischen den Azoren, den restlichen ESMI-Zentren und den Genotyp-Verteilungen ($p = 0,0569$).

3.3. SNP-Genotypen und ihre Korrelation mit klinischen SCA3-Daten

3.3.1. ATXN3-Genotypen und die CAG-Wiederholungsanzahl

Es wurde für die ESMI-Kohorte geprüft, ob bestimmte Haplotypen der ATXN3-SNPs Bp 987 und Bp 1118 mit unterschiedlichen mittleren CAG-Wiederholungsanzahlen auf dem jeweiligen Allel des ATXN3-Gens einhergehen. Hierbei wäre eine solche Analyse für alle drei untersuchten ATXN3-SNPs wünschenswert gewesen, jedoch konnte dies aufgrund der fehlenden allelspezifischen

Zuordnungsmöglichkeit der Haplotypen des SNPs Bp 669 nicht umgesetzt werden. Darum erfolgte die Untersuchung nur für die SNPs Bp 987 und Bp 1118. Da bei diesen beiden SNPs die allelspezifische Zuordnung der Haplotypen nur für die Allele der Mutationsträger vorlag, beschränkte sich die Analyse entsprechend auf diese Allele. Für beide SNPs wurden jeweils die nicht-expandierten und die expandierten Allele nach Haplotypen sortiert und anschließend die durchschnittliche CAG-Wiederholungsanzahl der Haplotyp-Gruppen miteinander verglichen. Beim SNP Bp 987 zeigten die nicht-expandierten Allele mit dem Haplotyp C im Mittel eine CAG-Wiederholungsanzahl von 23,5, während es bei den nicht-expandierten Allelen mit der Variante G 21,0 Wiederholungen waren. Die Anzahl der durchschnittlichen Wiederholungen bei den expandierten Allelen betrug für C 68,5 und für G 68,9 (Abb. 32A). In den statistischen Analysen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Wiederholungsanzahlen der beiden Haplotypen bei den nicht-expandierten Allelen (Mann-Whitney-Test, $p = 0,0302$). Der Unterschied bei den expandierten Allelen war hingegen nicht signifikant (Mann-Whitney-Test, $p = 0,6348$).

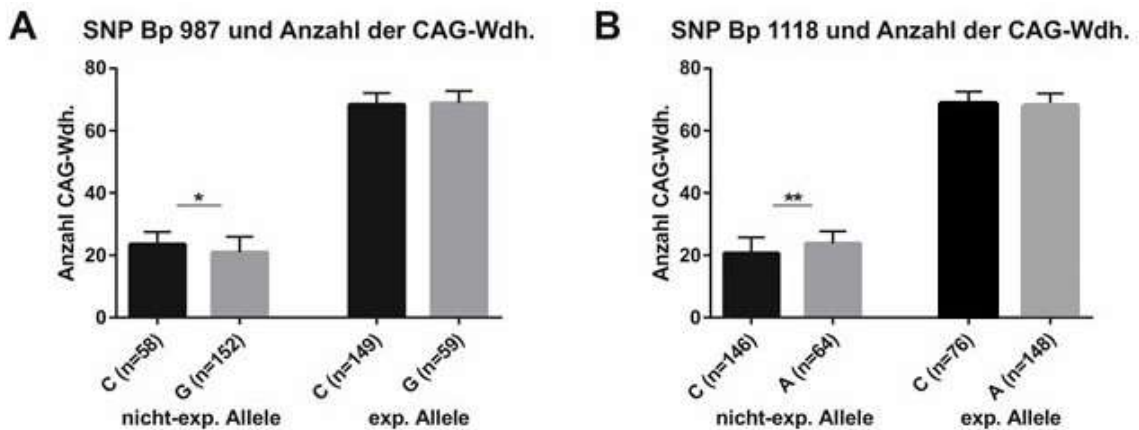


Abbildung 32: Haplotypen der SNPs Bp 987 und Bp 1118 und die assoziierte Anzahl der CAG-Wiederholungen. Durchschnittliche Anzahl der CAG-Wiederholungen der jeweiligen Haplotypen aufgeteilt nach nicht-expandierten und expandierten Allelen. A: CAG-Wiederholungsanzahl für die Haplotypen des SNP Bp 987. Die nicht-expandierten Allele mit dem Haplotyp C wiesen im Mittel 23,5 CAG-Wiederholungen auf, während es bei G 21 Wiederholungen waren. Der Unterschied war dabei statistisch signifikant (Mann-Whitney-Test, $p = 0,0302$). Bei den expandierten Allelen war die durchschnittliche CAG-Wiederholung für C 68,5 und für G 68,9, was keine signifikante Differenz darstellte (Mann-Whitney-Test, $p = 0,6348$). B: Anzahl der CAG-Wiederholungen für den SNP Bp 1118. Die mittlere Wiederholungsanzahl für die nicht-expandierten Allele betrug für C 20,8 und für A 23,7. Der Unterschied erwies sich im Mann-Whitney-Test als signifikant ($p = 0,0183$). Die expandierten Allele mit dem Haplotyp C zeigten durchschnittlich 69,0 und die mit dem Haplotyp A 68,1 CAG-Wiederholungen. Hier war der Unterschied wiederum nicht

signifikant (Mann-Whitney-Test, $p = 0,0810$). n steht in beiden Grafiken für die Anzahl der Allele. Die Balken stellen jeweils den Mittelwert dar und die Whisker zeigen die Standardabweichung.

Bei den nicht-expandierten Allelen des SNP Bp 1118 war die durchschnittliche Anzahl der CAG-Wiederholungen für den Haplotyp C 20,8 und für A 23,7. Die expandierten Allele mit Haplotyp C zeigten im Mittel 69,0 und jene mit Haplotyp A 68,1 Wiederholungen (Abb. 32B). Hier war der Unterschied zwischen den Wiederholungsanzahlen der Haplotypen für die nicht-expandierten Allele signifikant (Mann-Whitney-Test, $p = 0,0183$). Für die expandierten Allele ergab sich kein signifikanter Unterschied (Mann-Whitney-Test, $p = 0,0810$).

3.3.2. Genotypen der SNPs und Age at onset

Es wurde untersucht, inwieweit die verschiedenen Genotypen bzw. Haplotypen der jeweiligen *ATXN3*- und *PARK2*-SNPs mit unterschiedlichen mittleren AAOs der entsprechenden Studienteilnehmer assoziiert sind. Die zugrunde liegende Fragestellung dafür war, ob bestimmte Genotypen mit einem leichteren/schwereren klinischen Krankheitsverlauf bzw. früherem/späterem Erkrankungsbeginn assoziiert sind. Dies wurde für alle drei *ATXN3*-SNPs und für die *PARK2*-SNPs Bp 601 und Bp 1239 untersucht. Der *PARK2*-SNP Bp 1281 wurde aufgrund des geringen bzw. fehlenden Auftretens der seltenen Genotyp-Varianten für diese Analyse nicht berücksichtigt. Für den *ATXN3*-SNP Bp 669 wurden die AAOs der Studienteilnehmer in Abhängigkeit der drei Genotypen (G/G, G/A, A/A) verglichen (Abb. 33A). Es ergab sich dabei im einfaktoriellen ANOVA-Test kein signifikanter Unterschied für das mittlere AAO zwischen den Genotypen ($p = 0,2697$). Bei den *ATXN3*-SNPs Bp 987 und Bp 1118 erfolgte der Vergleich jeweils zwischen den beiden Haplotyp-Varianten (G, C bzw. C, A) der nicht-expandierten und der expandierten Allele (Abb. 33B/C). Das mittlere AAO variierte weder für den SNP Bp 987 noch für den SNP Bp 1118 signifikant zwischen den Haplotyp-Varianten (einfaktorieller ANOVA-Test, p jeweils $\geq 0,6199$).

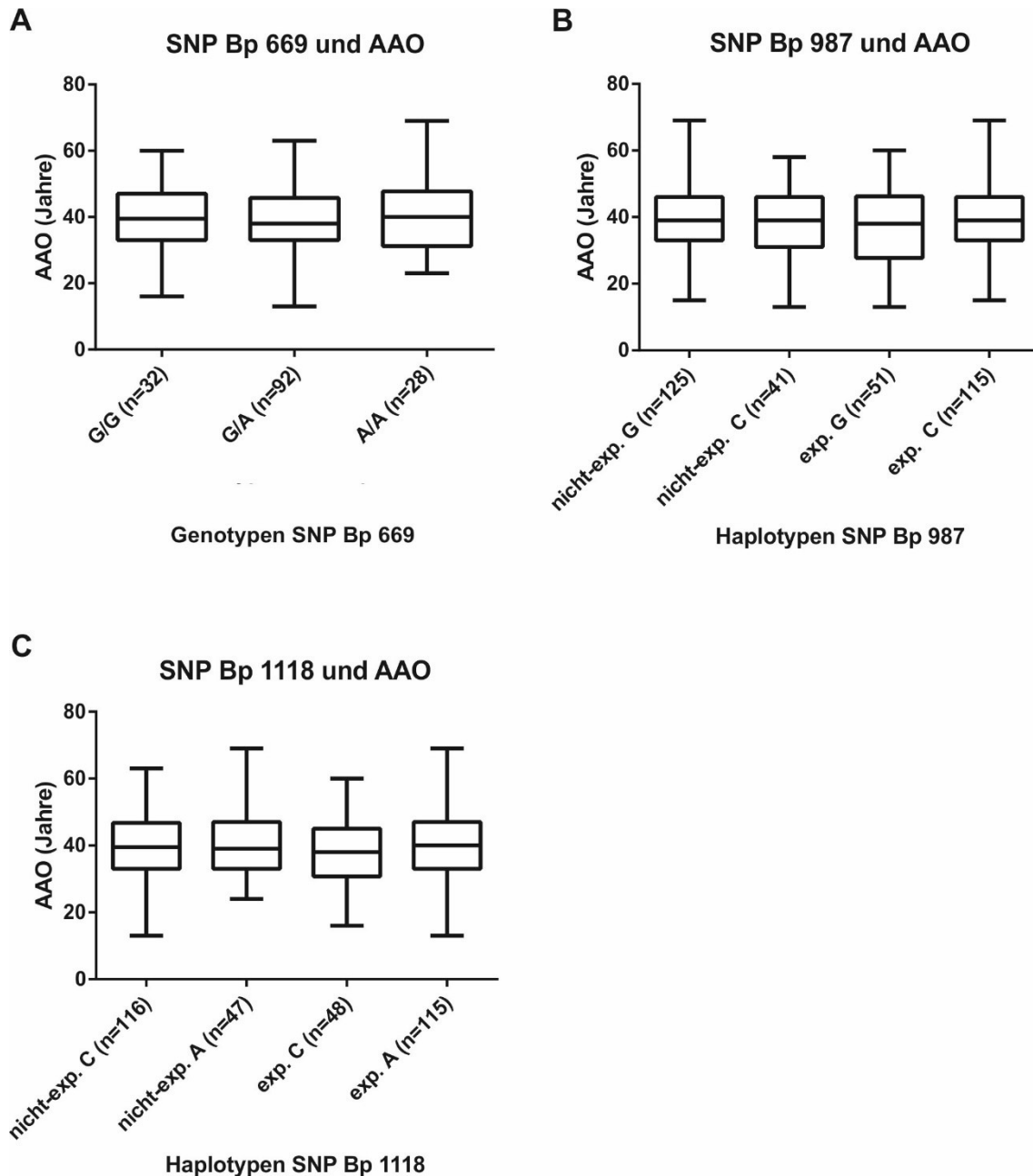


Abbildung 33: Geno-/Haplotypen der ATXN3-SNPs und das assoziierte AAO der Studienteilnehmer. Darstellung des AAO der Studienteilnehmer gruppiert nach den jeweiligen Geno- bzw. Haplotypen der ATXN3-SNPs. A: Medianes AAO (in Jahren) für den SNP Bp 669: G/G = 39,5; G/A = 38; A/A = 40. Der einfaktorielles ANOVA-Test ergab keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,2697$). B: Vergleich des AAO zwischen den Haplotypen des SNP Bp 987. Medianes AAO (in Jahren): nicht-exp. G = 39; nicht-exp. C = 39; exp. G = 38; exp. C = 39. Es konnte keine signifikante Differenz nachgewiesen werden (einfaktorieller ANOVA-Test, $p = 0,6199$). C: AAO in Abhängigkeit der Haplotypen des SNPs Bp 1118. Medianes AAO (in Jahren): nicht-exp. C = 40; nicht-exp. A = 39; exp. C = 38; exp. A = 40. Das AAO unterschied sich für den SNP Bp 1118 nicht signifikant (einfaktorieller ANOVA-Test, $p = 0,7431$). Der Boxplot gibt in allen 3 Grafiken den Median mit unterem und oberem Quartil an. Die Whisker stellen Minimum und Maximum dar. n steht in der Grafik A für die Anzahl der Studienteilnehmer und in den Grafiken B und C für die Anzahl der Allele.

Für den *PARK2*-SNP Bp 601 erfolgte der Vergleich des AAO nur zwischen den Genotypen G/G und G/A (Abb. 34A). Der Genotyp A/A trat zu selten auf und wurde daher nicht in die Analysen miteinbezogen. Zwischen dem mittleren AAO der Studienteilnehmer mit dem Genotyp G/G und derer mit dem Genotyp G/A zeigte sich kein signifikanter Unterschied (ungepaarter t-Test, $p = 0,3955$). Beim SNP Bp 1239 wurden alle drei Genotypen (G/G, G/C, C/C) einbezogen (Abb. 34B). Auch hier unterschieden sich die mittleren AAOs nicht signifikant (einfaktorieller ANOVA-Test, $p = 0,3057$).

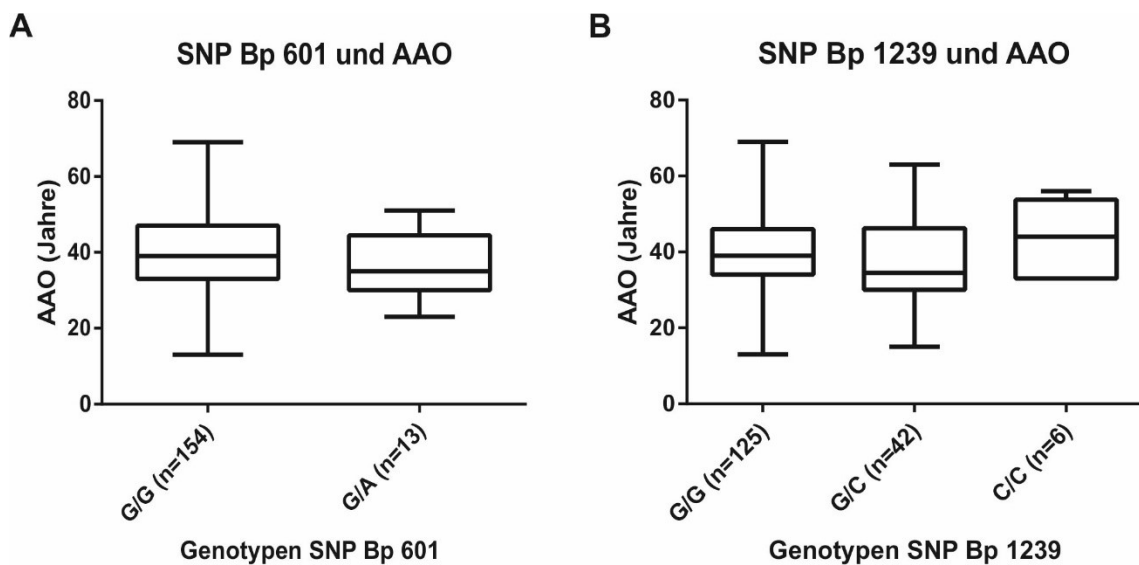


Abbildung 34: Genotypen der *PARK2*-SNPs und das assoziierte AAO der Studienteilnehmer. AAOs der Studienteilnehmer in Abhängigkeit der Genotypen der *PARK2*-SNPs Bp 601 und Bp 1239. A: Beim SNP Bp 601 wurden nur die Genotypen G/G und G/A analysiert, da der Genotyp A/A zu selten auftrat. Medianes AAO (in Jahren): G/G = 39; G/A = 35. Der Unterschied war im ungepaarten t-Test nicht signifikant ($p = 0,3955$). B: Medianes AAO (in Jahren) für den SNP Bp 1239: G/G = 39; G/C = 34,5; C/C = 44. Für die Differenzen ergab sich keine Signifikanz (einfaktorieller ANOVA-Test, $p = 0,3057$). In beiden Darstellungen zeigt der Boxplot Median, sowie oberes und unteres Quartil an. Die Whisker stellen Minimum und Maximum dar. n steht in beiden Grafiken für die Anzahl der Studienteilnehmer.

3.3.3. Genotypen der SNPs und *Cross-sectional Disease Progression*

Eine weitere Untersuchung, um eine mögliche Assoziation bestimmter *ATXN3*- bzw. *PARK2*-Genotypen mit der Schwere des klinischen Krankheitsverlaufes zu prüfen, betraf die CSDP. Auch hier wurde der *PARK2*-SNP Bp 1281 aufgrund des nur sporadischen bzw. fehlenden Vorkommens der seltenen Genotypen nicht berücksichtigt. Die Studienteilnehmer wurden für den jeweiligen SNP nach

Geno- bzw. Haplotypen gruppiert und die medianen CSDPs zwischen den Gruppen verglichen. Für den *ATXN3*-SNP Bp 669 ergab sich für die medianen CSDPs kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen G/G, G/A und A/A (Kruskal-Wallis-Test, $p = 0,8013$), (Abb. 35A). Bei den *ATXN3*-SNPs Bp 987 und Bp 1118 wurden die Studienteilnehmer jeweils nach Haplotypen (G, C bzw. C, A) ihrer nicht-expandierten und ihrer expandierten Allele gruppiert (Abb. 35B/C). Für beide SNPs konnten keine signifikanten Unterschiede der medianen CSDPs zwischen diesen Gruppen nachgewiesen werden (Kruskal-Wallis-Test, p jeweils $\geq 0,7489$).

Für den *PARK2*-SNP Bp 601 wurden die medianen CSDPs nur zwischen den Genotypen G/G und G/A verglichen, da die Variante A/A zu selten auftrat (Abb. 36A). Im Mann-Whitney-Test zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den medianen CSDPs dieser beiden Genotypen ($p = 0,5262$). Auch beim SNP Bp 1239 unterschieden sich die CSDPs der drei Genotypen (G/G, G/C, C/C) nicht signifikant (Kruskal-Wallis-Test, $p = 0,3614$), (Abb. 36B).

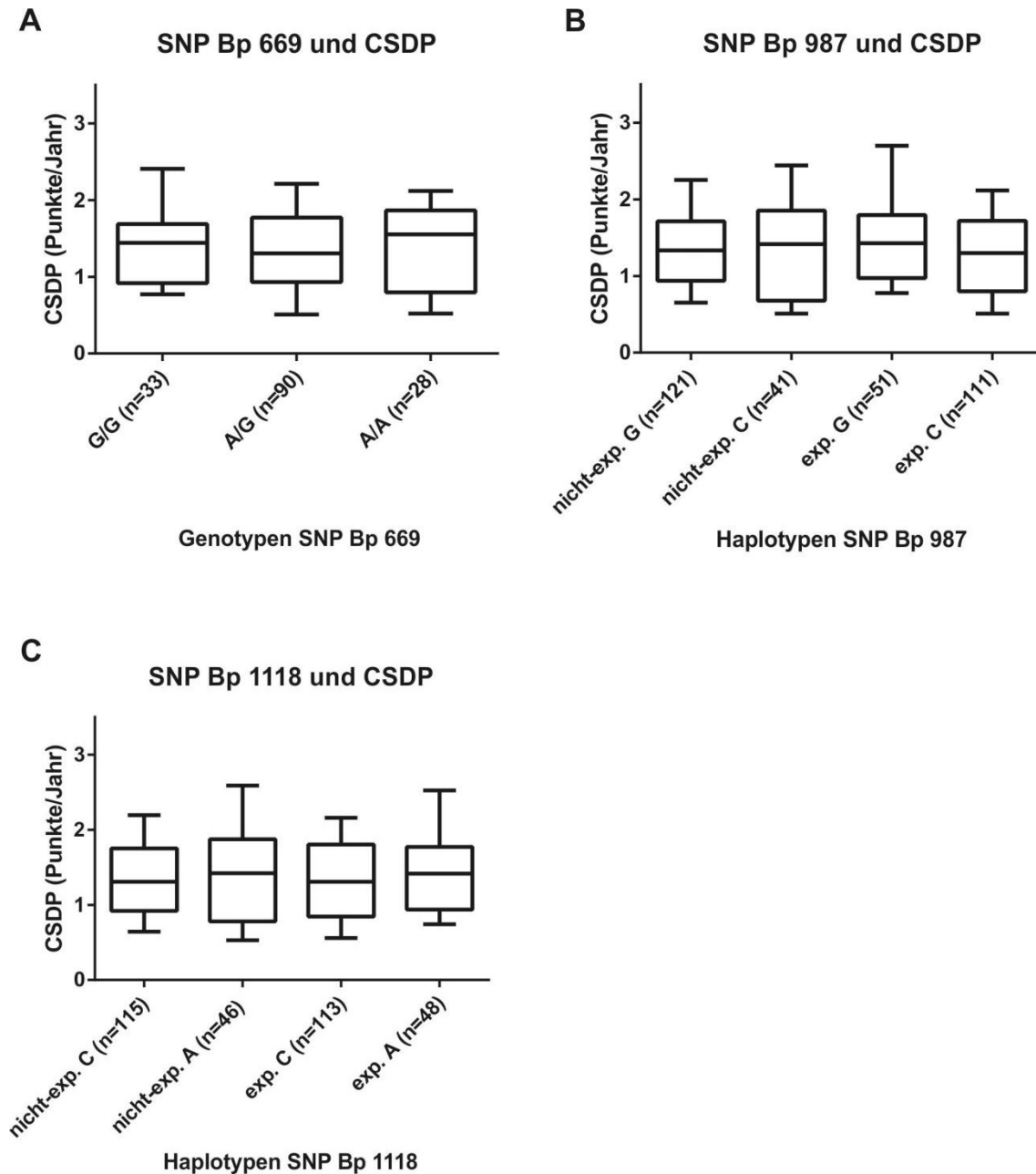


Abbildung 35: Geno-/Haplotypen der ATXN3-SNPs und die assoziierte CSDP der Studienteilnehmer. CSDP in Abhängigkeit der Geno- bzw. Haplotypen für die ATXN3-SNPs Bp 669, Bp 987 und Bp 1118. A: Mediane CSDP (in Punkte/Jahr) für den SNP Bp 669: G/G = 1,4; G/A = 1,3; A/A = 1,6. Die Unterschiede waren nicht signifikant (Kruskal-Wallis-Test, $p = 0,8013$). B: CSDP nach Haplotypen der nicht-expandierten und expandierten Allele für den SNP Bp 987. Medianes CSDP (in Punkte/Jahr): nicht-exp. G = 1,3; nicht-exp. C = 1,4; exp. G = 1,4; exp. C = 1,3. Die Werte unterschieden sich nicht signifikant (Kruskal-Wallis-Test, $p = 0,7489$). C: CSDP in Abhängigkeit der Haplotypen des SNPs Bp 1118. Medianes CSDP (in Punkten/Jahr): nicht-exp. C = 1,3; nicht-exp. A = 1,4; exp. C = 1,3; exp. A = 1,4. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Kruskal-Wallis-Test, $p = 0,9585$). Für alle drei Grafiken ist im Boxplot Median, sowie oberes und unteres Quartil dargestellt. Die Whisker geben die 10. und 90. Perzentile an. In Grafik A steht n für die Anzahl der Studienteilnehmer, in den Grafiken B und C für die Anzahl der Allele.

