

Aus dem

Department für Diagnostische Labormedizin

der Universität Tübingen

Institut für Medizinische Genetik und angewandte Genomik

**Untersuchung des Einflusses des Parkinson-  
assoziierten Proteins Parkin auf die Pathogenese der  
Spinocerebellären Ataxie Typ 3**

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

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

**vorgelegt von**

**Roth, Kira**

**2024**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. O. Rieß

2. Berichterstatter: Professor Dr. C. Laske

Tag der Disputation: 27.08.2024

*Meiner Familie*

## I. INHALTSVERZEICHNIS

II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	7
III. TABELLENVERZEICHNIS .....	9
IV. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	12
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Die Spinozerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3) .....	1
1.2 Biomarker und Scores/Klinische Symptomatik .....	7
1.3 Parkinsonismus in SCA3-Patienten .....	9
1.4 Diagnostik und Therapie der SCA3.....	10
1.5 Ataxin-3 Protein .....	12
1.6 Parkinson-assoziiertes Protein Parkin .....	16
1.7 Parkin und seine Interaktion mit Ataxin-3 .....	19
1.8 Ziele dieser Arbeit.....	20
2 MATERIAL UND METHODEN.....	23
STATEMENT ZUM ETHIKVOTUM.....	23
2.1 <b>Material</b> .....	23
2.1.1 Mäuse .....	23
2.1.2 Probanden .....	25
2.1.3 Geräte und Zubehör.....	26
2.1.4 Verbrauchsmaterialien .....	28
2.1.5 Chemikalien und Reagenzien .....	29
2.1.6 Puffer und Lösungen.....	31
2.1.7 Lösungen für die Silbernitratfärbung .....	33
2.1.8 Primer .....	34
2.1.9 Restriktionsenzyme .....	35
2.1.10 Programme .....	35
2.1.11 Antikörper Westernblot.....	36
2.1.12 Sekundärantikörper.....	36
2.1.13 Antikörper TR-FRET .....	37
2.2 <b>Methoden</b> .....	38
<b>Molekularbiologische Methoden</b> .....	39
<b>DNA-Methoden</b> .....	39
2.2.1 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung .....	39
2.2.2 Polymorphismenbestimmung.....	40
2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur DNA-Amplifizierung.....	40
2.2.4 APOE PCR.....	44
2.2.5 Restriktionsfragmentlängenanalyse (RFLP).....	45
2.2.6 Enzymatische Auftrennung .....	47
2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese .....	48
2.2.8 PAGE-Gelelektrophorese.....	49
2.2.9 Färbung mit Etbr bei APOE-Bestimmung.....	51
2.2.10 Färbung mit Silbernitrat bei APOE-Bestimmung .....	51
<b>Proteinbiochemische Methoden</b> .....	52
2.2.11 Lyse Mononukleärer Zellen des Peripheren Blutes (PBMC) .....	52
2.2.12 Proteinbestimmung nach Bradford.....	53
2.2.13 Western Blot Analysen.....	54

2.2.14 Vorbereitung der Proben.....	54
2.2.15 SDS-Page .....	55
2.2.16 Western Blot.....	57
2.2.17 Antikörperinkubation .....	58
2.2.18 Proteinbestimmung mittels Förster-Resonanz-Energietransfer (TR-FRET) .....	59
<b>2.3 Statistik</b> .....	61
2.3.1 Verwendete Tests zur statistischen Analyse.....	61
<b>3 ERGEBNISSE</b> .....	63
<b>TEIL A:</b> .....	65
<b>Kreuzung eines SCA3 Mausmodells und Parkin knockout Modells zur Aufklärung des Einflusses von Parkin auf die Pathogenese der SCA3</b> .....	65
<b>3.1 Auswertung der Metabolomdaten des Mausmodells</b> .....	69
3.1.1 Vergleich Metabolomdaten der Mutanten mit den WT-Mäusen ....	76
3.1.2 Vergleich der Daten mit den Ergebnissen von Toonen et al. ....	81
3.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse aus 3.1.....	84
<b>3.2 Auswertung der Verhaltensanalyse des Mausmodells</b> .....	85
3.2.1 Körpergewichtsmessung.....	85
3.2.2 RotaRod Test zur Analyse der Balance und Koordination .....	88
3.2.3 CatWalk Ganganalyse von Fußabdruck und Laufmuster.....	94
3.2.4 LabMaster System zur longitudinalen Analyse von Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme, Aktivität und Angstverhalten .....	116
3.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse aus 3.2.....	131
<b>TEIL B:</b> .....	139
<b>Untersuchung des Einflusses des Proteins Parkin auf die Protein- Level und den Phänotyp in SCA3-Patienten</b> .....	139
<b>3.3 Analyse des Proteins Parkin in ESMI-Probanden</b> .....	139
3.3.1 Untersuchung der Parkin Protein-Level .....	142
3.3.2 Vergleich der Parkin Protein-Level zwischen Kontrollen und Mutationsträgern .....	143
3.3.3 Vergleich der Parkin Protein-Level in Kontrollen, nicht atakt. MT und atakt. MT .....	145
3.3.4 Vergleich der Parkin Protein-Level zwischen Männern und Frauen .....	146
3.3.5 Vergleich der Parkin Protein-Level zwischen und innerhalb der Entnahmezentren (Azoren, Bonn, Coimbra, Groningen/Nijmegen, London, Tübingen).....	147
3.3.6 Zusammenhang zwischen den Parkin Protein-Leveln und den PARK2 SNPs .....	158
3.3.7 Longitudinale Entwicklung der Parkin Protein-Level über 5 Jahre .....	164
3.3.8 Zusammenfassung der Ergebnisse aus 3.3.....	167
<b>3.4 Analyse klinischer Daten in SCA3-Patienten</b> .....	171
3.4.1 SCA3-Patienten mit Medikamenteneinnahme zur Behandlung von PD-Symptomen.....	174
3.4.2 Geschlecht der Probanden mit PD-Medikation .....	179
3.4.3 Alter der Probanden mit PD-Medikation.....	180

3.4.4 Vergleich der Parkin Protein-Level in PBMCs zwischen Kontrollen und MT in Bezug auf die Medikation .....	182
3.4.5 Vergleich der PARK2 SNPs in PBMCs zwischen Kontrollen und MT in Bezug auf die Medikation .....	183
3.4.6 Untersuchung der Probanden mit PD-Medikation auf ihre Einteilung in die INAS-Untergruppen .....	185
3.4.7 Zusammenhang PD-Medikation und CAG-Wiederholungen des mutierten ATXN3-Gens .....	191
3.4.8 Untersuchung der SCA3-Patienten mit klinischen Daten für den SARA-Untergruppe 7 .....	192
3.4.9 Zusammenfassung der Ergebnisse aus 3.4 .....	196
<b>4 DISKUSSION .....</b>	<b>201</b>
<b>4.1 TEIL A: Mausmodell .....</b>	<b>202</b>
4.1.1 Auswertung der Metabolomdaten des Mausmodells.....	202
4.1.2 Verhaltensanalyse des Mausmodells und Einfluss von Parkin auf die klinische Pathogenese der SCA3 .....	210
<b>4.2 TEIL B: ESMI-Probanden .....</b>	<b>216</b>
4.2.1 Analyse der Parkin Protein-Level in SCA3 Patienten.....	216
4.2.2 Analyse klinischer Daten in SCA3 Patienten.....	223
<b>4.3 Fazit und Ausblick .....</b>	<b>231</b>
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>235</b>
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>237</b>
<b>7 ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL DER DISSERTATIONSSCHRIFT .....</b>	<b>259</b>
<b>8 DANKSAGUNG .....</b>	<b>261</b>
<b>9 ANLAGEN IM ANHANG .....</b>	<b>263</b>