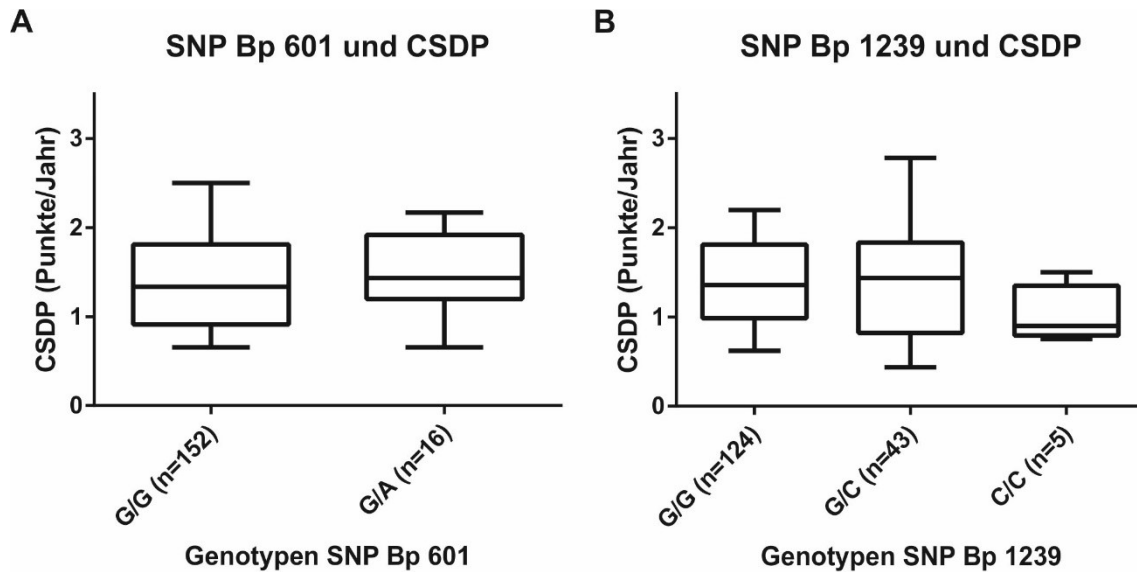


Abbildung 36: Genotypen der PARK2-SNPs und die assoziierte CSDP der Studienteilnehmer. CSDP der Studienteilnehmer in Abhängigkeit zu den Genotypen der PARK2-SNPs Bp 601 und Bp 1239. A: Für den SNP Bp 601 erfolgte die Analyse nur für die Varianten G/G und G/A, da der Genotyp A/A zu selten auftrat. Mediane CSDP (in Punkte/Jahr): G/G = 1,3; G/A = 1,4. Der Unterschied war nicht signifikant (Mann-Whitney-Test, $p = 0,5262$). B: Mediane CSDP (in Punkten/Jahr) für den SNP Bp 1239: G/G = 1,4; G/C = 1,4; C/C = 0,9. Es konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden (Kruskal-Wallis-Test, $p = 0,3614$). In beiden Grafiken geben die Boxplots Median und oberes und unteres Quartil an. Die Whisker stellen die 10. und 90. Perzentile dar. n steht in beiden Grafiken für die Anzahl der Studienteilnehmer.

3.3.4. Genotypen der SNPs und Level des löslichen ATXN3 (L-ATXN3)

Es sollte ein möglicher Einfluss bestimmter Genotypen der ATXN3- und PARK2-SNPs auf die Stabilität oder Expressionslevel des ATXN3-Proteins untersucht werden. Dafür wurde geprüft, ob die verschiedenen Genotypen mit unterschiedlichen L-ATXN3-Leveln bei den jeweiligen Studienteilnehmern einhergehen. Die Messdaten der L-ATXN3-Level lagen dieser Arbeit bereits vor. Sie wurden im PBMC-Homogenat mittels *Time-resolved fluorescence energy transfer*-Assay (TR-FRET) gemessen. Die Etablierung und detaillierte Beschreibung dieser Methode zur Bestimmung von L-ATXN3-Proteinlevel kann den medizinischen Dissertationsschriften von Kathrin Gonsior und Gabriele A. Kaucher, sowie der Publikation von Gonsior et al. im *Journal of Neurology* entnommen werden (Gonsior et al., 2020). Beim TR-FRET binden zwei fluoreszenzmarkierte Antikörper an das Zielprotein, zwischen welchen es bei räumlicher Nähe zum Energietransfer kommt. Der im Energietransfer als Akzeptor fungierende Antikörper sendet bei spezifischer Anregung ein Energiesignal, welches detektiert wird. Das

gemessene Signal wird ins Verhältnis zum Hintergrundsignal und zur Gesamt-Proteinkonzentration der Probe gesetzt und in Δ Fc (% Signal über Hintergrund) angegeben. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Messdaten wurde ein PolyQ-spezifischer Akzeptor-Antikörper eingesetzt, der erst bei einem PolyQ-Bereich ≥ 37 Glutamine bindet und damit eine hohe Trennschärfe zwischen nicht-expandierten und expandierten Allelen aufweist. Diese Trennschärfe zeigt sich im Vergleich der L-ATXN3-Level von Kontrollen, nicht-ataktischen und ataktischen Mutationsträger. Das mediane ATXN3-Level der Kontrollen betrug 13,9 Δ Fc, das, der nicht-ataktischen Mutationsträger 37,8 Δ Fc und das, der ataktischen Mutationsträger 50,0 Δ Fc (Abb. 37). Der Unterschied zwischen diesen drei Medianen war höchst signifikant (Kruskal-Wallis-Test, $p < 0,0001$). Vergleiche zwischen jeweils zwei der drei Gruppen mittels Mann-Whitney-Test ergaben einen höchst signifikanten Unterschied zwischen den Kontrollen und den nicht-ataktischen Mutationsträgern, sowie zwischen den Kontrollen und den ataktischen Mutationsträgern (p jeweils $\leq 0,0001$). Dagegen zeigte sich zwischen den nicht-ataktischen und den ataktischen Mutationsträgern kein signifikanter Unterschied (Mann-Whitney-Test, $p = 0,3907$).

Die der verwendeten L-ATXN3-Level-Messwerte zugrundeliegende Methode detektiert also in erster Linie ATXN3-Proteine mit expandiertem PolyQ-Bereich. Aus diesem Grund wurden in die folgenden, das L-ATXN3-Level betreffenden Analysen nur die Mutationsträger der ESMI-Kohorte eingeschlossen.

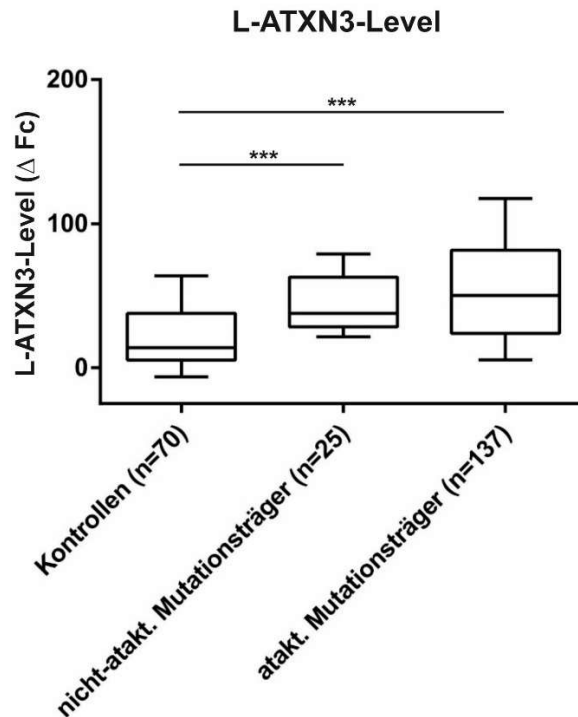


Abbildung 37: L-ATXN3-Level bei Kontrollen, nicht ataktischen und ataktischen Mutationsträgern. Es sind die L-ATXN3-Level der ATXN3-Proteine aufgeteilt nach Kontrollen, nicht-ataktischen und ataktischen Mutationsträgern in ΔFc (% Signal über Hintergrund) gegen die Ordinate aufgetragen. Mediane L-ATXN3-Level (in ΔFc): Kontrollen = 13,9; nicht-ataktische Mutationsträger = 37,8; ataktische Mutationsträger = 50,0. Es ergab sich im Kruskal-Wallis-Test ein höchst signifikanter Unterschied zwischen diesen Medianen ($p < 0,0001$). Im Mann-Whitney-Test zeigten sich höchst signifikante Unterschiede zwischen den Kontrollen und den nicht-ataktischen Mutationsträgern und zwischen den Kontrollen und den ataktischen Mutationsträgern (p jeweils $< 0,0001$). n steht für die Anzahl der Studienteilnehmer. Im Boxplot sind Median, oberes und unteres Quartil dargestellt. Die Whisker zeigen die 10. und 90. Perzentile.

Für den ATXN3-SNP Bp 669 zeigten sich bezüglich der L-ATXN3-Level keine signifikanten Unterschiede zwischen den nach den Genotypen (G/G, G/A, A/A) gruppierten Mutationsträgern (Kruskal-Wallis-Test, $p = 0,1129$), (Abb. 38A). Für die ATXN3-SNPs Bp 987 und Bp 1118 erfolgte die Einteilung der Mutationsträger nach ihren Haplotypen (G, C bzw. C, A), jeweils für nicht-expandierte und expandierte Allele (Abb. 38B/C). Zwischen diesen Gruppen ergab sich für keinen der beiden SNPs ein signifikanter Unterschied der L-ATXN3-Level (einfaktorieller ANOVA-Test bzw. Kruskal-Wallis-Test, p jeweils $\geq 0,6199$).

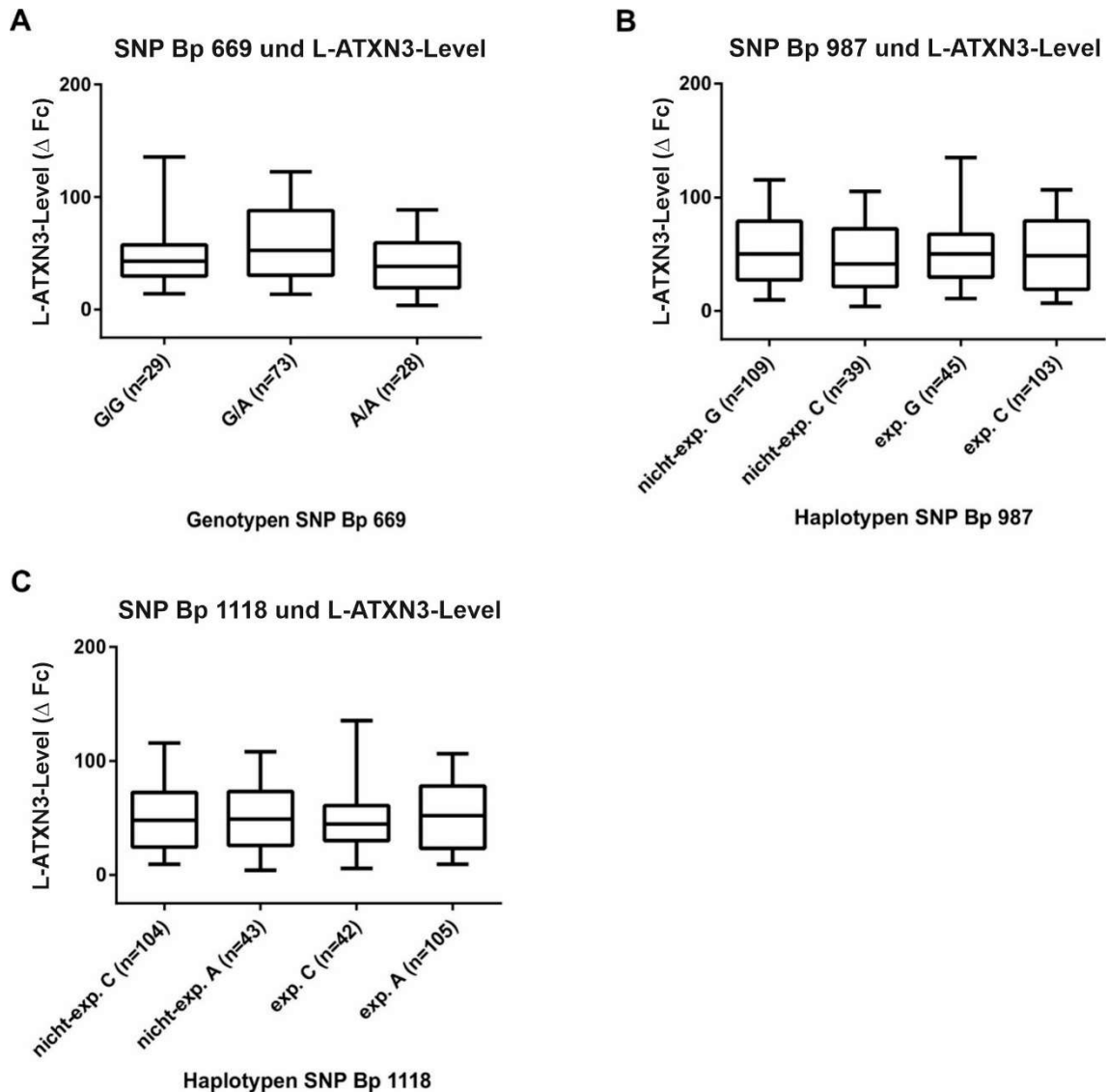


Abbildung 38: Geno-/Haplotypen der ATXN3-SNPs und die assoziierten L-ATXN3-Protein-Level. Level des expandierten L-ATXN3-Proteins in Abhängigkeit zu den Genotypen bzw. Haplotypen der ATXN3-SNPs Bp 669, Bp 987 und Bp 1118. Die L-ATXN3-Level sind jeweils gegen die Ordinate in der Einheit Δ Fc (% Signal über Hintergrund) aufgetragen. A: Mediane L-ATXN3-Level (in Δ Fc) für die Genotypen des SNPs Bp 669: G/G = 43,0; G/A = 52,5; A/A = 38,2. Die Werte unterschieden sich nicht signifikant (Kruskal-Wallis-Test, $p = 0,1129$). B: L-ATXN3-Level nach Haplotypen des SNPs Bp 987. Mediane L-ATXN3-Level (in Δ Fc): nicht-exp. G = 50,0; nicht-exp. C = 41,2; exp. G = 50,0; exp. C = 48,5. Im einfaktoriellem ANOVA-Test ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,6199$). C: L-ATXN3-Level in Abhängigkeit zu den Haplotypen des SNPs Bp 1118. Mediane L-ATXN3-Level (in Δ Fc): nicht-exp. C = 47,9; nicht-exp. A = 49,0; exp. C = 44,6; exp. A = 50,8. Die Unterschiede hatten keine statistische Signifikanz (Kruskal-Wallis-Test, $p = 0,9930$). In allen drei Darstellungen gibt n die Anzahl der Studienteilnehmer (nur Mutationsträger) an. Die Boxplots zeigen jeweils Median, sowie unteres und oberes Quartil. Die Whisker stellen die 10. und 90. Perzentile dar.

Aufgrund der beschriebenen Interaktionen zwischen Parkin und ATXN3, wurden mögliche Zusammenhänge zwischen SNP-Genotypen und L-ATXN3-Level auch für die Genotypen der *PARK2*-SNPs untersucht. Wie schon bei den

vorhergehenden Analysen wurde auch hierbei der *PARK2*-SNP Bp 1281 aufgrund der nur sporadisch auftretenden bzw. fehlenden seltenen Genotyp-Varianten nicht mit einbezogen. Für den SNP Bp 601 wurde aufgrund des seltenen Auftretens der Variante A/A nur die beiden häufigeren Genotypen G/G und G/A in die Analysen miteinbezogen (Abb. 39A). Es zeigte sich zwischen den Mutationsträgern mit diesen beiden Varianten kein signifikanter Unterschied in den L-ATXN3-Level (Mann-Whitney-Test, $p = 0,3242$). Auch für den SNP Bp 1239 konnte kein signifikanter Unterschied des L-ATXN3-Levels zwischen den Genotypen (G/G, G/C, C/C) nachgewiesen werden (Kruskal-Wallis-Test, $p = 0,2121$), (Abb. 39B).

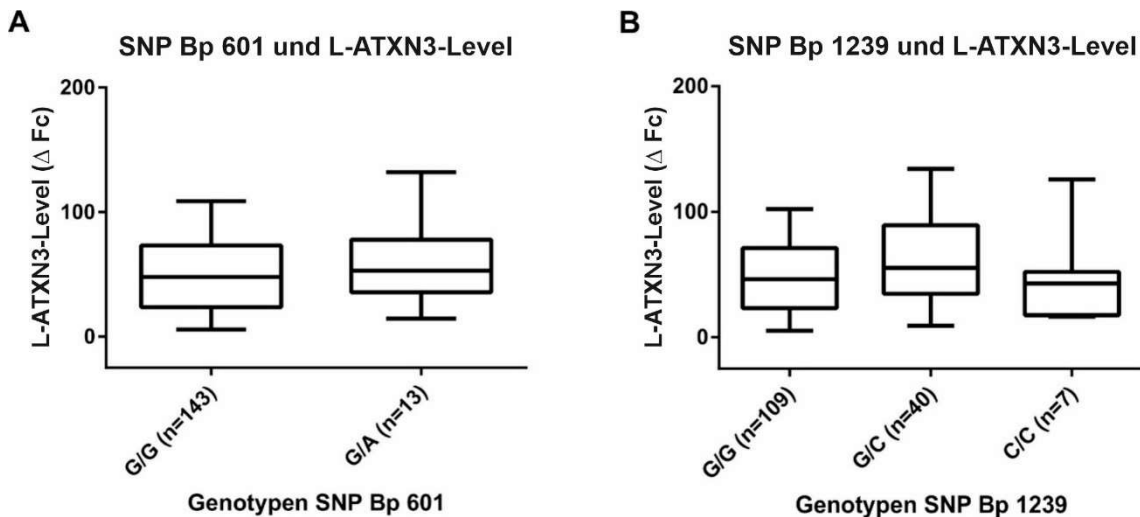


Abbildung 39: Genotypen der *PARK2*-SNPs und die assoziierten L-ATXN3-Level. Die L-ATXN3-Level der ATXN3-Proteine mit expandiertem PolyQ-Bereich sind in ΔFc (% Signal über Hintergrund) gegen die Ordinate aufgetragen. A: Für den SNP Bp 601 wurden nur die Genotypen G/G und G/A in die Analysen miteinbezogen, da die Variante A/A zu selten auftrat. Mediane L-ATXN3-Level (in ΔFc): G/G = 47,8; G/A = 52,9. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied (Mann-Whitney-Test, $p = 0,3242$). B: Mediane L-ATXN3-Level (in ΔFc) für die Genotypen des SNPs Bp 1239: G/G = 46,3; G/C = 55,4; C/C = 43,0. Es konnten keine signifikanten Unterschiede im Kruskal-Wallis-Test nachgewiesen werden ($p = 0,2121$). In beiden Grafiken steht n für die Anzahl der Studienteilnehmer (nur Mutationsträger). Im Boxplot sind jeweils Median, oberes und unteres Quartil dargestellt. Die Whisker geben die 10. und 90. Perzentile an.