## II. Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG ATAXIN-3-PROTEIN .....	13
ABBILDUNG 2: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES PARKIN-PROTEINS.....	16
ABBILDUNG 3: INTERAKTION DER PROTEINE PARKIN UND ATAXIN-3 .....	19
ABBILDUNG 4: ZUSAMMENFASSUNG DER VORHANDENEN MATERIALIEN UND DURCHGEFÜHRTEN METHODEN SOWIE DIE DADURCH ERHOBENEN PARAMETER .	38
ABBILDUNG 5: ZUSAMMENFASSUNG DER VORHANDENEN MATERIALIEN UND DURCHGEFÜHRTEN METHODEN SOWIE DIE DADURCH ERHOBENEN PARAMETER .	39
ABBILDUNG 6: ÜBERSICHTSDIAGRAMM ZUR DARSTELLUNG DER 2 TEILE DIESER ARBEIT .....	64
ABBILDUNG 7: ÜBERSICHT DER ANHAND DES MAUSMODELLS DURCHGEFÜHRTEN ANALYSEN .....	68
ABBILDUNG 8: ZEITSTRAHL DER AM MAUSMODELL DURCHGEFÜHRTEN METHODEN ...	68
ABBILDUNG 9: ZUSAMMENFASSUNG SIGNIFIKANTER METABOLITE .....	71
ABBILDUNG 10: KÖRPERGEWICHTMESSUNG IM ZWEIWÖCHENTLICHEN RHYTHMUS ...	88
ABBILDUNG 11: TRAININGSVERLAUF ROTAROD AN DEN EINZELNEN TRAININGSTAGEN .....	89
ABBILDUNG 12: ROTAROD MÄNNCHEN UND WEIBCHEN IM VERGLEICH .....	91
ABBILDUNG 13: CATWALK 12 MONATE: VORDER- UND HINTERPFOTENABSTAND, DURCHSCHNITTSGESCHWINDIGKEIT, SCHRITZZAHL, REGELMÄßIGKEITSINDEX ...	97
ABBILDUNG 14: CATWALK 12 MONATE: GESCHLECHTSGEMISCHTE BETRACHTUNG DES SCHRITZZYKLUS UND DES ABDRUCKBEREICHES DER RECHTEN VORDER- UND HINTERPFOTE .....	98
ABBILDUNG 15: CATWALK 12 MONATE: GESCHLECHTSGEMISCHTE BETRACHTUNG DES SCHRITZZYKLUS UND DES ABDRUCKBEREICHES DER LINKEN VORDER- UND HINTERPFOTEN .....	99
ABBILDUNG 16: CATWALK 12 MONATE: SCHRITZZYKLUS UND ABDRUCKBEREICH RECHTE UND LINKE VORDER- UND HINTERPFOTE GETRENNT NACH MÄNNCHEN UND WEIBCHEN.....	101
ABBILDUNG 17: CATWALK 15 MONATE: VORDERPFOTEN-, HINTERPFOTENABSTAND, DURCHSCHNITTSGESCHWINDIGKEIT, SCHRITZZAHL, REGELMÄßIGKEITSINDEX .	105
ABBILDUNG 18: CATWALK 15 MONATE: GESCHLECHTSGEMISCHT, SCHRITZZYKLUS UND ABDRUCKBEREICH RECHTE VORDER- UND HINTERPFOTE .....	107
ABBILDUNG 19: CATWALK 15 MONATE: GESCHLECHTSGEMISCHT LINKE VORDER- UND HINTERPFOTE .....	108
ABBILDUNG 20: CATWALK 15 MONATE: SCHRITZZYKLUS UND ABDRUCKBEREICH DER RECHTEN UND LINKEN PFOTEN .....	110
ABBILDUNG 21: LABMASTER ZUM ZEITPUNKT VON 3 MONATEN .....	117
ABBILDUNG 22: LABMASTER DISTANZ IN CM/M IN DEN ERSTEN 20 MIN, ANPASSUNG AN EINE NEUE UMGEBUNG .....	119
ABBILDUNG 23: VERLAUF HORIZONTALE, VERTIKALE AKTIVITÄT UND DISTANZ ÜBER 70 STUNDEN .....	121
ABBILDUNG 24: VERLAUF HORIZONTALE, VERTIKALE AKTIVITÄT UND DISTANZ ÜBER 70 STUNDEN, ZEITPUNKT 9 MONATE .....	123
ABBILDUNG 25: NAHRUNGS- UND FLÜSSIGKEITSAUFNAHME IM ALTER VON 3 MONATEN .....	125