3.4. L-ATXN3-Level als putativer Biomarker für SCA3

Eine weitere Analyse dieser Arbeit betraf die Frage, ob sich das L-ATXN3-Level als molekularer Biomarker für die SCA3 eignet. Dafür wurde auf in PBMC-Homogenat gemessene Level der L-ATXN3-Proteine mit expandiertem PolyQ-Bereich zurückgegriffen. Die L-ATXN3-Level betragen in der ESMI-Kohorte für 159

Mutationsträger dabei im Median 49,0 Δ Fc (% Signal über Hintergrund; Minimum: -93,3 Δ Fc, Maximum: 555,0 Δ Fc). Zunächst wurden die L-ATXN3-Level zwischen den ESMI-Zentren verglichen. Hier lagen für Nijmegen keine L-ATXN3-Level-Messdaten vor, da in diesem klinischen Zentrum die CPT™-Blutröhrchen, welche zur Isolierung der PBMCs notwendig sind, nicht prozessiert werden können. Unter den fünf übrigen Zentren zeigte Coimbra mit 32,1 Δ Fc das niedrigste mediane Level und London mit 73,1 Δ Fc das höchste (Abb. 40). Die Unterschiede zwischen den ESMI-Zentren waren höchst signifikant (Kruskal-Wallis-Test, $p < 0,0001$).

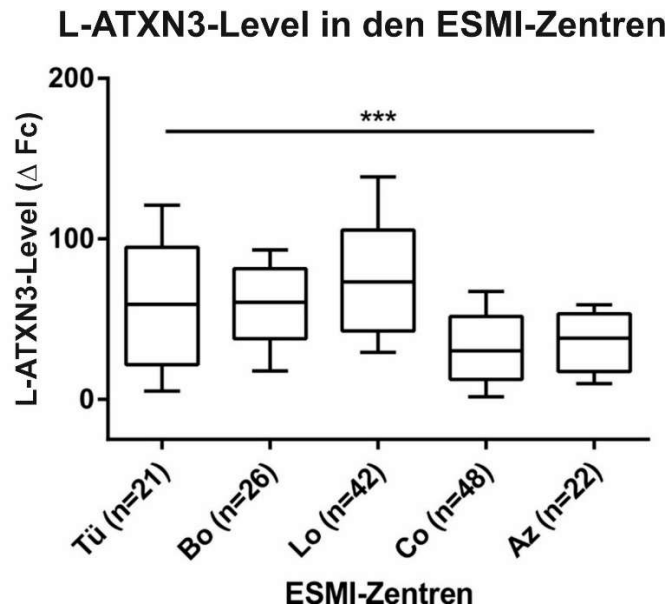


Abbildung 40: L-ATXN3-Level in den ESMI-Zentren. Die L-ATXN3-Level der expandierten ATXN3-Proteine sind in Δ Fc (% Signal über Hintergrund) gegen die Ordinate aufgetragen. Mediane L-ATXN3-Level (in Δ Fc): Tü = 59,1; Bo = 60,5; Lo = 73,1; Co = 32,1; Az = 38,1. Im Kruskal-Wallis-Test ergaben sich ein höchst signifikanter Unterschied zwischen den Zentren ($p < 0,0001$). n steht für die Anzahl der Studienteilnehmer (nur Mutationsträger). Im Boxplot werden Median, sowie oberes und unteres Quartil dargestellt. Die Whisker zeigen die 10. und die 90. Perzentile.

Um zu überprüfen, ob sich das L-ATXN3-Level als möglicher molekularer Biomarker eignet, muss untersucht werden, ob die Höhe der Level mit dem klinischen Krankheitsverlauf korrelieren. Hierfür wurden die ATXN3-Level gegen den SARA-Score für 137 ataktische Mutationsträger aufgetragen (Abb. 41). Zwischen dem L-ATXN3-Level und dem SARA-Score konnte keine signifikante Korrelation nachgewiesen werden (Spearman-Test, $r = 0,1398$, $p = 0,1032$).

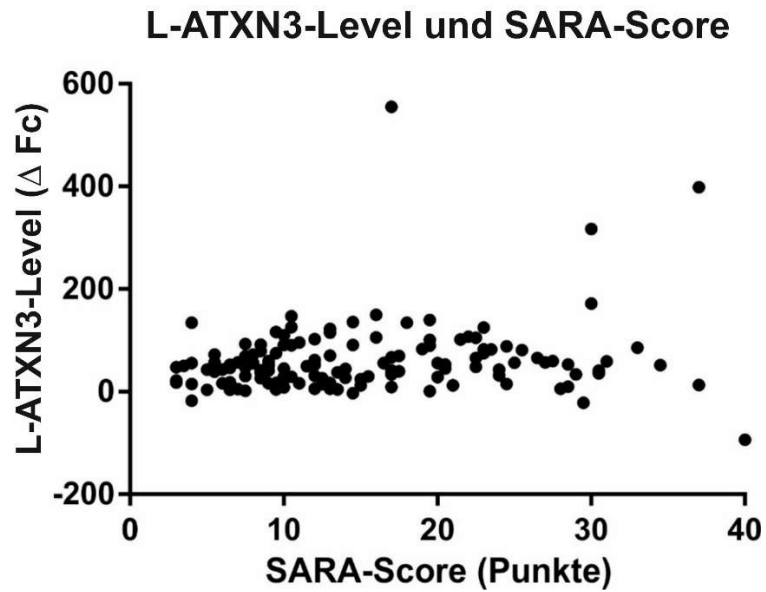


Abbildung 41: L-ATXN3-Level und SARA-Score. Es wurde für 137 ataktische Mutationsträger das L-ATXN3-Level der expandierten ATXN3-Proteine (in Δ Fc) gegen den SARA-Score (in Punkten) aufgetragen. Die Punkte stellen jeweils die Datenpaare der Studienteilnehmer dar. Im Spearman-Test zeigte sich keine signifikante Korrelation ($r = 0,1398$, $p = 0,1032$).

4. Diskussion

Die SCA3 ist eine seltene, autosomal dominant vererbare neurodegenerative Erkrankung. Durch Expansion einer CAG-Wiederholungssequenz im *ATXN3*-Gen kommt es zur Protein-Aggregation des daraus translatierten Erkrankungsproteins in Nervenzellen und einer damit einhergehenden Neurodegeneration (Bettencourt and Lima, 2011, Rub et al., 2013). Zum aktuellen Zeitpunkt existiert für die SCA3 keine kurative Therapie (McLoughlin et al., 2020). Auf einem möglichen Weg dorthin stellen für Studien benötigte große Stichproben und fehlende sensitive Biomarker zwei relevante Hürden dar (Lima and Raposo, 2018, Saute and Jardim, 2018). Das multizentrische europäische Projekt ESMI hat sich das Ziel gesetzt eine große Kohorte für künftige klinische Studien bereitzustellen. In dieser Arbeit wurde die ESMI-Kohorte einer Kohortenanalyse unterzogen und die Homogenität der Einzelkohorten untersucht. Weiterhin wurden unterschiedliche SNPs im *ATXN3*- und *PARK2*-Gen, welches für das mit dem *ATXN3*-Protein interagierende Parkin-Protein codiert, analysiert. Es wurde die Verteilung der unterschiedlichen Genotypen in der Kohorte und die mögliche Assoziation bestimmter Varianten mit leichteren oder schwereren Krankheitsverläufen überprüft. Schließlich erfolgte eine Betrachtung des L-*ATXN3*-Protein-Level als putativer molekularer Biomarker für die SCA3.

4.1. Kohortenanalyse der ESMI-Kohorte

Zum aktuellen Zeitpunkt sind klinische Bewertungsskalen, wie z. B. der *SARA-Score*, die Methode der Wahl zur Einschätzung des Krankheitsstadiums und -verlaufs in der SCA3. Da diese einer nicht zu vermeidenden Subjektivität unterliegen, werden große Stichproben benötigt, um in Therapie-Studien Effekte zuverlässig messen zu können. So sind, um eine 50-prozentige Reduktion der Krankheitsprogression in einem Jahr mittels *SARA-Score* zu detektieren 175 – 202 Probanden notwendig. Derartige Stichprobengrößen erfordern für eine seltene Erkrankung wie SCA3 multizentrische Kohorten (Saute and Jardim, 2018). Auch für die Validierung von möglichen *State*-Biomarkern - die Therapiestudien mit kleineren Stichproben ermöglichen könnten - werden multizentrische Studien benötigt (Furtado et al., 2019). Europäische multizentrische Kohorten bilden z. B.

die EuroSCA- und die RISCA-Kohorte (Jacobi et al., 2015, Jacobi et al., 2013b). Eine weitere europäische multizentrische Kohorte für SCA3-Studien stellt die ESMI-Kohorte dar. Sie bildet sich aus den Einzelkohorten der sechs am ESMI-Projekt teilnehmenden Zentren (Tübingen, Bonn, Nijmegen, London, Coimbra, Azoren). Die ESMI-Kohorte unterscheidet sich in der Zusammensetzung der Studienteilnehmer deutlich von der EuroSCA- und RISCA-Kohorte. Die EuroSCA-Kohorte dient Studien zur natürlichen Krankheitsprogression der SCAs 1, 2, 3 und 6 und besteht deshalb ausschließlich aus ataktischen Mutationsträgern (Jacobi et al., 2015). Die RISCA-Kohorte wiederum hat die Erforschung des präklinischen Stadiums der SCAs 1, 2, 3 und 6 zum Zweck und umfasst darum lediglich nicht-ataktische Verwandte von SCA-Patienten (Jacobi et al., 2013b). Die ESMI-Kohorte dagegen soll Probanden für Therapie- und Biomarkerstudien der SCA3 zur Verfügung stellen. Sie setzt sich damit neben ataktischen Mutationsträgern auch aus gesunden Kontrollen und nicht-ataktischen Mutationsträgern zusammen und bildet damit eine umfassendere und vielseitigere Kohorte als das jeweilige EuroSCA- und RISCA-Pendant. Tabelle 33 gibt einen vergleichenden Überblick über die ESMI-, EuroSCA und RISCA-Kohorte.

Tabelle 33: Die ESMI-Kohorte im Vergleich mit EuroSCA- und RISCA-Kohorte

	ESMI	EuroSCA	RISCA
Kontrollen	79	-	20
nicht-atakt. Mutationsträger	39	-	26
atakt. Mutationsträger	190	122	-
Quelle	-	Jacobi et al., 2015	Jacobi et al., 2013b

Zum Zeitpunkt der Daten-Auswertung dieser Arbeit, bestand die ESMI-Kohorte aus 308 Studienteilnehmer, von denen 79 gesunde Kontrollen, 39 nicht-ataktische und 190 ataktische Mutationsträger waren. Schätzungen ergeben für symptomatische Therapiestudien mit dem SARA-Score als Surrogatparameter eine erforderliche Stichprobengröße von 21 - 65 Probanden pro Studienarm, in Abhängigkeit der Studiendauer (Saute and Jardim, 2018). Diese Stichprobengröße kann das ESMI-Projekt bereits jetzt zur Verfügung stellen. Für krankheitsmodifizierende Therapiestudien mit dem SARA-Score als Surrogatparameter werden

175 – 202 Probanden bei einjähriger, 102 Probanden bei zweijähriger und 70 Probanden bei dreijähriger Studiendauer empfohlen (Chan et al., 2011, Jacobi et al., 2015). Hier würde die Stichprobengröße der ESMI-Kohorte für längerfristige Studien ausreichen. Mit 190 ataktischen Studienteilnehmer erreicht die ESMI-Kohorte auch die erforderliche Anzahl von 175 – 202 Probanden für einjährige krankheitsmodifizierende Studien. Allerdings muss damit gerechnet werden, dass aufgrund mangelnder Adhärenz nicht alle Studienteilnehmer der ESMI-Kohorte in nachfolgende Studien eingeschlossen werden können. Zudem beinhaltet die ESMI-Kohorte einige schwer betroffene Studienteilnehmer (8 Probanden mit SARA-Score > 30). Diese eignen sich wegen des weit fortgeschrittenen Krankheitsstadium nur bedingt für krankheitsmodifizierende Therapiestudien. Damit eine ausreichende Stichprobengröße für effektivere und weniger aufwendige Studien mit einer kürzeren Studiendauer von z. B. einem Jahr gewährleistet werden kann, sollten die ESMI-Zentren also weitere – bevorzugt mild betroffene – ataktische Mutationsträger rekrutieren. In der SCA3-Forschung sind sowohl für Studien zu potenziellen Biomarkern als auch für präventive Therapiestudien die Gruppe der nicht-ataktischen Mutationsträger von besonderer Relevanz (Furtado et al., 2019, Matilla-Dueñas et al., 2014). Hier wäre also eine größere Anzahl in der ESMI-Kohorte wünschenswert. Aufgrund von ethischen Problemen, sowie einer geringeren Adhärenz erweist sich die Rekrutierung von nicht-ataktischen Mutationsträgern jedoch generell als schwierig (Furtado et al., 2019). Der Umstand, dass der Anteil der nicht-ataktischen Mutationsträger an den Mutationsträgern insgesamt in der Einzelkohorte der Azoren mit 30 % bedeutend größer ist als in den übrigen ESMI-Zentren (jeweils $\leq 19\%$) lässt die Hypothese zu, dass mit einer angepassten Rekrutierungsstrategie in den übrigen Zentren die Anzahl der nicht-ataktischen Mutationsträger erhöht werden könnte. In der Einzelkohorte der Azoren fiel zudem auf, dass sich diese nur aus Mutationsträger zusammensetzte und zum Zeitpunkt der Datenerhebung keine gesunden Kontrollen beinhaltete. Diesem Umstand wurde nach Beendigung der Datenauswertung dieser Arbeit durch zusätzliche Rekrutierung gesunder Kontrollen von den Azoren entgegengewirkt (persönliche Kommunikation mit Dr. rer. nat. Jeannette Hübener-Schmid).

In dieser Arbeit wurde überprüft, inwieweit es sich bei der ESMI-Kohorte bezüglich demographischer und klinischer Daten um eine homogene Gesamt-Kohorte handelt bzw. inwieweit signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Einzelkohorten existieren. Dieses Wissen ist relevant, um mögliche Verzerrungen von Studienergebnissen durch Ungleichheiten in den Kohorten zu vermeiden. Möglichen Ungleichheiten können dabei unterschiedliche Ursachen zugrunde liegen. So können verschiedene Rekrutierungsstrategien der jeweiligen Zentren zu unterschiedlichen Zusammensetzungen der Einzelkohorten führen. Außerdem ist bislang nicht klar, welche genetische und umweltbedingte Faktoren einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf haben. So kann das AAO von SCA3-Patienten nur zu knapp der Hälfte mit der Anzahl der CAG-Wiederholungen im *ATXN3*-Gen erklärt werden. Für die nicht auf die CAG-Wiederholungsanzahl zurückzuführende Varianz des AAOs werden weitere genetische oder umweltbedingte Faktoren vermutet (Akçimen et al., 2020, Schmitz-Hubsch et al., 2008a, van de Warrenburg et al., 2005). Den Krankheitsverlauf betreffende Ungleichheiten in den Einzelkohorten des ESMI-Projektes können also auch die Folge davon sein, dass auf die Studienteilnehmer der jeweiligen Einzelkohorten bislang unbekannte genetische oder umweltbedingte Modifikatoren in unterschiedlichem Maße einwirken.

Für die ESMI-Kohorte ergaben sich im Alter bei Erstuntersuchung Ungleichheiten, wenn die Studienteilnehmer nach genetischem Status und Symptomatik aufgeteilt wurden. Während sich die medianen Alter zwischen Kontrollen und Mutationsträger nicht unterschieden, zeigten sich statistisch signifikante Differenzen, bei Einteilung der Studienteilnehmer in Kontrollen, nicht-ataktische und ataktische Mutationsträger. Die nicht-ataktischen Mutationsträger waren mit 34 Jahren im Median signifikant jünger als die Kontrollen (44 Jahre) und die ataktischen Mutationsträger (52 Jahre). Dies ist ein zu erwartendes Ergebnis, da das Alter von nicht-ataktischen Mutationsträger statistisch im Durchschnitt unter dem mittleren AAO von 39 Jahren liegen muss. Allerdings ergab sich auch zwischen den Kontrollen und den nicht-ataktischen Mutationsträgern ein signifikanter Unterschied. Dieser Unterschied ist wahrscheinlich auf die Rekrutierungsstrategien zurückzuführen und muss bei späteren Studien mit dieser Kohorte berücksichtigt

werden, um gegebenenfalls altersbedingte Verzerrungen zu vermeiden. So ist zum Beispiel für elektrophysiologische Parameter bekannt, dass diese sich nicht nur im Rahmen einer SCA3-Erkrankung verändern, sondern auch im Zuge des physiologischen Alterungsprozesses (Klockgether et al., 1999, Taylor, 1984).

Auch beim SARA-Score lässt sich vermuten, dass dieser durch altersbedingtes Nachlassen der Koordination mit beeinflusst wird. Erste vorläufige Daten, die diese Annahme bestätigen, wurden auf der *SCA Global Conference 2020* präsentiert. Hier zeigte sich in einer Kohorte von 375 gesunden Probanden bei den Studienteilnehmern über 60 Jahre (116 Probanden) eine höhere Variabilität im SARA-Score. Außerdem wurden SARA-Scores ≥ 3 Punkten ausschließlich bei den Über-60-Jährigen beobachtet (<http://ataxia-global-initiatives.net>).

Zwischen den ESMI-Zentren unterschied sich das mediane Alter der Studienteilnehmer nicht signifikant. Auch beim Vergleich der klinischen Daten (SARA-Score, AAO, CSDP) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Einzelkohorten nachgewiesen werden (Tab. 34). In dieser Hinsicht präsentiert sich die ESMI-Kohorte als homogene Gesamt-Kohorte, womit sie sich sehr gut für künftige klinische Studien eignet.

Tabelle 34: Zwischen den ESMI-Zentren verglichene Merkmale (*ns = nicht signifikant*)

Merkmal	Statistischer Test	p-Wert
Alter	Kruskal-Wallis-Test	ns
SARA-Score	Kruskal-Wallis-Test	ns
AAO	einfaktorieller ANOVA-Test	ns
CSDP	Kruskal-Wallis-Test	ns

Der mediane SARA-Score der ataktischen Mutationsträger lag in der ESMI-Kohorte bei 15 Punkten. Damit gleicht das durchschnittliche Krankheitsstadium der ataktischen Mutationsträgern dem der europäischen EuroSCA-Kohorte (mittlerer SARA-Score = 14), (Jacobi et al., 2015).

Für die ESMI-Kohorte betrug das AAO im Median 39 Jahren. Dies stimmt mit bereits publizierten Daten für das AAO zwischen 36 und 42 Jahren überein (Durr et al., 1996, Kieling et al., 2007, Klockgether et al., 1998). Auch die mediane

CSDP in der ESMI-Kohorte entspricht in der Literatur berichteten Daten. In der ESMI-Kohorte stieg der SARA-Score im Median 1,4 Punkte/Jahr, Jacobi et al. beschrieben eine Progression von 1,6 Punkten/Jahr (Jacobi et al., 2011).

Des Weiteren wurde die Anzahl der CAG-Wiederholungen in der ESMI-Kohorte analysiert. Hier ergab sich für den nicht-expandierten Bereich sowohl für die Allele der Kontrollen als auch für die nicht-expandierten Allele der Mutationsträger als häufigste CAG-Wiederholungsanzahl 23, gefolgt von 14 und 27. Die expandierten Allele der Mutationsträger zeigten am häufigsten 69, 70, 71 und 72 CAG-Wiederholungen. Eine Publikation von Dürr et al. berichtet für eine internationale SCA3-Kohorte (wobei 74 % der untersuchten Familien aus Frankreich stammten) im nicht-expandierten Bereich exakt dieselbe Reihenfolge der häufigsten Anzahl an CAG-Wiederholungen. Für die expandierten Allele traten in dieser Studie 73, 74 und 75 CAG-Wiederholungen am häufigsten auf (Durr et al., 1996). Die Übereinstimmung der Ergebnisse dieser Arbeit mit der Studie für die CAG-Wiederholungsanzahlen im nicht-expandierten Bereich bestätigt, dass 14, 23 und 27 Wiederholungen dominierende Varianten im nicht-expandierten *ATXN3*-Gen sind. Dasselbe gilt auch für eine von Chattopadhyay et al. beschriebenen indischen SCA3-Kohorte (Chattopadhyay et al., 2003). Es scheint sich also beim Dominieren dieser drei CAG-Wiederholungsanzahlen in nicht-expandierten Allelen um ein globales Phänomen zu handeln.

Für die SCA3 ist bekannt, dass die CAG-Wiederholungsanzahl mit dem AAO korreliert (Maciel et al., 1995). Eine Korrelation zwischen diesen beiden Merkmalen wurde auch für die ESMI-Kohorte überprüft. Im Pearson-Test ergab sich eine höchst signifikante negative Korrelation ($r = -0,6500$, $p = ***$). Der R^2 -Wert betrug 0,4226, was bedeutet, dass 42 % der Varianz des AAOs mit der Anzahl der CAG-Wiederholungen erklärt werden kann. In der Literatur werden in vergleichbaren Korrelationsanalysen R^2 -Werte zwischen 0,45 und 0,62 errechnet (Akçimen et al., 2020, Schmitz-Hubsch et al., 2008a, van de Warrenburg et al., 2005). Dabei unterscheidet sich der R^2 -Wert für die multizentrische europäische EuroSCA-Kohorte mit 0,45 kaum vom Ergebnis der ESMI-Kohorte (Schmitz-Hubsch et al., 2008a). Dagegen kann mit 62 % in der Studie von Akcimen et al. ein deutlich größerer Anteil des AAOs mit der Anzahl der CAG-Wiederholungen erklärt

werden. Zwar liegt der Studie eine internationale Kohorte zugrunde, allerdings wird diese von Studienteilnehmern aus Portugal und Brasilien dominiert (82 % der Kohorte), (Akçimen et al., 2020). Der größere R^2 -Wert in dieser Studie könnte also darauf zurückzuführen sein, dass ein Großteil der Studienteilnehmer eine gemeinsame genetische Abstammung aus einer portugiesischen Population besitzt. Somit kann für diese Kohorte eine größere genetische Homogenität als für die ESMI- oder EuroSCA-Kohorte angenommen werden, wodurch eine geringere – von der Anzahl der CAG-Wiederholungen unabhängige – Varianz des AAOs erklärt werden würde.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen also, wie schon zuvor in der Literatur beschrieben, dass nur knapp die Hälfte der Varianz des AAOs auf die CAG-Wiederholungsanzahl zurückgeführt werden kann. Demnach kommt die andere Hälfte der Varianz des AAOs durch den Einfluss anderer genetischer oder umweltbedingter Faktoren zustande. In einer *Genome-wide association study* (GWAS) wurden 2016 SNPs in DNA-Reparaturenzymen als genetische Modifikatoren des AAOs in PolyQ-Erkrankungen ausgemacht (Bettencourt et al., 2016). Als mögliche weitere genetische Modifikatoren wurden in dieser Arbeit SNPs im *ATXN3*- und dem *PARK2*-Gen untersucht.

4.2. Genotypen-Verteilung der *ATXN3*-SNPs

Im *ATXN3*-Gen wurden für diese Arbeit drei SNPs untersucht: SNP Bp 669 (rs1048755), SNP Bp 987 (rs12895357) und SNP Bp 1118 (rs7158733); (vgl. Abb. 4 und Tab. 1). Die drei SNPs wurden schon zuvor in der Literatur beschrieben (Gaspar et al., 2001, Maciel et al., 1999). *ATXN3*-SNPs sind in der SCA3-Forschung von besonderem Interesse. Zum einen stellen sie möglicherweise genetische Modifikatoren dar. Insbesondere dem SNP Bp 1118 könnte eine solche Rolle zukommen. Die Variante A codiert in der Aminosäuresequenz später für einen Stopcodon, was damit eine verkürzte *ATXN3*-Isoform zur Folge hat, und in Zellmodellen mit einer Aggravation der SCA3-Pathologie einhergeht (Weishaupl et al., 2019). Solche genetische Modifikatoren würden den Vorteil einer besseren genetischen Beratung, sowie einer Stratifizierung von Patienten für klinische Studien bieten (Lima and Raposo, 2018). Zum anderen könnten die SNPs für

künftige Therapieformen wie die ASO-Therapie und das siRNA-vermittelte *Gen-Silencing* relevant sein. Bei diesen Methoden werden mRNA-Produkte eines auszuschaltenden Gens von komplementären Nukleotidsequenzen spezifisch gebunden und enzymatisch gespalten, wodurch die Translation und die damit einhergehende Expression des Protein-Produkts supprimiert wird (Crooke, 2017, Hu et al., 2020). Für autosomal-dominant vererbte Erkrankungen, bei denen die Protein-Produkte des betroffenen Gens essenziell sind, besteht dabei die Herausforderung das mutierte Allel spezifisch auszuschalten, ohne die Expression des gesunden Allels zu supprimieren. Ein solches essenzielles Protein scheint z. B. das im Falle von Chorea Huntington mutierte Huntingtin zu sein (Dragatsis et al., 2000, Reiner et al., 2003). Vor diesem Hintergrund wurden Modelle für SNP-spezifisches *Gen-Silencing* entwickelt. Derartige Ansätze für das *ATXN3*-Gen stützen sich dabei hauptsächlich auf den SNP Bp 987. Dabei wird sich zunutze gemacht, dass bei den expandierten Allelen die Variante C⁹⁸⁷ dominiert, wogegen bei den nicht-expandierten Allelen der Haplotyp G⁹⁸⁷ überwiegt (Alves et al., 2008, Li et al., 2004, Miller et al., 2003). Allerdings weisen Mausmodelle darauf hin, dass es sich beim *ATXN3* um kein lebensnotwendiges Protein handelt (Schmitt et al., 2007, Switonski et al., 2011). Entsprechend ist nicht klar welchen Benefit ein SNP-spezifisches *Gen-Silencing* gegenüber dem normalen *Gen-Silencing* wirklich hätte. Jedoch schmälert dieser Umstand die Bedeutung der *ATXN3*-SNPs für die SCA3-Forschung nicht.

Für den SNP Bp 669 lagen in der ESMI-Kohorte nur die Genotypen für die jeweiligen Studienteilnehmer vor, weshalb keine Zuordnung der Haplotypen zum jeweiligen Allel erfolgen konnte. Dies ist darin begründet, dass der SNP Bp 669 auf dem Exon 8 im *ATXN3*-Gen liegt und somit sich unter anderem das Intron 9 mit einer Länge von über 9000 bp zwischen dem SNP und der CAG-Wiederholungssequenz auf Exon 10 befindet (Ichikawa et al., 2001). Darum sind DNA-basierte Bestimmungsmethoden, bei denen mittels PCR ein sowohl den SNP als auch die CAG-Wiederholungssequenz enthaltender DNA-Abschnitt vervielfältigt wird, aufgrund der Größe eines solchen PCR-Produkts, nicht durchführbar. Die Analyse erfolgte für den SNP Bp 669 also nicht allelspezifisch. Hierzu wären beispielsweise mRNA-basierte Methoden notwendig, um eine Amplifikation der

großen Intron-Bereiche zu umgehen.

In der statistischen Analyse ergab sich in der ESMI-Kohorte für den SNP Bp 669 eine höchst signifikante Abhängigkeit zwischen den Kontrollen, den Mutations-trägern und der jeweiligen Verteilung der Genotypen. Die berechnete Allelfrequenz zeigte für die Kontrollen ein Dominieren der Variante G ($f_G = 0,81$), während bei den Mutationsträger die Allelfrequenz ausgeglichen war ($f_G/f_A = 0,5$). Es ist davon auszugehen, dass das Zustandekommen dieser Ergebnisse darauf zurückzuführen ist, dass die expandierten Allele überwiegend den Haplotyp A tragen, wie es bereits in der Literatur von Gaspar et al. beschrieben ist. In dieser Studie wurde eine Haplotyp-Analyse der drei *ATXN3*-SNPs an einer großen, internationalen Kohorte durchgeführt (601 Mutationsträger und 388 Kontrollen aus Europa, Asien, Afrika, Nord- und Südamerika). Unter der Annahme, dass innerhalb der ESMI-Kohorte die Allelfrequenzen der nicht-expandierten Allele den Allelfrequenzen der Kontrollen entsprechen, würde sich für die expandierten Allele die berechneten Allelfrequenzen $f_G = 0,19$ und $f_A = 0,81$ ergeben. Dies wäre vergleichbar mit den von Gaspar et al. publizierten Allelfrequenzen für expandierten Allele (Tab.35), (Gaspar et al., 2001).

Bei den SNPs Bp 987 und Bp 1118 erlaubte die Bestimmungsmethode eine Aufteilung in allelspezifische Haplotypen. Dadurch konnte zwischen Allele der Kontrollen, nicht-expandierten Allelen und expandierten Allelen der Mutationsträger unterschieden werden. Bei den beiden SNPs dominierten die Varianten G^{987} und C^{1118} bei den Allelen der Kontrollen und den nicht-expandierten Allelen der Mutationsträger, während bei den expandierten Allelen der Mutationsträger die Haplotypen C^{987} und A^{1118} überwogen. Diese Ergebnisse entsprechen den von Gaspar et al. beschriebenen weltweiten Haplotyp-Verteilungen (Tab. 35), (Gaspar et al., 2001). Bestätigt werden diese Ergebnisse außerdem von Igashari et al., die in einer internationalen Kohorte (größtenteils aus Japan, West-Europa und China stammend) das Dominieren vom Haplotyp C^{987} bei den expandierten Allelen zeigen konnten, sowie von Goto et al., die für eine japanische Kohorte beschrieben, dass eine CAG-Expansion im *ATXN3*-Gen mit dem Haplotypen A^{1118} assoziiert ist (Goto et al., 1997, Igarashi et al., 1996).

Tabelle 35: Allelfrequenzen der ATXN3-SNPs in der ESMI-Kohorte und in der weltweiten Haplotypstudie von Gaspar et al. 2001

Allel-Gruppe	Allelfrequenzen			
	ESMI		Gaspar et al. 2001	
SNP Bp 669	f_G	f_A	f_G	f_A
Allele der Kontrollen	0,81	0,19	0,75	0,25
Allele der Mutationsträger (nicht-exp. und exp.)	0,5	0,5	-	-
exp. Allele der Mutationsträger	-	-	0,24	0,76
SNP Bp 987	f_G	f_C	f_G	f_C
Allele der Kontrollen	0,8	0,2	0,67	0,33
nicht-exp. Allele der Mutationsträger	0,72	0,28	-	-
exp. Allele der Mutationsträger	0,3	0,7	0,27	0,73
SNP Bp 1118	f_C	f_A	f_C	f_A
Allele der Kontrollen	0,8	0,2	0,76	0,24
nicht-exp. Allele der Mutationsträger	0,7	0,3	-	-
exp. Allele der Mutationsträger	0,29	0,71	0,22	0,76

Die statistischen Auswertungen für die ESMI-Kohorte untermauern, dass sich die Haplotypen-Verteilung der SNPs Bp 987 und Bp 1118 für die expandierten Allele der Mutationsträger signifikant von den Verteilungen der Allele der Kontrollen und der nicht-expandierten Allele der Mutationsträger unterscheiden.

Auch bei der kombinierten Betrachtung der Haplotypen unterscheiden sich die Verteilungen der nicht-expandierten und expandierten Allele der Mutationsträger signifikant. Diese kombinierte Betrachtung war aus den bereits beschriebenen methodischen Gründen nur für die SNPs Bp 987 und Bp 1118 und nur für die nicht-expandierten und expandierten Allele der Mutationsträger möglich. Hier zeigten 67 % der nicht-expandierten Allele die Kombination G^{987}/C^{1118} und 27 % C^{987}/A^{1118} (4 % $G^{987}A^{1118}$, 2 % $C^{987}C^{987}$), während 25 % der expandierten Allele die Variante G^{987}/C^{1118} und 67 % die Kombination C^{987}/A^{1118} trugen (4 % $G^{987}A^{1118}$, 4 % $C^{987}C^{987}$). Gaspar et al. beschreiben in ihrer Studie die Verteilung der kombinierten Haplotypen der drei ATXN3-SNPs Bp 669, Bp 987 und Bp 1118. Dabei zeigte sich, dass 70 % der expandierten Allele die Kombination $A^{669}C^{987}A^{1118}$ trugen (Gaspar et al., 2001). Auch wenn für die ESMI-Kohorte der SNP Bp 669 aus methodischen Gründen nicht in die kombinierte Betrachtung der Haplotypen miteingeschlossen werden konnte, so lassen die beschriebenen Ergebnisse der Allelfrequenzen des SNPs Bp 669 vermuten, dass eine solche kombinierte Betrachtung aller drei SNPs in der ESMI-Kohorte zu vergleichbaren

Ergebnissen führen würde. Die Resultate der ESMI-Kohorte bestätigen also die bereits publizierten Beobachtungen, dass die expandierten Allele mit Haplotypen A^{669} , C^{987} und A^{1118} der *ATXN3*-SNPs assoziiert sind. Diese Verteilungsverzerrung ist am ehesten auf den Effekt von Gründermutationen zurückzuführen, welche für die SCA3 vermutet werden. Es werden Gründermutationen in einer portugiesischen Population und in Asien angenommen, welche sich anschließend über die Welt verbreiteten, was die beschriebenen Verteilungsverzerrung erklären würde (Martins et al., 2007). Für die portugiesische Population wurden dabei von Gaspar et al. zwei verschiedene Mutationsereignisse diskutiert. Dies liegt darin begründet, dass sich in ihrer weltweiten Haplotyp-Studie für die portugiesisch-azoreanische Teilkohorte ein ausgeglichenes Verhältnis der Haplotyp-Kombinationen $A^{669}C^{987}A^{1118}$ und $G^{669}G^{987}C^{1118}$ bei den expandierten Allelen zeigte (Gaspar et al., 2001). Maciel et al. konnten für eine portugiesisch-azoreanische Kohorte ebenfalls eine ausgewogene Verteilung zwischen diesen beiden Haplotyp-Kombinationen nachweisen (Maciel et al., 1999). In der ESMI-Kohorte spiegelten sich diese Beobachtungen ebenfalls wider. Die kombinierte Betrachtung der *ATXN3*-SNPs Bp 987 und Bp 1118 ergab hier für die portugiesisch-azoreanische Kohorte ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen den Varianten $C^{987}A^{1118}$ und $G^{987}C^{1118}$ (Tab.36). Bei den Verteilungen der SNPs Bp 987 und Bp 1118 auf den expandierten Allelen unterscheiden sich dabei die portugiesische Kohorte bildenden Einzelkohorten aus Coimbra und von den Azoren nicht signifikant. Diese Ergebnisse bestätigen also die beschriebenen Beobachtungen, dass sich sowohl auf dem portugiesischen Festland als auch auf den Azoren für die expandierten Allele ein, durch zwei unterschiedliche Gründermutationen hervorgerufenen, zweigeteiltes Haplotypen-Verteilungsmuster zeigt. Ob sich dabei beide Gründermutationensereignisse in einer portugiesischen Population ereigneten oder eine der Mutationen von außen in eine portugiesische Population hineingebracht wurde, ist unklar. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung von Gaspar et al., dass bei Betrachtung der einzelnen azoreanischen Inseln unterschiedliche Haplotyp-Kombinationen dominieren. So waren auf der Insel Flores die expandierten Allele fast ausschließlich mit der Haplotyp-Kombination $A^{669}C^{987}A^{1118}$, dagegen auf der Insel Sao Miguel mit der Variante

$G^{669}G^{987}C^{1118}$ assoziiert (Gaspar et al., 2001). Hier wäre es aufschlussreich, auch für die ESMI-Kohorte die einzelnen azoreanischen Inseln separiert zu untersuchen. Leider lagen für diese Arbeit nicht die notwendigen Daten über die genauen Herkunftsinself der azoreanischen Studienteilnehmer vor.

Auffällig war bei der Betrachtung der Allelfrequenzen der kombinierten Haplotypen der *ATXN3*-SNPs Bp 987 und Bp 1118 weiterhin, dass in der deutschen und der niederländischen Kohorte mit nur einer Ausnahme (in der niederländischen Kohorte) alle expandierten Allele die Variante $C^{987}A^{1118}$ trugen (Tab. 36). Dazu entsprechend zeigen in der weltweiten Haplotyp-Studie von Gaspar et al. neun untersuchte deutsche und eine niederländische SCA3-Familie ausschließlich die Haplotypen-Kombination $A^{669}C^{987}A^{1118}$ auf den expandierten Allelen (Gaspar et al., 2001). Es scheint also, dass die deutschen und niederländischen SCA3-Fälle auf eine Gründermutation zurückgeführt werden können, die in diese Populationen hineingebracht wurde. Die Ausnahme des niederländischen Studienteilnehmers in der ESMI-Kohorte, der die Variante $G^{987}A^{1118}$ auf dem expandierten Allel trägt, wäre unter Annahme dieser Hypothese mit einer De-novo-Mutation an Bp-Position 987 zu erklären.

Tabelle 36: Allelfrequenz der kombinierten Haplotypen der *ATXN3*-SNPs Bp 987 und Bp 1118 für die expandierten Allele in der ESMI-Kohorte

Kohorte	Allelfrequenzen der kombinierten Haplotypen			
	$C^{987}A^{1118}$	$G^{987}C^{1118}$	$G^{987}A^{1118}$	$C^{987}C^{1118}$
Deutschland	1,0	0	0	0
Niederlande	0,95	0	0,05	0
Großbritannien	0,66	0,19	0,15	0
Portugal	0,49	0,42	0,01	0,08

Eine weitere Auffälligkeit in der niederländischen Kohorte ergab sich für den *ATXN3*-SNP Bp 669. Hier wiesen 83 % der Allele der Kontrollen den Haplotyp A auf. Allerdings betrug die Stichprobengröße in diesem Fall lediglich sechs Studienteilnehmer, weswegen aus dieser Abweichung keine induktive Schlussfolgerung gezogen werden kann. Es wäre bei einer so geringen Stichprobengröße z. B. möglich, dass die niederländischen Kontrollen zum Großteil aus Mitgliedern

derselben Familie bestehen und somit diese abweichende Genotypen-Verteilung zu Stande kommt.

Bei den *ATXN3*-SNPs Bp 987 und Bp 1118 zeigte sich für die portugiesische Kohorte, dass sich die jeweiligen Haplotypen-Verteilungen der Allele der Kontrollen und der nicht-expandierten Allele der Mutationsträger signifikant unterscheiden. Da alle portugiesischen Kontrollen aus Coimbra stammten, wurde die portugiesische Teilkohorte aus Coimbra separat untersucht. Auch hier ergab sich die gleiche Verteilungsverzerrung zwischen Allelen der Kontrollen und nicht-expandierten Allelen der Mutationsträger. Diese Verteilungsverzerrung könnte am ehesten darauf zurückzuführen sein, dass die Gruppe der Kontrollen aus Coimbra keine repräsentative Stichprobe darstellt. Man kann auch hier die Hypothese aufstellen, dass es sich womöglich bei einem größeren Anteil der Kontrollen um miteinander verwandte Personen handeln könnte. In jedem Fall sollte diese Verteilungsverzerrung, nach Rekrutierung von weiteren Studienteilnehmern am ESMI-Zentrum Coimbra, erneut untersucht werden.

4.3. Korrelation der *ATXN3*-Genotypen mit klinischen *SCA3*-Daten und den L-*ATXN3*-Leveln

Die Ergebnisse einer Studie von Stevanin et al. zeigen für eine internationale Kohorte (zu 80 % aus Frankreich und Portugal stammend), dass der Haplotyp C⁹⁸⁷A¹¹¹⁸ nicht nur mit den expandierten Allelen assoziiert ist, sondern auch die nicht-expandierten Allele mit besonders großer CAG-Wiederholungsanzahl überwiegend diesen Haplotyp tragen (Stevanin et al., 1997). Zudem konnten Matsuura et al. für eine japanische Kohorte nachweisen, dass in den nicht-expandierten Allelen die Variante C⁹⁸⁷ mit einer signifikant größeren CAG-Wiederholungsanzahl als die Variante G⁹⁸⁷ assoziiert ist. Das Vorliegen dieses Zusammenhanges wurde auch für die ESMI-Kohorte untersucht. Dabei wurden für die SNPs Bp 987 und Bp 1118 jeweils die CAG-Wiederholungsanzahlen zwischen den SNP-Varianten verglichen. Es ergaben sich signifikant größere CAG-Wiederholungsanzahlen in den nicht-expandierten Allelen für die Varianten C⁹⁸⁷ und A¹¹¹⁸. Damit bestätigen die Ergebnisse der ESMI-Kohorte die beschriebenen Daten aus der Literatur und unterstützen damit die Hypothese, dass De-novo-

Mutationen aus nicht-expandierten Allelen mit großer CAG-Wiederholungsanzahl hervorgehen. Durch die Assoziation dieser Allele mit den Haplotypen C⁹⁸⁷ und A¹¹¹⁸ könnten die De-novo-Mutationen zur Verteilungsverzerrung der Haplotypen bei den expandierten Allelen beitragen (Stevanin et al., 1997). Eine solche De-novo-Mutation aus Allelen mit besonders großer CAG-Wiederholungsanzahl konnte für Chorea Huntington beobachtet werden. Hierbei wurde nachgewiesen, dass das gleiche Allel, wie das bei Patienten mit einer Neumutation im *Huntingtin*-Gen mutierte Allel, überproportional häufig bei Verwandten der Patienten mit einem sehr großen, nicht-expandierten CAG-Bereich auf dem *Huntingtin*-Gen einhergeht (Myers et al., 1993). Im Falle der SCA3 spricht jedoch gegen diese Hypothese, dass weder für den SNP Bp 987 noch für den SNP Bp 1118 ein signifikanter Einfluss in cis auf die intergenerationale Instabilität nachgewiesen werden konnte. Dies wäre aber bei Zutreffen der Hypothese zu erwarten (Maciel et al., 1999).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die *ATXN3*-SNPs außerdem auf einen möglichen krankheitsmodifizierenden Einfluss auf die SCA3 untersucht. Long et al. konnten im Jahr 2015 in einer chinesischen Kohorte zeigen, dass zwei SNPs in dem 3' untranslatierten Bereich des *ATXN3*-Gens einen Einfluss auf das AAO von SCA3-Patienten haben. Die Haplotypen der beiden SNPs erklärten 2 % der von der Anzahl der CAG-Wiederholungen unabhängige AAO-Varianz und verringerten das AAO in Abhängigkeit der Haplotypen im Mittel um 4 Jahre (Long et al., 2015). Für die ESMI-Kohorte wurde ein vergleichbarer Einfluss der drei *ATXN3*-SNPs Bp 669, Bp 987 und Bp 1118 auf den Krankheitsverlauf überprüft. Dazu wurden AAO und CSDP zwischen den jeweiligen Geno-/Haplotyp-Trägern verglichen. Es ergab sich aber für keinen der drei untersuchten *ATXN3*-SNPs ein statistischer Zusammenhang zwischen den Geno-/Haplotypen und dem AAO oder der CSDP. Somit liefert die ESMI-Kohorte keinen Hinweis für eine Rolle der drei SNPs als genetische Krankheitsmodifikatoren. In den Studien von Gaspar et al. und Maciel et al. war ein krankheitsmodifizierender Effekt der *ATXN3*-SNPs nicht untersucht worden (Gaspar et al., 2001, Maciel et al., 1999).

Eine weitere Frage, die in dieser Arbeit Betrachtung fand, war ob einzelne Geno-/Haplotypen der untersuchten *ATXN3*-SNPs einen Einfluss auf die L-*ATXN3*-

Level haben. Der SNP Bp 1118 führt zu einem vorzeitigen Stopcodon und damit zur Synthese einer verkürzten ATXN3-Isoform. Diese Isoform zeigte im Zellmodell eine veränderte Interaktion mit anderen Proteinen sowie eine veränderte Stabilität, unabhängig davon ob eine Expansion des PolyQ-Bereichs vorlag (Weishaupl et al., 2019). Zudem ist für den SNP Bp 987 eine Veränderung der Transkriptstruktur in Abhängigkeit des Haplotyps beschrieben (Michlewski and Krzyzosiak, 2004). Es lässt sich also die Hypothese aufstellen, dass die verschiedenen Geno-/Haplotypen der *ATXN3*-SNPs mit unterschiedlichen L-ATXN3-Level der Proteine mit expandiertem PolyQ-Bereich einhergehen. Den L-ATXN3-Leveln lagen Messungen mittels TR-FRET zugrunde. Dabei binden zwei fluoreszenzmarkierte Antikörper an das Protein, wodurch es zu einem Energietransfer zwischen den Antikörpern kommt, der wiederum das Abgeben eines Energiesignals induziert. Dieses kann dann proportional zur Proteinmenge detektiert werden. Die verwendeten Antikörper binden zum einen N-terminal des PolyQ-Bereichs und zum anderen an PolyQ-Bereichen mit > 37 Glutamine. Im Rahmen dieser Messmethode werden damit alle ATXN3-Isoformen mit expandiertem PolyQ-Bereich detektiert. In der ESMI-Kohorte waren für die verschiedenen Geno-/Haplotypen der *ATXN3*-SNPs keine unterschiedlichen L-ATXN3-Level nachweisbar. Dies scheint nahezu legen, dass die SNPs keinen wesentlichen Einfluss auf das Level der expandierten ATXN3-Proteine haben. Allerdings könnte hierbei auch der Umstand, dass die Messmethode alle ATXN3-Isoformen abdeckt als mögliche Erklärung herangezogen werden. Ein erniedrigtes bzw. erhöhtes Level einer einzelnen Isoform könnte sich der Nachweisbarkeit dieser Messmethode entziehen. Um dies zu umgehen, müssten Assays mit Isoformen-spezifischen Antikörpern entwickelt werden.

4.4. Verteilung der *PARK2*-Genotypen und Korrelation mit klinischen SCA3-Daten und den L-ATXN3-Leveln

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Verteilung dreier *PARK2*-SNPs und deren Korrelation mit klinischen SCA3-Daten untersucht. Es handelte sich dabei um die SNPs Bp 601 (rs1801474), Bp 1239 (rs1891582) und Bp 1281 (rs1801334); (vgl. Abb. 4 und Tab. 1). Das durch das *PARK2*-Gen codierte Parkin-Protein

interagiert mit dem ATXN3-Protein. Parkin bindet mit dem N- an den C-Terminus und mit dem C- an den N-Terminus des ATXN3-Proteins. Dabei wird Parkin indirekt deubiquitiniert, indem die mit Parkin interagierende E2-Konjugase an ATXN3 bindet und das Ubiquitin statt auf das Parkin-Protein auf ATXN3 transferiert wird. Diese indirekte Deubiquitinierung führt zur Degradation von Parkin und wird durch einen expandierten PolyQ-Bereich des ATXN3-Proteins verstärkt (Durcan et al., 2012, Durcan et al., 2011). Bemerkenswerterweise zeigen manche SCA3-Patienten einen phänotypischen Parkinsonismus (Durr et al., 1996, Tuite et al., 1995). Außerdem scheint Parkin wiederum umgekehrt in den Abbau von Proteinen mit expandiertem PolyQ-Bereich involviert zu sein. Im Zellmodell führt eine Überexpression von Parkin zu einer reduzierten Aggregation und Zytotoxizität von expandierten ATXN3-Protein-Fragmenten (Tsai et al., 2003). Aufgrund dieser Interaktionen kommen Genotypen der *PARK2*-SNPs als genetische Modifikatoren der SCA3 in Betracht. In der nicht veröffentlichten Diplomarbeit von Dr. rer. nat. Jonasz J. Weber konnte für den *PARK2*-SNP Bp 1239 eine krankheitsmodifizierende Rolle identifiziert werden. Der Genotyp C/C war dabei mit einem 3 Jahre jüngeren AAO assoziiert (unveröffentlichte Diplomarbeit Jonasz J. Weber).

Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse wurde eine krankheitsmodifizierende Rolle der *PARK2*-Genotypen auch in der ESMI-Kohorte überprüft. Dabei wurden zunächst die Verteilungen der *PARK2*-Genotypen in der ESMI-Kohorte betrachtet. Diese entsprachen den in der Literatur berichteten Verteilungsmuster für zwei europäische Kontroll-Kohorten aus Studien zum Morbus Parkinson bzw. zur Progressiven supranukleären Blickparese (Tab. 37), (Lucking et al., 2003, Ros et al., 2008). Beim SNP Bp 1281 fiel auf, dass nur in der azoreanischen Kohorte der Genotyp G/A auftrat, während in der restlichen ESMI-Kohorte sämtliche analysierten Allele den Genotyp G/G zeigten. Der Unterschied der Genotypen-Verteilung zwischen der azoreanischen Kohorte und der ESMI-Kohorte war nur knapp über dem Signifikanzniveau ($p = 0,0569$). Die in der Literatur gezeigten Daten für europäische Kohorten entsprechen der azoreanischen Verteilung und nicht der komplett monomorphen Verteilung in der restlichen ESMI-Kohorte (Lucking et al., 2003, Ros et al., 2008). Dabei ist zu beachten, dass aufgrund der monomorphen

Verteilung nur 56 Genotypen aus den nicht-azoreanischen Teilkohorten bestimmt wurden. Es wäre vorstellbar, dass sich bei Fortführen der Genotypisierung eine Angleichung der Verteilung in der nicht-azoreanischen Kohorte an die publizierten Daten ergibt. Tatsächlich weisen inzwischen zusätzlich analysierte ESMI-Proben aus der nicht-azoreanischen Kohorte keine monomorphe Verteilung auf (persönliche Kommunikation Kerstin Geiger).

Tabelle 37: Verteilung der Genotypen der PARK2-SNPs in der ESMI-Kohorte und in europäischen Kohorten aus der Literatur

SNP	Genotyp	ESMI-Kohorte	Literatur	
Bp 601	G/G	93 %	96-97 %	(Lücking et al., 2003, Ros et al., 2008)
	G/A	6 %	3-4 %	
	A/A	1 %	0 %	
Bp 1239	G/G	74 %	60-62 %	(Lücking et al., 2003, Ros et al., 2008)
	G/C	22 %	22-32 %	
	C/C	4 %	6-16 %	
Bp 1281	G/G	96 %	90-96 %	(Lücking et al., 2003, Ros et al., 2008)
	G/A	4 %	4-10 %	

Für die britische ESMI-Teilkohorte zeigte sich beim SNP Bp 1239, dass sich die Genotypen-Verteilung signifikant zwischen den Kontrollen und den Mutationsträgern unterscheidet. Dieser Unterschied entstand durch einen auffallend hohen Anteil des Genotypen G/C bei den Mutationsträgern (41 %). Da sich das *ATXN3*- und das *PARK2*-Gen auf unterschiedlichen Chromosomen befinden, kann nicht von einer konservierten gekoppelten Vererbung dieses Genotyps mit den expandierten *ATXN3*-Allelen ausgegangen werden. Die Beobachtung könnte aber darauf zurückgeführt werden, dass sich unter den britischen Mutationsträgern eine gewisse Anzahl verwandter Personen aus derselben Familie befinden. Eine hohe Verbreitung des G/C-Genotyps in einer solchen Familie könnte zu dem auffallend hohen Anteil dieses Genotyps in der britischen Kohorte führen.

Aufgrund der sehr monomorphen Verteilung des SNPs Bp 1281, wurden nur die Genotypen der SNPs Bp 601 und Bp 1239 auf eine Rolle als genetische Krankheitsmodifikatoren der SCA3 geprüft. Für beide SNPs wurde jeweils untersucht, ob die verschiedenen Genotypen mit unterschiedlichem AAO bzw. CSDP assoziiert waren. Dabei konnte weder für den SNP Bp 601 noch für den SNP Bp 1239 ein statistisch signifikanter Unterschied in AAO oder CSDP zwischen den

Genotypen nachgewiesen werden. Die zuvor beschriebenen Ergebnisse aus der Diplomarbeit von Dr. rer. nat. Jonasz J. Weber konnten damit für die ESMI-Kohorte nicht reproduziert werden. Zudem konnte auch kein Einfluss der Genotypen der SNPs Bp 601 und Bp 1239 auf das Level des expandierten L-ATXN3-Proteins nachgewiesen werden. Das Parkin-Protein spielt eine Rolle im Abbau von Proteinen mit expandiertem PolyQ-Bereich (Tsai et al., 2003), den Ergebnissen dieser Arbeit zufolge aber haben die untersuchten Genotypen der *PARK2*-SNPs dabei keinen modifizierenden Einfluss auf die Abbauprozesse in dem Maße, dass sich dieser in veränderten L-ATXN3-Level oder gar in einem veränderten Krankheitsverlauf messen lassen würde. Ein Ansatz, um möglicherweise dennoch einen Einfluss der unterschiedlichen Genotypen der *PARK2*-SNPs auf die Interaktion zwischen Parkin und ATXN3 zu detektieren, wäre die Messung der Ubiquitinierung beider Proteine oder der Parkin-Protein-Level. Durch die indirekte Deubiquitinierung des Parkins mittels transienter Ubiquitinierung des ATXN3, könnte sich eine veränderte Interaktion der beiden Proteine in Abhängigkeit der *PARK2*-SNPs in veränderter Ubiquitinierung von Parkin und ATXN3 und damit einhergehenden Veränderungen des Parkin-Protein-Levels widerspiegeln. Allerdings stellt sich mit Blick auf die Ergebnisse dieser Arbeit, welche keine Assoziationen von *PARK2*-Genotypen zu klinischen SCA3-Daten und L-ATXN3-Leveln ergaben, die Frage, inwieweit sich aus - auf diesem Weg gemessenen - potenziellen Unterschieden in der Interaktion der beiden Proteine relevante Implikationen für die SCA3-Forschung ableiten lassen würden. Womöglich könnte es ein effektiverer Ansatz sein, SCA3-Patienten mit phänotypischem Parkinsonismus herauszufiltern und für diese Teilkohorte die Genotypen-Verteilung der *PARK2*-SNPs, die L-ATXN3-Level und gegebenenfalls die Parkin-Protein-Level zu bestimmen und mit den Daten für die SCA3-Patienten ohne phänotypischen Parkinsonismus zu vergleichen.

4.5. L-ATXN3-Level als molekularer Biomarker für die SCA3

Biomarker können in der Medizin sehr unterschiedliche Funktionen erfüllen: Sie können der Diagnose- und Prognosestellung, der Erfassung der Krankheitsprogression oder der Erfolgskontrolle von therapeutischen Interventionen dienen

(Biomarkers Definitions Working, 2001). Für die SCA3 steht mit der Bestimmung der CAG-Wiederholungsanzahl im *ATXN3*-Gen ein gut etablierter diagnostischer Biomarker zur Verfügung (Maciel et al., 2001). Zur Erfassung der Krankheitsprogression und der Erfolgskontrolle von therapeutischen Interventionen werden derzeit hauptsächlich klinische Bewertungsskalen verwendet. Da diese jedoch einer nicht zu vermeidenden Subjektivität unterliegen, wenig sensitiv für Änderungen in der Krankheitsprogression sind und zudem keine Erfassung von präataktischen Mutationsträgern ermöglichen, werden andere (molekulare) Biomarker für die Erforschung der SCA3 benötigt (Lima and Raposo, 2018, Weir et al., 2011). In dieser Arbeit wurde die mögliche Rolle des Protein-Levels des expandierten L-*ATXN3* als molekularer Biomarker in der SCA3 untersucht. Die L-*ATXN3*-Level wurden in PBMC-Homogenaten mittels TR-FRET-Assay bestimmt, wobei die Antikörper spezifisch an *ATXN3*-Proteine mit einem PolyQ-Bereich > 37 Glutaminen banden. In den statistischen Analysen ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den L-*ATXN3*-Level der nicht-ataktischen und der ataktischen Mutationsträger. Außerdem konnte keine Korrelation zwischen dem SARA-Score und den L-*ATXN3*-Level nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse liefern also keinen Hinweis, dass das im PBMC-Homogenat gemessene L-*ATXN3*-Level ein geeigneter molekularer Biomarker für die Erfassung der Krankheitsprogression darstellt. In einem Mausmodell konnte ein Rückgang der L-*ATXN3*-Level in lysierten Kleinhirnzellen im Krankheitsverlauf beobachtet werden. Der Rückgang war dabei invers mit der Zunahme den *ATXN3*-Aggregaten korreliert (Nguyen et al., 2013). Eine Abnahme des L-*ATXN3*-Levels im Krankheitsverlauf scheint also in direktem Zusammenhang mit der Bildung von Aggregaten zu stehen. Die *ATXN3*-Aggregation in SCA3 ist aber ein für Neuronen zellspezifischer Prozess (Paulson et al., 1997). Dies wäre eine mögliche Erklärung dafür, dass die in dieser Studie in PBMC-Homogenat gemessenen L-*ATXN3*-Level keiner Korrelation mit dem Krankheitsverlauf unterliegen. Allerdings konnten Gonsior et al. eine Korrelation des in PBMC-Homogenaten gemessenen L-*ATXN3*-Levels mit dem Krankheitsverlauf für eine europäische Kohorte (24 ataktische SCA3-Patienten) nachweisen (Gonsior et al., 2020). Zudem konnten Prudencio et al. zeigen, dass sowohl die im Plasma als auch die im Liquor

gemessenen Konzentrationen der expandierten ATXN3-Proteine sich zwischen symptomatischen SCA3-Patienten und präsymptomatischen Mutationsträgern signifikant unterscheiden (Prudencio et al., 2020). Die Eignung der L-ATXN3-Level als Biomarker des Krankheitsverlaufes bedarf also einer weiteren Evaluierung.

Unabhängig davon ist es vorstellbar, dass das L-ATXN3-Level in zukünftigen Studien zu bestimmten therapeutischen Interventionen, bei denen die Expression des expandierten ATXN3 gehemmt oder der Abbau desselben gefördert wird, als Surrogatparameter dienen kann. Menzies et al. verwendeten beispielsweise L-ATXN3-Level als Biomarker in einem Mausmodell, in welchem mittels mTOR-Inhibitoren die ATXN3-Level reduziert wurden (Menzies et al., 2010).

4.6. Fazit und Ausblick

Bei seltenen Erkrankungen wie der SCA3 stellt es eine Herausforderung dar, für Therapie- oder Biomarkerstudien, ausreichend große Kohorten zu rekrutieren, weshalb multizentrische Kohorten benötigt werden (Furtado et al., 2019, Saute and Jardim, 2018). Eine solche multizentrische Kohorte stellt die aus sechs Einzelkohorten bestehende ESMI-Kohorte dar. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es sich bei der ESMI-Kohorte bezüglich demographischer und klinischer Daten um eine sehr homogene Kohorte handelt, die sich damit gut für künftige Studien eignet. In der weiteren Rekrutierungsstrategie des ESMI-Projektes sollte ein besonderes Augenmerk auf präataktische und mild betroffene ataktische Patienten gelegt werden, da diese Gruppe für die Erforschung neuer Therapieansätze besonders interessant ist und in der zum aktuellen Zeitpunkt bestehenden ESMI-Kohorte noch nicht in ausreichender Zahl vertreten ist.

Bei der Analyse der drei *ATXN3*-SNPs Bp 669, Bp 987 und Bp 1118 konnte gezeigt werden, dass es einen deutlichen Unterschied in der Geno-/Haplotypen-Verteilung gab, zwischen Kontrollen und Mutationsträger bzw. nicht-expandierten und expandierten Allelen gab. Dieser Umstand, der auf Gründermutationen zurückzuführen ist, besitzt insbesondere für die Erforschung SNP-sensitiver *Gen-Silencing*-Methoden eine große Relevanz (Alves et al., 2008, Li et al., 2004). Bei dem SNP Bp 669 konnte in dieser Arbeit aus methodischen Gründen keine

Zuordnung der einzelnen Haplotypen zu den Allelen erfolgen. Dadurch war auch keine kombinierte Betrachtung der drei Haplotypen möglich, wie sie bereits in der Literatur beschrieben wurde (Gaspar et al., 2001). Um dies für die ESMI-Kohorte ebenfalls durchführen zu können, müssten die Haplotypen des SNP Bp 669 mit einer anderen – z. B. mRNA-basierten – Methode bestimmt werden.

Zudem wäre es interessant, die Studienteilnehmer der azoreanischen ESMI-Teilkohorte nach ihren Herkunftsinself aufzuteilen und die Haplotypen-Verteilungen der *ATXN3*-SNPs auf den einzelnen azoreanischen Inseln zu betrachten. Eine solche Analyse könnte insbesondere hinsichtlich der Herkunft und Ausbreitung von Gründermutationen wichtige Informationen liefern.

Die Hypothese, dass die *ATXN3*-SNPs genetische Modifikatoren der SCA3 darstellen, konnte durch die Ergebnisse dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Verschiedene Geno-/Haplotypen waren nicht mit signifikant unterschiedlichen klinischen Parametern (*SARA-Score*, AAO) assoziiert. Auch für die untersuchten *PARK2*-SNPs war keine krankheitsmodifizierende Rolle nachweisbar. Als genetische Modifikatoren der SCA3 wurden bereits SNPs in den Genen von DNA-Reparaturenzymen und im 3' untranslatierten Bereich des *ATXN3*-Gens beschrieben (Bettencourt et al., 2016, Long et al., 2015). Die Identifikation von genetischen Modifikatoren bleibt auch weiterhin ein wichtiger Aspekt der SCA3-Forschung, um eine Verbesserung der genetischen Beratung, sowie die Möglichkeit einer optimierten Stratifizierung von Patienten für künftige Studien zu erwirken (Lima and Raposo, 2018).

Im Falle der *PARK2*-SNPs, bei denen sich ebenfalls keine Unterschiede in klinischen Parametern zwischen den verschiedenen Genotypen ergaben, wäre es interessant, die Genotypen-Verteilungen gesondert für Patienten mit einem phänotypischen Parkinsonismus zu betrachten. Hypothetisch könnten bestimmte Genotypen des *PARK2* für eine veränderte Interaktion zwischen Parkin und *ATXN3* und einem daraus resultierenden Parkinsonismus verantwortlich sein.

Die Untersuchung des L-*ATXN3*-Level als molekularer Biomarker in dieser Arbeit ergab keine Korrelation mit der klinischen Krankheitsprogression und konnte damit bereits publizierte gegensätzliche Ergebnisse nicht unterstützen (Gonsior et al., 2020, Prudencio et al., 2020). Der mögliche Zusammenhang zwischen

Krankheitsprogression und L-ATXN3-Level sollte also weiterhin evaluiert werden. Davon unabhängig könnte das L-ATXN3-Level in speziellen therapeutischen Ansätzen, die die Expression des expandierten ATXN3-Proteins supprimieren eine Rolle als nützlicher Marker für das Therapieansprechen spielen. Die Suche und Evaluation von molekularen Biomarkern für die Krankheitsprogression stellen also auch in Zukunft wichtige Aufgaben der SCA3-Forschung dar. Unter anderem für solche künftigen Biomarkerstudien steht mit der ESMI-Kohorte eine homogene, multizentrische SCA3-Kohorte zur Verfügung.

5. Zusammenfassung

Die Spinocerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3) ist eine seltene autosomal dominant vererbte neurodegenerative Erkrankung, bei der es im *Ataxin-3*-Gen (*ATXN3*) zu einer Expansion einer CAG-Wiederholungssequenz kommt. Daraus folgt im Proteinprodukt Ataxin-3 (*ATXN3*) ein verlängerter Polyglutaminbereich, was zur Proteinaggregation in Neuronen und einem damit einhergehenden Untergang der Neuronen führt. Das Protein Parkin, welches durch das *PARK2*-Gen codiert wird, interagiert unter physiologischen Bedingungen mit dem *ATXN3*-Protein. Zum einen ubiquitiniert Parkin *ATXN3*, zum anderen ist Parkin am Abbau von Proteinen mit expandiertem Polyglutamin-Bereich beteiligt. Zum aktuellen Zeitpunkt existiert für die SCA3 keine kurative Therapiemöglichkeit. Klinische Bewertungsskalen wie z. B. der *SARA-Score* stellen dabei derzeit die Methode der Wahl zur Einschätzung des Krankheitsstadiums und -verlaufs dar. Für die weitere Erforschung der SCA3 werden große, multizentrische Kohorten, sowie sensitive Biomarker, die die Krankheitsprogression – auch bereits der präsymptomatischen/präataktischen Mutationsträger – abbilden, benötigt. Eine europäische multizentrische Kohorte stellt die *European Spinocerebellar Ataxia Type 3/Machado-Joseph Disease Initiative* (ESMI) zur Verfügung. Die rekrutierten Probanden stammen dabei aus Deutschland, den Niederlanden, Großbritannien und Portugal. In dieser Arbeit wurde die ESMI-Kohorte einer Kohortenanalyse unterzogen. Zum Zeitpunkt der Auswertung umfasste die ESMI-Kohorte 308 Studienteilnehmer, wovon 79 gesunde Kontrollen, 190 ataktische und 39 nicht-ataktische Mutationsträger waren. Die Kohortenanalyse ergab, dass die ESMI-Kohorte hinsichtlich demographischer (Geschlecht, Alter) und klinischer (*Age at onset* (AAO), *SARA-Score*, *Cross-sectional Disease Progression* (CSDP)) Daten eine sehr homogene Kohorte darstellt. Außerdem wurde die Verteilung jeweils dreier Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) im *ATXN3*- (Bp 669, Bp 987, Bp 1118) und *PARK2*-Gen (Bp 601, Bp 1239, Bp 1281) untersucht. Die SNPs wurden dabei mit Fragmentlängenanalyse mittels spezifischer Primer, Sanger-Sequenzierung und Restriktionsfragmentlängenanalyse bestimmt. Bei allen drei *ATXN3*-SNPs zeigte sich zwischen den Kontrollen und den Mutationsträgern bzw. den nicht-expandierten und expandierten Allelen der Mutationsträger

signifikant unterschiedliche Verteilungen, was auf Gründermutationen in der Entstehungs- und Ausbreitungsgeschichte der SCA3 zurückzuführen ist. Aufgrund des Verteilungsungleichgewichts der Haplotypen zwischen nicht-expandierten und expandierten Allelen könnten, die *ATXN3*-SNPs eine wichtige Rolle in Therapieansätzen mit allelspezifischem Gen-*Silencing* spielen. Ein Hinweis für einen krankheitsmodifizierenden Effekt von bestimmten Geno-/Haplotypen konnte in dieser Arbeit nicht entdeckt werden. Zwischen den verschiedenen Geno-/Haplotypen gab es keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des klinischen Krankheitsverlaufs gemessen am AAO und der CSDP. Auch konnte kein Einfluss der Geno-/Haplotypen auf das Level des expandierten löslichen ATXN3-Proteins (L-ATXN3) nachgewiesen werden. Für die untersuchten *PARK2*-SNPs ergab sich weder ein Verteilungsungleichgewicht zwischen Mutationsträger und Kontrollen in der ESMI-Kohorte, noch ein in AAO oder CSDP messbaren Einfluss bestimmter Genotypen auf den klinischen Krankheitsverlauf. Ein modifizierender Effekt der verschiedenen Genotypen auf die L-ATXN3-Level konnten ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Für die Zukunft wäre eine genauere Untersuchung der *PARK2*-SNPs bei SCA3-Patienten mit dem klinischen Phänotyp eines Parkinsonismus ein interessanter Ansatzpunkt in der SCA3-Forschung.

Literaturverzeichnis

- ADANYEGUH, I. M., PERLBARG, V., HENRY, P. G., RINALDI, D., PETIT, E., VALABREGUE, R., BRICE, A., DURR, A. & MOCHEL, F. 2018. Autosomal dominant cerebellar ataxias: Imaging biomarkers with high effect sizes. *Neuroimage Clin*, 19, 858-867.
- AKÇIMEN, F., MARTINS, S., LIAO, C., BOURASSA, C. V., CATOIRE, H., NICHOLSON, G. A., RIESS, O., RAPOSO, M., FRANÇA, M. C., VASCONCELOS, J., LIMA, M., LOPES-CENDES, I., SARAIVA-PEREIRA, M. L., JARDIM, L. B., SEQUEIROS, J., DION, P. A. & ROULEAU, G. A. 2020. Genome-wide association study identifies genetic factors that modify age at onset in Machado-Joseph disease. *Aging (Albany NY)*, 12, 4742-4756.
- ALVES, S., NASCIMENTO-FERREIRA, I., AUREGAN, G., HASSIG, R., DUFOUR, N., BROUILLET, E., PEDROSO DE LIMA, M. C., HANTRAYE, P., PEREIRA DE ALMEIDA, L. & DEGLON, N. 2008. Allele-specific RNA silencing of mutant ataxin-3 mediates neuroprotection in a rat model of Machado-Joseph disease. *PLoS One*, 3, e3341.
- ANTONY, P. M., MANTELE, S., MOLLENKOPF, P., BOY, J., KEHLENBACH, R. H., RIESS, O. & SCHMIDT, T. 2009. Identification and functional dissection of localization signals within ataxin-3. *Neurobiol Dis*, 36, 280-92.
- ARAUJO, J., BREUER, P., DIERINGER, S., KRAUSS, S., DORN, S., ZIMMERMANN, K., PFEIFER, A., KLOCKGETHER, T., WUELLNER, U. & EVERT, B. O. 2011. FOXO4-dependent upregulation of superoxide dismutase-2 in response to oxidative stress is impaired in spinocerebellar ataxia type 3. *Hum Mol Genet*, 20, 2928-41.
- ARONSON, J. K. 2005. Biomarkers and surrogate endpoints. *Br J Clin Pharmacol*, 59, 491-4.
- ASHKENAZI, A., BENTO, C. F., RICKETTS, T., VICINANZA, M., SIDDIQI, F., PAVEL, M., SQUITIERI, F., HARDENBERG, M. C., IMARISIO, S., MENZIES, F. M. & RUBINSZTEIN, D. C. 2017. Polyglutamine tracts regulate beclin 1-dependent autophagy. *Nature*, 545, 108-111.
- BALDO, B., PAGANETTI, P., GRUENINGER, S., MARCELLIN, D., KALTENBACH, L. S., LO, D. C., SEMMELROTH, M., ZIVANOVIC, A., ABRAMOWSKI, D., SMITH, D., LOTZ, G. P., BATES, G. P. & WEISS, A. 2012. TR-FRET-based duplex immunoassay reveals an inverse correlation of soluble and aggregated mutant huntingtin in huntington's disease. *Chem Biol*, 19, 264-75.
- BETTENCOURT, C., HENSMAN-MOSS, D., FLOWER, M., WIETHOFF, S., BRICE, A., GOIZET, C., STEVANIN, G., KOUTSIS, G., KARADIMA, G., PANAS, M., YESCAS-GOMEZ, P., GARCIA-VELAZQUEZ, L. E., ALONSO-VILATELA, M. E., LIMA, M., RAPOSO, M., TRAYNOR, B., SWEENEY, M., WOOD, N., GIUNTI, P., NETWORK, S., DURR, A., HOLMANS, P., HOULDEN, H., TABRIZI, S. J. & JONES, L. 2016. DNA repair pathways underlie a common genetic mechanism modulating onset in polyglutamine diseases. *Ann Neurol*, 79, 983-90.

- BETTENCOURT, C. & LIMA, M. 2011. Machado-Joseph Disease: from first descriptions to new perspectives. *Orphanet J Rare Dis*, 6, 35.
- BETTENCOURT, C., SANTOS, C., KAY, T., VASCONCELOS, J. & LIMA, M. 2008. Analysis of segregation patterns in Machado-Joseph disease pedigrees. *J Hum Genet*, 53, 920-3.
- BICHELMIEIER, U., SCHMIDT, T., HUBENER, J., BOY, J., RUTTIGER, L., HABIG, K., POTHS, S., BONIN, M., KNIPPER, M., SCHMIDT, W. J., WILBERTZ, J., WOLBURG, H., LACCONE, F. & RIESS, O. 2007. Nuclear localization of ataxin-3 is required for the manifestation of symptoms in SCA3: in vivo evidence. *J Neurosci*, 27, 7418-28.
- BIOMARKERS DEFINITIONS WORKING, G. 2001. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*, 69, 89-95.
- BRUSCO, A., GELLERA, C., CAGNOLI, C., SALUTO, A., CASTUCCI, A., MICHIELOTTO, C., FETONI, V., MARIOTTI, C., MIGONE, N., DI DONATO, S. & TARONI, F. 2004. Molecular genetics of hereditary spinocerebellar ataxia: mutation analysis of spinocerebellar ataxia genes and CAG/CTG repeat expansion detection in 225 Italian families. *Arch Neurol*, 61, 727-33.
- BRYER, A., KRAUSE, A., BILL, P., DAVIDS, V., BRYANT, D., BUTLER, J., HECKMANN, J., RAMESAR, R. & GREENBERG, J. 2003. The hereditary adult-onset ataxias in South Africa. *J Neurol Sci*, 216, 47-54.
- BUCCIANTINI, M., GIANNONI, E., CHITI, F., BARONI, F., FORMIGLI, L., ZURDO, J., TADDEI, N., RAMPONI, G., DOBSON, C. M. & STEFANI, M. 2002. Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature*, 416, 507-11.
- BURK, K., FETTER, M., ABELE, M., LACCONE, F., BRICE, A., DICHGANS, J. & KLOCKGETHER, T. 1999. Autosomal dominant cerebellar ataxia type I: oculomotor abnormalities in families with SCA1, SCA2, and SCA3. *J Neurol*, 246, 789-97.
- 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.
- CARVALHO, D. R., LA ROCQUE-FERREIRA, A., RIZZO, I. M., IMAMURA, E. U. & SPECK-MARTINS, C. E. 2008. Homozygosity enhances severity in spinocerebellar ataxia type 3. *Pediatr Neurol*, 38, 296-9.
- CHAN, E., CHARLES, P., RIBAI, P., GOIZET, C., MARELLI, C., VINCITORIO, C. M., LE BAYON, A., GUYANT-MARÉCHAL, L., VANDENBERGHE, N., ANHEIM, M., DEVOS, D., FREEMAN, L., LE BER, I., N'GUYEN, K., TCHIKVILADZÉ, M., LABAUGE, P., HANNEQUIN, D., BRICE, A., DURR, A. & DU MONTCEL, S. T. 2011. Quantitative assessment of the evolution of cerebellar signs in spinocerebellar ataxias. *Mov Disord*, 26, 534-8.
- CHATTOPADHYAY, B., BASU, P., GANGOPADHYAY, P. K., MUKHERJEE, S. C., SINHA, K. K., CHAKRABORTY, A., ROY, T., ROYCHOUDHURY, S., MAJUMDER, P. P. & BHATTACHARYYA, N. P. 2003. Variation of CAG repeats and two intragenic polymorphisms at SCA3 locus among Machado-Joseph disease/SCA3 patients and diverse normal populations from eastern India. *Acta Neurol Scand*, 108, 407-14.

- COSTA MDO, C. & PAULSON, H. L. 2012. Toward understanding Machado-Joseph disease. *Prog Neurobiol*, 97, 239-57.
- CROOKE, S. T. 2004. Progress in antisense technology. *Annu Rev Med*, 55, 61-95.
- CROOKE, S. T. 2017. Molecular Mechanisms of Antisense Oligonucleotides. *Nucleic Acid Ther*, 27, 70-77.
- DA SILVA CARVALHO, G., SAUTE, J. A., HAAS, C. B., TORREZ, V. R., BROCHIER, A. W., SOUZA, G. N., FURTADO, G. V., GHENO, T., RUSSO, A., MONTE, T. L., SCHUMACHER-SCHUH, A., D'AVILA, R., DONIS, K. C., CASTILHOS, R. M., SOUZA, D. O., SARAIVA-PEREIRA, M. L., TORMAN, V. L., CAMEY, S., PORTELA, L. V. & JARDIM, L. B. 2016. Cytokines in Machado Joseph Disease/Spinocerebellar Ataxia 3. *Cerebellum*, 15, 518-25.
- DAVID, G., ABBAS, N., STEVANIN, G., DURR, A., YVERT, G., CANCEL, G., WEBER, C., IMBERT, G., SAUDOU, F., ANTONIOU, E., DRABKIN, H., GEMMILL, R., GIUNTI, P., BENOMAR, A., WOOD, N., RUBERG, M., AGID, Y., MANDEL, J. L. & BRICE, A. 1997. Cloning of the SCA7 gene reveals a highly unstable CAG repeat expansion. *Nat Genet*, 17, 65-70.
- DIALLO, A., JACOBI, H., COOK, A., LABRUM, R., DURR, A., BRICE, A., CHARLES, P., MARELLI, C., MARIOTTI, C., NANETTI, L., PANZERI, M., RAKOWICZ, M., SOBANSKA, A., SULEK, A., SCHMITZ-HUBSCH, T., SCHOLS, L., HENGEL, H., MELEGH, B., FILLA, A., ANTENORA, A., INFANTE, J., BERCIANO, J., VAN DE WARRENBURG, B. P., TIMMANN, D., BOESCH, S., PANDOLFO, M., SCHULZ, J. B., BAUER, P., GIUNTI, P., KANG, J. S., KLOCKGETHER, T. & TEZENAS DU MONTCEL, S. 2018. Survival in patients with spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6 (EUROSCA): a longitudinal cohort study. *Lancet Neurol*, 17, 327-334.
- DICKSON, D. W. 2018. Neuropathology of Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 46 Suppl 1, S30-s33.
- DRAGATSIS, I., LEVINE, M. S. & ZEITLIN, S. 2000. Inactivation of Hdh in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice. *Nat Genet*, 26, 300-6.
- DU MONTCEL, S. T., CHARLES, P., RIBAI, P., GOIZET, C., LE BAYON, A., LABAUGE, P., GUYANT-MARECHAL, L., FORLANI, S., JAUFFRET, C., VANDENBERGHE, N., N'GUYEN, K., LE BER, I., DEVOS, D., VINCITORIO, C. M., MANTO, M. U., TISON, F., HANNEQUIN, D., RUBERG, M., BRICE, A. & DURR, A. 2008. Composite cerebellar functional severity score: validation of a quantitative score of cerebellar impairment. *Brain*, 131, 1352-61.
- DURCAN, T. M. & FON, E. A. 2013. Ataxin-3 and its e3 partners: implications for machado-joseph disease. *Front Neurol*, 4, 46.
- DURCAN, T. M., KONTOGIANNEA, M., BEDARD, N., WING, S. S. & FON, E. A. 2012. Ataxin-3 deubiquitination is coupled to Parkin ubiquitination via E2 ubiquitin-conjugating enzyme. *J Biol Chem*, 287, 531-41.
- DURCAN, T. M., KONTOGIANNEA, M., THORARINSDOTTIR, T., FALLON, L., WILLIAMS, A. J., DJARMATI, A., FANTANEANU, T., PAULSON, H. L. & FON, E. A. 2011. The Machado-Joseph disease-associated mutant form

- of ataxin-3 regulates parkin ubiquitination and stability. *Hum Mol Genet*, 20, 141-54.
- 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.
- ELBASHIR, S. M., HARBORTH, J., LENDECKEL, W., YALCIN, A., WEBER, K. & TUSCHL, T. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411, 494-8.
- ENDO, K., SASAKI, H., WAKISAKA, A., TANAKA, H., SAITO, M., IGARASHI, S., TAKIYAMA, Y., SANPEI, K., IWABUCHI, K., SUZUKI, Y., ONARI, K., SUZUKI, T., WEISSENBACH, J., WEBER, J. L., NOMURA, Y., SEGAWA, M., NISHIZAWA, M. & TSUJI, S. 1996. Strong linkage disequilibrium and haplotype analysis in Japanese pedigrees with Machado-Joseph disease. *Am J Med Genet*, 67, 437-44.
- FARRAR, M. A., VUCIC, S., NICHOLSON, G. & KIERNAN, M. C. 2016. Motor cortical dysfunction develops in spinocerebellar ataxia type 3. *Clin Neurophysiol*, 127, 3418-3424.
- FINKEL, R. S., MERCURI, E., DARRAS, B. T., CONNOLLY, A. M., KUNTZ, N. L., KIRSCHNER, J., CHIRIBOGA, C. A., SAITO, K., SERVAIS, L., TIZZANO, E., TOPALOGLU, H., TULINIUS, M., MONTES, J., GLANZMAN, A. M., BISHOP, K., ZHONG, Z. J., GHEUENS, S., BENNETT, C. F., SCHNEIDER, E., FARWELL, W., DE VIVO, D. C. & GROUP, E. S. 2017. Nusinersen versus Sham Control in Infantile-Onset Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med*, 377, 1723-1732.
- FURTADO, G. V., OLIVEIRA, C. M., BOLZAN, G., SAUTE, J. A. M., SARAIVA-PEREIRA, M. L. & JARDIM, L. B. 2019. State biomarkers for Machado Joseph disease: Validation, feasibility and responsiveness to change. *Genet Mol Biol*, 42, 238-251.
- GASPAR, C., LOPES-CENDES, I., DESTEFANO, A. L., MACIEL, P., SILVEIRA, I., COUTINHO, P., MACLEOD, P., SEQUEIROS, J., FARRER, L. A. & ROULEAU, G. A. 1996. Linkage disequilibrium analysis in Machado-Joseph disease patients of different ethnic origins. *Hum Genet*, 98, 620-4.
- 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.
- GLOBAS, C., DU MONTCEL, S. T., BALIKO, L., BOESCH, S., DEPONDY, C., DIDONATO, S., DURR, A., FILLA, A., KLOCKGETHER, T., MARIOTTI, C., MELEGH, B., RAKOWICZ, M., RIBAI, P., ROLA, R., SCHMITZ-HUBSCH, T., SZYMANSKI, S., TIMMANN, D., VAN DE WARRENBURG, B. P., BAUER, P. & SCHOLS, L. 2008. Early symptoms in spinocerebellar ataxia type 1, 2, 3, and 6. *Mov Disord*, 23, 2232-8.

- 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., SCHÖLS, L., RIEß, O. H. & HÜBENER-SCHMID, J. 2020. PolyQ-expanded ataxin-3 protein levels in peripheral blood mononuclear cells correlate with clinical parameters in SCA3: a pilot study. *J Neurol*.
- GOTI, D., KATZEN, S. M., MEZ, J., KURTIS, N., KILUK, J., BEN-HAIEM, L., JENKINS, N. A., COPELAND, N. G., KAKIZUKA, A., SHARP, A. H., ROSS, C. A., MOUTON, P. R. & COLOMER, V. 2004. A mutant ataxin-3 putative-cleavage fragment in brains of Machado-Joseph disease patients and transgenic mice is cytotoxic above a critical concentration. *J Neurosci*, 24, 10266-79.
- GOTO, J., WATANABE, M., ICHIKAWA, Y., YEE, S. B., IHARA, N., ENDO, K., IGARASHI, S., TAKIYAMA, Y., GASPAR, C., MACIEL, P., TSUJI, S., ROULEAU, G. A. & KANAZAWA, I. 1997. Machado-Joseph disease gene products carrying different carboxyl termini. *Neurosci Res*, 28, 373-7.
- HAACKE, A., BROADLEY, S. A., BOTEVA, R., TZVETKOV, N., HARTL, F. U. & BREUER, P. 2006. Proteolytic cleavage of polyglutamine-expanded ataxin-3 is critical for aggregation and sequestration of non-expanded ataxin-3. *Hum Mol Genet*, 15, 555-68.
- 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.
- HABERHAUSEN, G., DAMIAN, M. S., LEWEKE, F. & MULLER, U. 1995. Spinocerebellar ataxia, type 3 (SCA3) is genetically identical to Machado-Joseph disease (MJD). *J Neurol Sci*, 132, 71-5.
- HAMPTON, R. Y. 2002. ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 14, 476-82.
- HARDING, A. E. 1983. Classification of the hereditary ataxias and paraplegias. *Lancet*, 1, 1151-5.
- HARMUTH, T., PRELL-SCHICKER, C., WEBER, J. J., GELLERICH, F., FUNKE, C., DRIESSEN, S., MAGG, J. C. D., KREBIEHL, G., WOLBURG, H., HAYER, S. N., HAUSER, S., KRUGER, R., SCHOLS, L., RIESS, O. & HUBENER-SCHMID, J. 2018. Mitochondrial Morphology, Function and Homeostasis Are Impaired by Expression of an N-terminal Calpain Cleavage Fragment of Ataxin-3. *Front Mol Neurosci*, 11, 368.
- HERSHESON, J., HAWORTH, A. & HOULDEN, H. 2012. The inherited ataxias: genetic heterogeneity, mutation databases, and future directions in research and clinical diagnostics. *Hum Mutat*, 33, 1324-32.
- HSIEH, M., TSAI, H. F., LU, T. M., YANG, C. Y., WU, H. M. & LI, S. Y. 1997. Studies of the CAG repeat in the Machado-Joseph disease gene in Taiwan. *Hum Genet*, 100, 155-62.
- HSU, J. Y., JHANG, Y. L., CHENG, P. H., CHANG, Y. F., MAO, S. H., YANG, H. I., LIN, C. W., CHEN, C. M. & YANG, S. H. 2017. The Truncated C-terminal Fragment of Mutant ATXN3 Disrupts Mitochondria Dynamics in Spinocerebellar Ataxia Type 3 Models. *Front Mol Neurosci*, 10, 196.

- HTTP://ATAXIA-GLOBAL-INITIATIVES.NET. Available: <http://ataxia-global-initiatives.net/sca-global/conferences/sca-global-2020/poster-abstracts/> [Accessed 13.12. 2020].
- HU, B., ZHONG, L., WENG, Y., PENG, L., HUANG, Y., ZHAO, Y. & LIANG, X. J. 2020. Therapeutic siRNA: state of the art. *Signal Transduct Target Ther*, 5, 101.
- 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.
- ICHIKAWA, Y., GOTO, J., HATTORI, M., TOYODA, A., ISHII, K., JEONG, S. Y., HASHIDA, H., MASUDA, N., OGATA, K., KASAI, F., HIRAI, M., MACIEL, P., ROULEAU, G. A., SAKAKI, Y. & KANAZAWA, I. 2001. The genomic structure and expression of MJD, the Machado-Joseph disease gene. *J Hum Genet*, 46, 413-22.
- IGARASHI, S., TAKIYAMA, Y., CANCEL, G., ROGAEVA, E. A., SASAKI, H., WAKISAKA, A., ZHOU, Y. X., TAKANO, H., ENDO, K., SANPEI, K., OYAKE, M., TANAKA, H., STEVANIN, G., ABBAS, N., DURR, A., ROGAEV, E. I., SHERRINGTON, R., TSUDA, T., IKEDA, M., CASSA, E., NISHIZAWA, M., BENOMAR, A., JULIEN, J., WEISSENBACH, J., WANG, G. X., AGID, Y., ST GEORGE-HYSLOP, P. H., BRICE, A. & TSUJI, S. 1996. Intergenerational instability of the CAG repeat of the gene for Machado-Joseph disease (MJD1) is affected by the genotype of the normal chromosome: implications for the molecular mechanisms of the instability of the CAG repeat. *Hum Mol Genet*, 5, 923-32.
- IKEDA, H., YAMAGUCHI, M., SUGAI, S., AZE, Y., NARUMIYA, S. & KAKIZUKA, A. 1996. Expanded polyglutamine in the Machado-Joseph disease protein induces cell death in vitro and in vivo. *Nat Genet*, 13, 196-202.
- IKEUCHI, T., IGARASHI, S., TAKIYAMA, Y., ONODERA, O., OYAKE, M., TAKANO, H., KOIDE, R., TANAKA, H. & TSUJI, S. 1996. Non-Mendelian transmission in dentatorubral-pallidoluysian atrophy and Machado-Joseph disease: the mutant allele is preferentially transmitted in male meiosis. *Am J Hum Genet*, 58, 730-3.
- ILG, W., BROTZ, D., BURKARD, S., GIESE, M. A., SCHOLS, L. & SYNOFZIK, M. 2010. Long-term effects of coordinative training in degenerative cerebellar disease. *Mov Disord*, 25, 2239-46.
- IMBERT, G., SAUDOU, F., YVERT, G., DEVYS, D., TROTTIER, Y., GARNIER, J. M., WEBER, C., MANDEL, J. L., CANCEL, G., ABBAS, N., DURR, A., DIDIERJEAN, O., STEVANIN, G., AGID, Y. & BRICE, A. 1996. Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats. *Nat Genet*, 14, 285-91.
- JACOBI, H., BAUER, P., GIUNTI, P., LABRUM, R., SWEENEY, M. G., CHARLES, P., DÜRR, A., MARELLI, C., GLOBAS, C., LINNEMANN, C., SCHÖLS, L., RAKOWICZ, M., ROLA, R., ZDZIENICKA, E., SCHMITZ-HÜBSCH, T., FANCELLU, R., MARIOTTI, C., TOMASELLO, C., BALIKO, L., MELEGH, B., FILLA, A., RINALDI, C., VAN DE WARRENBURG, B. P., VERSTAPPEN, C. C., SZYMANSKI, S., BERCIANO, J., INFANTE, J.,

- TIMMANN, D., BOESCH, S., HERING, S., DEPOND, C., PANDOLFO, M., KANG, J. S., RATZKA, S., SCHULZ, J., TEZENAS DU MONTCEL, S. & KLOCKGETHER, T. 2011. The natural history of spinocerebellar ataxia type 1, 2, 3, and 6: a 2-year follow-up study. *Neurology*, 77, 1035-41.
- 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-HÜBSCH, T., SCHÖLS, 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., SCHOLS, 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. B., 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, 650-8.
- JARDIM, L. B., SILVEIRA, I., PEREIRA, M. L., FERRO, A., ALONSO, I., DO CEU MOREIRA, M., MENDONCA, P., FERREIRINHA, F., SEQUEIROS, J. & GIUGLIANI, R. 2001. A survey of spinocerebellar ataxia in South Brazil - 66 new cases with Machado-Joseph disease, SCA7, SCA8, or unidentified disease-causing mutations. *J Neurol*, 248, 870-6.
- KIELING, C., PRESTES, P. R., SARAIVA-PEREIRA, M. L. & JARDIM, L. B. 2007. Survival estimates for patients with Machado-Joseph disease (SCA3). *Clin Genet*, 72, 543-5.
- KIELING, C., RIEDER, C. R., SILVA, A. C., SAUTE, J. A., CECCHIN, C. R., MONTE, T. L. & JARDIM, L. B. 2008. A neurological examination score for the assessment of spinocerebellar ataxia 3 (SCA3). *Eur J Neurol*, 15, 371-6.
- 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.
- KLOCKGETHER, T., AUBURGER, G., BÖSCH, S., BOLTSHAUSER, E., BURGUNDER, J.-M., DUYAR, H., JACOBI, H., SCHMITZ-HÜBSCH, T., SCHÖLS, L., STÜBER, M., SYNOFZIK, M. & TIMMANN-BRAUN, D. 2018. *Ataxien des Erwachsenenalters, S1-Leitlinie, in: Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie*. [Online]. Available: www.dgn.org/leitlinien [Accessed 09.03.2020].
- KLOCKGETHER, T., LUDTKE, R., KRAMER, B., ABELE, M., BURK, K., SCHOLS, L., RIESS, O., LACCONE, F., BOESCH, S., LOPES-CENDES, I., BRICE, A., INZELBERG, R., ZILBER, N. & DICHGANS, J. 1998. The natural history of degenerative ataxia: a retrospective study in 466 patients. *Brain*, 121 (Pt 4), 589-600.
- KLOCKGETHER, T., SCHÖLS, L., ABELE, M., BÜRK, K., TOPKA, H., ANDRES, F., AMOIRIDIS, G., LÜDTKE, R., RIESS, O., LACCONE, F. & DICHGANS, J. 1999. Age related axonal neuropathy in spinocerebellar ataxia type 3/Machado-Joseph disease (SCA3/MJD). *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 66, 222-4.
- KOBAYASHI, T., TANAKA, K., INOUE, K. & KAKIZUKA, A. 2002. Functional ATPase activity of p97/valosin-containing protein (VCP) is required for the quality control of endoplasmic reticulum in neuronally differentiated mammalian PC12 cells. *J Biol Chem*, 277, 47358-65.
- KOIDE, R., IKEUCHI, T., ONODERA, O., TANAKA, H., IGARASHI, S., ENDO, K., TAKAHASHI, H., KONDO, R., ISHIKAWA, A., HAYASHI, T. & ET AL. 1994. Unstable expansion of CAG repeat in hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA). *Nat Genet*, 6, 9-13.
- LA SPADA, A. R., WILSON, E. M., LUBAHN, D. B., HARDING, A. E. & FISCHBECK, K. H. 1991. Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature*, 352, 77-9.
- LACO, M. N., CORTES, L., TRAVIS, S. M., PAULSON, H. L. & REGO, A. C. 2012a. Valosin-containing protein (VCP/p97) is an activator of wild-type ataxin-3. *PLoS One*, 7, e43563.
- LACO, M. N., OLIVEIRA, C. R., PAULSON, H. L. & REGO, A. C. 2012b. Compromised mitochondrial complex II in models of Machado-Joseph disease. *Biochim Biophys Acta*, 1822, 139-49.
- LANE, C. A., HARDY, J. & SCHOTT, J. M. 2018. Alzheimer's disease. *Eur J Neurol*, 25, 59-70.
- LI, F., MACFARLAN, T., PITTMAN, R. N. & CHAKRAVARTI, D. 2002. Ataxin-3 is a histone-binding protein with two independent transcriptional corepressor activities. *J Biol Chem*, 277, 45004-12.
- LI, L. B., YU, Z., TENG, X. & BONINI, N. M. 2008. RNA toxicity is a component of ataxin-3 degeneration in *Drosophila*. *Nature*, 453, 1107-11.
- 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.

- LI, Y., YOKOTA, T., MATSUMURA, R., TAIRA, K. & MIZUSAWA, H. 2004. Sequence-dependent and independent inhibition specific for mutant ataxin-3 by small interfering RNA. *Ann Neurol*, 56, 124-9.
- LIMA, M. & RAPOSO, M. 2018. Towards the Identification of Molecular Biomarkers of Spinocerebellar Ataxia Type 3 (SCA3)/Machado-Joseph Disease (MJD). *Adv Exp Med Biol*, 1049, 309-319.
- LONG, Z., CHEN, Z., WANG, C., HUANG, F., PENG, H., HOU, X., DING, D., YE, W., WANG, J., PAN, Q., LI, J., XIA, K., TANG, B., ASHIZAWA, T. & JIANG, H. 2015. Two novel SNPs in ATXN3 3' UTR may decrease age at onset of SCA3/MJD in Chinese patients. *PLoS One*, 10, e0117488.
- 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.
- MACDONALD, M., AMBROSE, C., DUYAO, M., MYERS, M. & LIN, C. 1993. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell*, 72, 971-83.
- MACEDO-RIBEIRO, S., CORTES, L., MACIEL, P. & CARVALHO, A. L. 2009. Nucleocytoplasmic shuttling activity of ataxin-3. *PLoS One*, 4, e5834.
- MACIEL, P., COSTA, M. C., FERRO, A., ROUSSEAU, M., SANTOS, C. S., GASPAR, C., BARROS, J., ROULEAU, G. A., COUTINHO, P. & SEQUEIROS, J. 2001. Improvement in the molecular diagnosis of Machado-Joseph disease. *Arch Neurol*, 58, 1821-7.
- MACIEL, P., GASPAR, C., DESTEFANO, A. L., SILVEIRA, I., COUTINHO, P., RADVANY, J., DAWSON, D. M., SUDARSKY, L., GUIMARAES, J., LOUREIRO, J. E. & ET AL. 1995. Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease. *Am J Hum Genet*, 57, 54-61.
- MACIEL, P., GASPAR, C., GUIMARAES, L., GOTO, J., LOPES-CENDES, I., HAYES, S., ARVIDSSON, K., DIAS, A., SEQUEIROS, J., SOUSA, A. & ROULEAU, G. A. 1999. Study of three intragenic polymorphisms in the Machado-Joseph disease gene (MJD1) in relation to genetic instability of the (CAG)_n tract. *Eur J Hum Genet*, 7, 147-56.
- MAGNER, D., BIALA, E., LISOWIEC-WACHNICKA, J., KIERZEK, E. & KIERZEK, R. 2015. A Tandem Oligonucleotide Approach for SNP-Selective RNA Degradation Using Modified Antisense Oligonucleotides. *PLoS One*, 10, e0142139.
- MARTINS, S., CALAFELL, F., GASPAR, C., WONG, V. C., SILVEIRA, I., NICHOLSON, G. A., BRUNT, E. R., TRANEBJAERG, L., STEVANIN, G., HSIEH, M., SOONG, B. W., LOUREIRO, L., DURR, A., TSUJI, S., WATANABE, M., JARDIM, L. B., GIUNTI, P., RIESS, O., RANUM, L. P., BRICE, A., ROULEAU, G. A., COUTINHO, P., AMORIM, A. & SEQUEIROS, J. 2007. Asian origin for the worldwide-spread mutational event in Machado-Joseph disease. *Arch Neurol*, 64, 1502-8.
- MARTINS, S., CALAFELL, F., WONG, V. C., SEQUEIROS, J. & AMORIM, A. 2006. A multistep mutation mechanism drives the evolution of the CAG repeat at MJD/SCA3 locus. *Eur J Hum Genet*, 14, 932-40.

- MARUYAMA, H., NAKAMURA, S., MATSUYAMA, Z., SAKAI, T., DOYU, M., SOBUE, G., SETO, M., TSUJIHATA, M., OH-I, T., NISHIO, T. & ET AL. 1995. Molecular features of the CAG repeats and clinical manifestation of Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet*, 4, 807-12.
- MATILLA-DUEÑAS, A., ASHIZAWA, T., BRICE, A., MAGRI, S., MCFARLAND, K. N., PANDOLFO, M., PULST, S. M., RIESS, O., RUBINSZTEIN, D. C., SCHMIDT, J., SCHMIDT, T., SCOLES, D. R., STEVANIN, G., TARONI, F., UNDERWOOD, B. R. & SÁNCHEZ, I. 2014. Consensus paper: pathological mechanisms underlying neurodegeneration in spinocerebellar ataxias. *Cerebellum*, 13, 269-302.
- MATSUMINE, H., SAITO, M., SHIMODA-MATSUBAYASHI, S., TANAKA, H., ISHIKAWA, A., NAKAGAWA-HATTORI, Y., YOKOCHI, M., KOBAYASHI, T., IGARASHI, S., TAKANO, H., SANPEI, K., KOIKE, R., MORI, H., KONDO, T., MIZUTANI, Y., SCHAFFER, A. A., YAMAMURA, Y., NAKAMURA, S., KUZUHARA, S., TSUJI, S. & MIZUNO, Y. 1997. Localization of a gene for an autosomal recessive form of juvenile Parkinsonism to chromosome 6q25.2-27. *Am J Hum Genet*, 60, 588-96.
- MCLOUGHLIN, H. S., MOORE, L. R., CHOPRA, R., KOMLO, R., MCKENZIE, M., BLUMENSTEIN, K. G., ZHAO, H., KORDASIEWICZ, H. B., SHAKKOTTAI, V. G. & PAULSON, H. L. 2018. Oligonucleotide therapy mitigates disease in spinocerebellar ataxia type 3 mice. *Ann Neurol*, 84, 64-77.
- MCLOUGHLIN, H. S., MOORE, L. R. & PAULSON, H. L. 2020. Pathogenesis of SCA3 and implications for other polyglutamine diseases. *Neurobiol Dis*, 134, 104635.
- MENZIES, F. M., HUEBENER, J., RENNA, M., BONIN, M., RIESS, O. & RUBINSZTEIN, D. C. 2010. Autophagy induction reduces mutant ataxin-3 levels and toxicity in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 3. *Brain*, 133, 93-104.
- MICHLEWSKI, G. & KRZYZOSIAK, W. J. 2004. Molecular architecture of CAG repeats in human disease related transcripts. *J Mol Biol*, 340, 665-79.
- MILLER, V. M., XIA, H., MARRS, G. L., GOUVION, C. M., LEE, G., DAVIDSON, B. L. & PAULSON, H. L. 2003. Allele-specific silencing of dominant disease genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 7195-200.
- MIYAI, I., ITO, M., HATTORI, N., MIHARA, M., HATAKENAKA, M., YAGURA, H., SOBUE, G., NISHIZAWA, M. & CEREBELLAR ATAXIA REHABILITATION TRIALISTS, C. 2012. Cerebellar ataxia rehabilitation trial in degenerative cerebellar diseases. *Neurorehabil Neural Repair*, 26, 515-22.
- MORETT, E. & BORK, P. 1999. A novel transactivation domain in parkin. *Trends Biochem Sci*, 24, 229-31.
- MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G. & ERLICH, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 51 Pt 1, 263-73.
- MYERS, R. H., MACDONALD, M. E., KOROSHETZ, W. J., DUYAO, M. P., AMBROSE, C. M., TAYLOR, S. A., BARNES, G., SRINIDHI, J., LIN, C. S., WHALEY, W. L. & ET AL. 1993. De novo expansion of a (CAG)_n repeat in sporadic Huntington's disease. *Nat Genet*, 5, 168-73.

- NAKANO, K. K., DAWSON, D. M. & SPENCE, A. 1972. Machado disease. A hereditary ataxia in Portuguese emigrants to Massachusetts. *Neurology*, 22, 49-55.
- NASCIMENTO-FERREIRA, I., SANTOS-FERREIRA, T., SOUSA-FERREIRA, L., AUREGAN, G., ONOFRE, I., ALVES, S., DUFOUR, N., COLOMER GOULD, V. F., KOEPPEN, A., DEGLON, N. & PEREIRA DE ALMEIDA, L. 2011. Overexpression of the autophagic beclin-1 protein clears mutant ataxin-3 and alleviates Machado-Joseph disease. *Brain*, 134, 1400-15.
- NCBI/SNP. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/> [Accessed 15.04 2020].
- 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.
- ORR, H. T., CHUNG, M. Y., BANFI, S., KWIATKOWSKI, T. J., JR., SERVADIO, A., BEAUDET, A. L., MCCALL, A. E., DUVICK, L. A., RANUM, L. P. & ZOGHBI, H. Y. 1993. Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Nat Genet*, 4, 221-6.
- PADIATH, Q. S., SRIVASTAVA, A. K., ROY, S., JAIN, S. & BRAHMACHARI, S. K. 2005. Identification of a novel 45 repeat unstable allele associated with a disease phenotype at the MJD1/SCA3 locus. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 133b, 124-6.
- PAULSON, H. 2018. Repeat expansion diseases. *Handb Clin Neurol*, 147, 105-123.
- PAULSON, H. L., PEREZ, M. K., TROTTIER, Y., TROJANOWSKI, J. Q., SUBRAMONY, S. H., DAS, S. S., VIG, P., MANDEL, J. L., FISCHBECK, K. H. & PITTMAN, R. N. 1997. Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinocerebellar ataxia type 3. *Neuron*, 19, 333-44.
- 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., JANUÁRIO, 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.
- RAMIREZ-BELLO, J. & JIMENEZ-MORALES, M. 2017. [Functional implications of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in protein-coding and non-coding RNA genes in multifactorial diseases]. *Gac Med Mex*, 153, 238-250.

- REINA, C. P., ZHONG, X. & PITTMAN, R. N. 2010. Proteotoxic stress increases nuclear localization of ataxin-3. *Hum Mol Genet*, 19, 235-49.
- REINER, A., DRAGATSIS, I., ZEITLIN, S. & GOLDOWITZ, D. 2003. Wild-type huntingtin plays a role in brain development and neuronal survival. *Mol Neurobiol*, 28, 259-76.
- RICHARDS, S., AZIZ, N., BALE, S., BICK, D., DAS, S., GASTIER-FOSTER, J., GRODY, W. W., HEGDE, M., LYON, E., SPECTOR, E., VOELKERDING, K., REHM, H. L. & COMMITTEE, A. L. Q. A. 2015. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*, 17, 405-24.
- RODRIGUES, A. J., COPPOLA, G., SANTOS, C., COSTA MDO, C., AILION, M., SEQUEIROS, J., GESCHWIND, D. H. & MACIEL, P. 2007. Functional genomics and biochemical characterization of the *C. elegans* orthologue of the Machado-Joseph disease protein ataxin-3. *Faseb j*, 21, 1126-36.
- 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.
- ROMANO, S., COARELLI, G., MARCOTULLI, C., LEONARDI, L., PICCOLO, F., SPADARO, M., FRONTALI, M., FERRALDESCHI, M., VULPIANI, M. C., PONZELLI, F., SALVETTI, M., ORZI, F., PETRUCCI, A., VANACORE, N., CASALI, C. & RISTORI, G. 2015. Riluzole in patients with hereditary cerebellar ataxia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol*, 14, 985-91.
- ROS, R., AMPUERO, I. & GARCÍA DE YÉBENES, J. 2008. Parkin polymorphisms in progressive supranuclear palsy. *J Neurol Sci*, 268, 176-8.
- 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.
- RUANO, L., MELO, C., SILVA, M. C. & COUTINHO, P. 2014. The global epidemiology of hereditary ataxia and spastic paraplegia: a systematic review of prevalence studies. *Neuroepidemiology*, 42, 174-83.
- RUB, U., SCHOLS, L., PAULSON, H., AUBURGER, G., KERMER, P., JEN, J. C., SEIDEL, K., KORF, H. W. & DELLER, T. 2013. Clinical features, neurogenetics and neuropathology of the polyglutamine spinocerebellar ataxias type 1, 2, 3, 6 and 7. *Prog Neurobiol*, 104, 38-66.
- RUBINSZTEIN, D. C. 2002. Lessons from animal models of Huntington's disease. *Trends Genet*, 18, 202-9.
- RUBINSZTEIN, D. C., LEGGO, J., COLES, R., ALMQVIST, E., BIANCALANA, V., CASSIMAN, J. J., CHOTAI, K., CONNARTY, M., CRAUFORD, D., CURTIS, A., CURTIS, D., DAVIDSON, M. J., DIFFER, A. M., DODE, C., DODGE, A., FRONTALI, M., RANEN, N. G., STINE, O. C., SHERR, M., ABBOTT, M. H., FRANZ, M. L., GRAHAM, C. A., HARPER, P. S., HEDREEN, J. C., HAYDEN, M. R. & ET AL. 1996. Phenotypic characterization of individuals with 30-40 CAG repeats in the Huntington

- disease (HD) gene reveals HD cases with 36 repeats and apparently normal elderly individuals with 36-39 repeats. *Am J Hum Genet*, 59, 16-22.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 5463-7.
- SATOH, J. & KURODA, Y. 1999. Association of codon 167 Ser/Asn heterozygosity in the parkin gene with sporadic Parkinson's disease. *Neuroreport*, 10, 2735-9.
- SATOH, T., SUMIYOSHI, A., YAGI-UTSUMI, M., SAKATA, E., SASAKAWA, H., KURIMOTO, E., YAMAGUCHI, Y., LI, W., JOAZEIRO, C. A., HIROKAWA, T. & KATO, K. 2014. Mode of substrate recognition by the Josephin domain of ataxin-3, which has an endo-type deubiquitinase activity. *FEBS Lett*, 588, 4422-30.
- SAUTE, J. A. M. & JARDIM, L. B. 2018. Planning Future Clinical Trials for Machado-Joseph Disease. *Adv Exp Med Biol*, 1049, 321-348.
- SCHMITT, I., LINDEN, M., KHAZNEH, H., EVERT, B. O., BREUER, P., KLOCKGETHER, T. & WUELLNER, U. 2007. Inactivation of the mouse *Atn3* (ataxin-3) gene increases protein ubiquitination. *Biochem Biophys Res Commun*, 362, 734-9.
- SCHMITZ-HUBSCH, T., COUDERT, M., BAUER, P., GIUNTI, P., GLOBAS, C., BALIKO, L., FILLA, A., MARIOTTI, C., RAKOWICZ, M., CHARLES, P., RIBAI, P., SZYMANSKI, S., INFANTE, J., VAN DE WARRENBURG, B. P., DURR, A., TIMMANN, D., BOESCH, S., FANCELLU, R., ROLA, R., DEPONDT, C., SCHOLS, L., ZDIENICKA, E., KANG, J. S., DOHLINGER, S., KREMER, B., STEPHENSON, D. A., MELEGH, B., PANDOLFO, M., DI DONATO, S., DU MONTCEL, S. T. & KLOCKGETHER, T. 2008a. Spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6: disease severity and nonataxia symptoms. *Neurology*, 71, 982-9.
- SCHMITZ-HUBSCH, T., DU MONTCEL, S. T., BALIKO, L., BERCIANO, J., BOESCH, S., DEPONDT, C., GIUNTI, P., GLOBAS, C., INFANTE, J., KANG, J. S., KREMER, B., MARIOTTI, C., MELEGH, B., PANDOLFO, M., RAKOWICZ, M., RIBAI, P., ROLA, R., SCHOLS, L., SZYMANSKI, S., VAN DE WARRENBURG, B. P., DURR, A., KLOCKGETHER, T. & FANCELLU, R. 2006. Scale for the assessment and rating of ataxia: development of a new clinical scale. *Neurology*, 66, 1717-20.
- SCHMITZ-HUBSCH, T., GIUNTI, P., STEPHENSON, D. A., GLOBAS, C., BALIKO, L., SACCA, F., MARIOTTI, C., RAKOWICZ, M., SZYMANSKI, S., INFANTE, J., VAN DE WARRENBURG, B. P., TIMMANN, D., FANCELLU, R., ROLA, R., DEPONDT, C., SCHOLS, L., ZDIENICKA, E., KANG, J. S., DOHLINGER, S., KREMER, B., MELEGH, B., FILLA, A. & KLOCKGETHER, T. 2008b. SCA Functional Index: a useful compound performance measure for spinocerebellar ataxia. *Neurology*, 71, 486-92.
- SCHOLS, L., AMOIRIDIS, G., BUTTNER, T., PRZUNTEK, H., EPPLEN, J. T. & RIESS, O. 1997. Autosomal dominant cerebellar ataxia: phenotypic differences in genetically defined subtypes? *Ann Neurol*, 42, 924-32.
- SCHOLS, L., VIEIRA-SAECKER, A. M., SCHOLS, S., PRZUNTEK, H., EPPLEN, J. T. & RIESS, O. 1995. Trinucleotide expansion within the MJD1 gene

- presents clinically as spinocerebellar ataxia and occurs most frequently in German SCA patients. *Hum Mol Genet*, 4, 1001-5.
- SEIDEL, K., DEN DUNNEN, W. F., SCHULTZ, C., PAULSON, H., FRANK, S., DE VOS, R. A., BRUNT, E. R., DELLER, T., KAMPINGA, H. H. & RUB, U. 2010. Axonal inclusions in spinocerebellar ataxia type 3. *Acta Neuropathol*, 120, 449-60.
- SEQUEIROS, J., MACIEL, P., TABORDA, F., LEDO, S., ROCHA, J. C., LOPES, A., RETO, F., FORTUNA, A. M., ROUSSEAU, M., FLEMING, M., COUTINHO, P., ROULEAU, G. A. & JORGE, C. S. 1998. Prenatal diagnosis of Machado-Joseph disease by direct mutation analysis. *Prenat Diagn*, 18, 611-7.
- SHIMURA, H., HATTORI, N., KUBO, S., MIZUNO, Y., ASAKAWA, S., MINOSHIMA, S., SHIMIZU, N., IWAI, K., CHIBA, T., TANAKA, K. & SUZUKI, T. 2000. Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet*, 25, 302-5.
- SILVEIRA, I., COUTINHO, P., MACIEL, P., GASPAR, C., HAYES, S., DIAS, A., GUIMARAES, J., LOUREIRO, L., SEQUEIROS, J. & ROULEAU, G. A. 1998. Analysis of SCA1, DRPLA, MJD, SCA2, and SCA6 CAG repeats in 48 Portuguese ataxia families. *Am J Med Genet*, 81, 134-8.
- SIMOES, A. T., GONCALVES, N., KOEPPEN, A., DEGLON, N., KUGLER, S., DUARTE, C. B. & PEREIRA DE ALMEIDA, L. 2012. Calpastatin-mediated inhibition of calpains in the mouse brain prevents mutant ataxin 3 proteolysis, nuclear localization and aggregation, relieving Machado-Joseph disease. *Brain*, 135, 2428-39.
- SMITH, R. A., MILLER, T. M., YAMANAKA, K., MONIA, B. P., CONDON, T. P., HUNG, G., LOBSIGER, C. S., WARD, C. M., MCALONIS-DOWNES, M., WEI, H., WANCEWICZ, E. V., BENNETT, C. F. & CLEVELAND, D. W. 2006. Antisense oligonucleotide therapy for neurodegenerative disease. *J Clin Invest*, 116, 2290-6.
- STEVANIN, G. & BRICE, A. 2008. Spinocerebellar ataxia 17 (SCA17) and Huntington's disease-like 4 (HDL4). *Cerebellum*, 7, 170-8.
- STEVANIN, G., CANCEL, G., DIDIERJEAN, O., DURR, A., ABBAS, N., CASSA, E., FEINGOLD, J., AGID, Y. & BRICE, A. 1995. Linkage disequilibrium at the Machado-Joseph disease/spinal cerebellar ataxia 3 locus: evidence for a common founder effect in French and Portuguese-Brazilian families as well as a second ancestral Portuguese-Azorean mutation. *Am J Hum Genet*, 57, 1247-50.
- STEVANIN, G., LEBRE, A. S., MATHIEUX, C., CANCEL, G., ABBAS, N., DIDIERJEAN, O., DURR, A., TROTTIER, Y., AGID, Y. & BRICE, A. 1997. Linkage disequilibrium between the spinocerebellar ataxia 3/Machado-Joseph disease mutation and two intragenic polymorphisms, one of which, X359Y, affects the stop codon. *Am J Hum Genet*, 60, 1548-52.
- STICHEL, C. C., AUGUSTIN, M., KUHN, K., ZHU, X. R., ENGELS, P., ULLMER, C. & LUBBERT, H. 2000. Parkin expression in the adult mouse brain. *Eur J Neurosci*, 12, 4181-94.
- SWITONSKI, P. M., FISZER, A., KAZMIERSKA, K., KURPISZ, M., KRZYZOSIAK, W. J. & FIGIEL, M. 2011. Mouse ataxin-3 functional knock-out model. *Neuromolecular Med*, 13, 54-65.

- TAKIYAMA, Y., IGARASHI, S., ROGAEVA, E. A., ENDO, K., ROGAEV, E. I., TANAKA, H., SHERRINGTON, R., SANPEI, K., LIANG, Y., SAITO, M. & ET AL. 1995. Evidence for inter-generational instability in the CAG repeat in the MJD1 gene and for conserved haplotypes at flanking markers amongst Japanese and Caucasian subjects with Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet*, 4, 1137-46.
- TAKIYAMA, Y., NISHIZAWA, M., TANAKA, H., KAWASHIMA, S., SAKAMOTO, H., KARUBE, Y., SHIMAZAKI, H., SOUTOME, M., ENDO, K., OHTA, S. & ET AL. 1993. The gene for Machado-Joseph disease maps to human chromosome 14q. *Nat Genet*, 4, 300-4.
- TAKIYAMA, Y., SAKOE, K., SOUTOME, M., NAMEKAWA, M., OGAWA, T., NAKANO, I., IGARASHI, S., OYAKE, M., TANAKA, H., TSUJI, S. & NISHIZAWA, M. 1997. Single sperm analysis of the CAG repeats in the gene for Machado-Joseph disease (MJD1): evidence for non-Mendelian transmission of the MJD1 gene and for the effect of the intragenic CGG/GGG polymorphism on the intergenerational instability. *Hum Mol Genet*, 6, 1063-8.
- TAYLOR, P. K. 1984. Non-linear effects of age on nerve conduction in adults. *J Neurol Sci*, 66, 223-34.
- TROTTIER, Y., CANCEL, G., AN-GOURFINKEL, I., LUTZ, Y., WEBER, C., BRICE, A., HIRSCH, E. & MANDEL, J. L. 1998. Heterogeneous intracellular localization and expression of ataxin-3. *Neurobiol Dis*, 5, 335-47.
- TROUILLAS, P., TAKAYANAGI, T., HALLETT, M., CURRIER, R. D., SUBRAMONY, S. H., WESSEL, K., BRYER, A., DIENER, H. C., MASSAQUOI, S., GOMEZ, C. M., COUTINHO, P., BEN HAMIDA, M., CAMPANELLA, G., FILLA, A., SCHUT, L., TIMANN, D., HONNORAT, J., NIGHOGHOSSIAN, N. & MANYAM, B. 1997. International Cooperative Ataxia Rating Scale for pharmacological assessment of the cerebellar syndrome. The Ataxia Neuropharmacology Committee of the World Federation of Neurology. *J Neurol Sci*, 145, 205-11.
- TSAI, H. F., TSAI, H. J. & HSIEH, M. 2004. Full-length expanded ataxin-3 enhances mitochondrial-mediated cell death and decreases Bcl-2 expression in human neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 324, 1274-82.
- TSAI, Y. C., FISHMAN, P. S., THAKOR, N. V. & OYLER, G. A. 2003. Parkin facilitates the elimination of expanded polyglutamine proteins and leads to preservation of proteasome function. *J Biol Chem*, 278, 22044-55.
- TUITE, P. J., ROGAEVA, E. A., ST GEORGE-HYSLOP, P. H. & LANG, A. E. 1995. Dopa-responsive parkinsonism phenotype of Machado-Joseph disease: confirmation of 14q CAG expansion. *Ann Neurol*, 38, 684-7.
- VAN ALFEN, N., SINKE, R. J., ZWARTS, M. J., GABREELS-FESTEN, A., PRAAMSTRA, P., KREMER, B. P. & HORSTINK, M. W. 2001. Intermediate CAG repeat lengths (53,54) for MJD/SCA3 are associated with an abnormal phenotype. *Ann Neurol*, 49, 805-7.
- VAN DE WARRENBURG, B. P., HENDRIKS, H., DURR, A., VAN ZUIJLEN, M. C., STEVANIN, G., CAMUZAT, A., SINKE, R. J., BRICE, A. & KREMER,

- B. P. 2005. Age at onset variance analysis in spinocerebellar ataxias: a study in a Dutch-French cohort. *Ann Neurol*, 57, 505-12.
- WANG, G., IDE, K., NUKINA, N., GOTO, J., ICHIKAWA, Y., UCHIDA, K., SAKAMOTO, T. & KANAZAWA, I. 1997. Machado-Joseph disease gene product identified in lymphocytes and brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 233, 476-9.
- WANG, G., SAWAI, N., KOTLIAROVA, S., KANAZAWA, I. & NUKINA, N. 2000. Ataxin-3, the MJD1 gene product, interacts with the two human homologs of yeast DNA repair protein RAD23, HHR23A and HHR23B. *Hum Mol Genet*, 9, 1795-803.
- WEBER, J. J., GOLLA, M., GUAITOLI, G., WANICHAWAN, P., HAYER, S. N., HAUSER, S., KRAHL, A. C., NAGEL, M., SAMER, S., ARONICA, E., CARLSON, C. R., SCHOLS, L., RIESS, O., GLOECKNER, C. J., NGUYEN, H. P. & HUBENER-SCHMID, J. 2017. A combinatorial approach to identify calpain cleavage sites in the Machado-Joseph disease protein ataxin-3. *Brain*, 140, 1280-1299.
- WEIR, D. W., STURROCK, A. & LEAVITT, B. R. 2011. Development of biomarkers for Huntington's disease. *Lancet Neurol*, 10, 573-90.
- 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.
- 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., SCHÜLE, R., KAESER, S. A., KUHLE, J., KLOCKGETHER, T., SCHÖLS, L., BARRO, C., HÜBENER-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.
- 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, C., CHEN, D. B., FENG, L., ZHOU, X. X., ZHANG, J. W., YOU, H. J., LIANG, X. L., PEI, Z. & LI, X. H. 2017. Oculomotor deficits in spinocerebellar ataxia

- type 3: Potential biomarkers of preclinical detection and disease progression. *CNS Neurosci Ther*, 23, 321-328.
- WWW.DZNE.DE/FORSCHUNG/STUDIEN/KLINISCHE-STUDIEN/ESMI/. Available: <https://www.dzne.de/forschung/studien/klinische-studien/esmi/> [Accessed 12.04. 2020].
- WWW.GESETZE-IM-INTERNET.DE. Available: <http://www.gesetze-im-internet.de/gendg/index.html#BJNR252900009BJNE001500000> [Accessed 16.04. 2020].
- YORITAKA, A., NAKAGAWA-HATTORI, Y., HATTORI, N., KITAHARA, A. & MIZUNO, Y. 1999. A large Japanese family with Machado-Joseph disease: clinical and genetic analysis. *Acta Neurol Scand*, 99, 241-4.
- YOSHIZAWA, T., YAMAGISHI, Y., KOSEKI, N., GOTO, J., YOSHIDA, H., SHIBASAKI, F., SHOJI, S. & KANAZAWA, I. 2000. Cell cycle arrest enhances the in vitro cellular toxicity of the truncated Machado-Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch. *Hum Mol Genet*, 9, 69-78.
- YOSHIZAWA, T., YOSHIDA, H. & SHOJI, S. 2001. Differential susceptibility of cultured cell lines to aggregate formation and cell death produced by the truncated Machado-Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch. *Brain Res Bull*, 56, 349-52.
- YUAN, X., OU, R., HOU, Y., CHEN, X., CAO, B., HU, X. & SHANG, H. 2019. Extra-Cerebellar Signs and Non-motor Features in Chinese Patients With Spinocerebellar Ataxia Type 3. *Front Neurol*, 10, 110.
- YUASA, T., OHAMA, E., HARAYAMA, H., YAMADA, M., KAWASE, Y., WAKABAYASHI, M., ATSUMI, T. & MIYATAKE, T. 1986. Joseph's disease: clinical and pathological studies in a Japanese family. *Ann Neurol*, 19, 152-7.
- ZHONG, X. & PITTMAN, R. N. 2006. Ataxin-3 binds VCP/p97 and regulates retrotranslocation of ERAD substrates. *Hum Mol Genet*, 15, 2409-20.
- ZHOU, J., LEI, L., SHI, Y., WANG, J., JIANG, H., SHEN, L. & TANG, B. 2011. Serum concentrations of NSE and S100B in spinocerebellar ataxia type 3/Machado-Joseph disease. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 36, 504-10.
- ZHOU, Y. X., TAKIYAMA, Y., IGARASHI, S., LI, Y. F., ZHOU, B. Y., GUI, D. C., ENDO, K., TANAKA, H., CHEN, Z. H., ZHOU, L. S., FAN, M. Z., YANG, B. X., WEISSENBACH, J., WANG, G. X. & TSUJI, S. 1997. Machado-Joseph disease in four Chinese pedigrees: molecular analysis of 15 patients including two juvenile cases and clinical correlations. *Neurology*, 48, 482-5.
- ZHUCHENKO, O., BAILEY, J., BONNEN, P., ASHIZAWA, T., STOCKTON, D. W., AMOS, C., DOBYNS, W. B., SUBRAMONY, S. H., ZOGHBI, H. Y. & LEE, C. C. 1997. Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the alpha 1A-voltage-dependent calcium channel. *Nat Genet*, 15, 62-9.

Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Diese Arbeit wurde im Institut für Medizinische Genetik und angewandte Genomik unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. Olaf Rieß durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Frau Dr. rer. nat. Jeannette Hübener-Schmid (*Post-Doc*) und die Initiatoren des ESMI-Konsortiums unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Klockgether (Deutsches Zentrum für neurologische Erkrankungen, Universität Bonn). Die demographische und klinische Datenerhebung sowie die Kollektion der Blutproben wurde von den involvierten ESMI-Zentren Tübingen, Bonn, Nijmegen, London, Coimbra und Ponta Delgada (Azoren) übernommen.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Frau Dr. Jeannette Hübener-Schmid von mir durchgeführt. Für die Geno-/Haplotypen-Analysen wurden überwiegend bereits isolierte DNA-Lösungen verwendet. Bei sechs Proben erfolgte die DNA-Isolation aus EDTA-Blut durch mich selbst. Die Anzahl der von mir selbst analysierten Geno-/Haplotypen betrug für die ATXN3-SNPs Bp 987 120 und Bp 1118 61 Proben und für die PARK2-SNPs Bp 601 22, Bp 1239 32 und Bp 1281 79 Proben. Alle weiteren Geno-/Haplotypen, sowie die L-ATXN3-Level lagen aus bereits vorangegangenen Analysen durch andere Labormitglieder vor.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung von Frau Dr. Jeannette Hübener-Schmid eigenständig durch mich.

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

Tübingen, den 17.04.2021

Daniel Sturm

Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Olaf Rieß bedanken, der mir als Betreuer ermöglichte, an den Forschungsarbeiten im Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik mitzuwirken und in diesem Rahmen meine Promotion durchzuführen.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern des humangenetischen Labors in der Nägellestraße 5, für ihre freundliche Aufnahme, das kollegiale Miteinander und ihre stete Bereitschaft mir bei Fragen weiterzuhelfen. Für seine humorvollen Aufheiterungen an weniger erfolgreichen Labortagen möchte ich mich besonders bei Tim Knauf bedanken. Weiter danke ich Dr. Winfried Ilg und Eva Haas, die mir sehr interessante Einblicke in Bereiche der SCA3-Forschung gewährten, die über meine unmittelbaren Labortätigkeit hinausgingen und mir halfen meine Arbeit als kleines Puzzleteil in dem großen Puzzle der SCA3-Forschung zu sehen. Ich danke allen SCA3-Patienten und Probanden des ESMI-Projektes für ihre bereitwillige Teilnahme, sowie den ESMI-Zentren für die Bereitstellung der Daten und Blutproben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Jeannette Hübener-Schmid für die Vermittlung dieser Promotionsarbeit und ihrer hervorragenden Betreuung sowohl meiner praktischen Arbeiten im Labor als auch des gesamten Schreibprozesses. Ich bedanke mich für ihre geduldigen Erklärungen, für ihr stets zeitnahes Feedback und für ihr engagiertes Begleiten dieser Promotion, welches entscheidend zum Gelingen beigetragen hat.

Abschließend danke ich meiner Familie, die an dieser Arbeit ständigen Anteil genommen hat, sich mit mir über jeden Fortschritt gefreut hat und mich in Phasen schwindender Motivation stets ermutigt hat.