ABBILDUNG 26: AUSSCHNITT KÖRPERGEWICHT MÄNNCHEN UND WEIBCHEN VON 0-20 WOCHEN .....	126
ABBILDUNG 27: NAHRUNGS-AUFNAHME UND FLÜSSIGKEITS-AUFNAHME MIT 9 MONATEN .....	128
ABBILDUNG 28: AUSSCHNITT KÖRPERGEWICHT MÄNNCHEN UND WEIBCHEN 30-42 WOCHEN .....	129
ABBILDUNG 29: ÜBERSICHT ÜBER DIE IN ESMI-PROBANDEN DURCHGEFÜHRTE ANALYSEN .....	141
ABBILDUNG 30: ANALYSE DER PARKIN PROTEIN-EXPRESSION IN PBMCs MITTELS WESTERN BLOT ANALYSE .....	142
ABBILDUNG 31: PARKIN PROTEIN-LEVEL IM VERGLEICH ZWISCHEN KONTROLLEN UND MT .....	144
ABBILDUNG 32: PARKIN PROTEIN-LEVEL IM VERGLEICH ZWISCHEN KONTROLLEN UND NICHT ATAKT. MT UND ATAKT. MT .....	145
ABBILDUNG 33: PARKIN PROTEIN-LEVEL IM VERGLEICH ZWISCHEN MÄNNLICHEN UND WEIBLICHEN PROBANDEN .....	146
ABBILDUNG 34: VERGLEICH DER PARKIN PROTEIN-LEVEL DER PROBANDEN ALLER ENTNAHMEZENTREN .....	149
ABBILDUNG 35: ÜBERSICHT PARKIN PROTEIN-LEVEL DER EINZELNEN ZENTREN MIT KONTROLLEN, NICHT ATAKT. MT UND ATAKT. MT .....	151
ABBILDUNG 36: VERGLEICH DER PARKIN PROTEIN-LEVEL AZOREN: KONTROLLEN, NICHT ATAKTISCHE MT UND ATAKTISCHE MT .....	152
ABBILDUNG 37: VERGLEICH DER PARKIN PROTEIN-LEVEL BONN: KONTROLLEN, NICHT ATAKTISCHE MT UND ATAKTISCHE MT .....	153
ABBILDUNG 38: VERGLEICH DER PARKIN PROTEIN-LEVEL COIMBRA: KONTROLLEN, NICHT ATAKTISCHE MT UND ATAKTISCHE MT .....	154
ABBILDUNG 39: VERGLEICH DER PARKIN PROTEIN-LEVEL GRONINGEN: KONTROLLEN, NICHT ATAKTISCHE MT UND ATAKTISCHE MT .....	155
ABBILDUNG 40: VERGLEICH DER PARKIN PROTEIN-LEVEL LONDON: KONTROLLEN, NICHT ATAKTISCHE MT UND ATAKTISCHE MT .....	156
ABBILDUNG 41: PARKIN PROTEIN-LEVEL TÜBINGEN: KONTROLLEN, NICHT ATAKTISCHE MT UND ATAKTISCHE MT .....	157
ABBILDUNG 42: BESTIMMUNG DER PARK2 SNPs MITTELS AGAROSE- GELELEKTROPHORESE .....	159
ABBILDUNG 43: ZUSAMMENHANG ZWISCHEN PARKIN PROTEIN-LEVELN UND PARK2 SNPs .....	160
ABBILDUNG 44: DARSTELLUNG DER PARKIN PROTEIN-LEVEL FÜR EXON 4 BP 601..	163
ABBILDUNG 45: DARSTELLUNG DER PARKIN PROTEIN-LEVEL FÜR EXON 10 BP 1239 .....	163
ABBILDUNG 46: DARSTELLUNG DER PARKIN PROTEIN-LEVEL FÜR EXON 11 BP 1281 .....	164
ABBILDUNG 47: PARKIN PROTEINLEVEL HÖHE BEI LONGITUDINALEM VISITENVERGLEICH ÜBER 5 JAHRE .....	165
ABBILDUNG 48: PARKIN PROTEIN-LEVEL BEI DEN EINZELNEN VISITEN IM LONGITUDINALEN VERGLEICH ÜBER 5 JAHRE .....	166
ABBILDUNG 49: PROBANDEN MIT PD-MEDIKATION, MIT MEDIKATION (ABER NICHT PD) UND OHNE MEDIKATION .....	177

ABBILDUNG 50: ANZAHL DER MÄNNLICHEN UND WEIBLICHE PROBANDEN (MT UND KONTROLLEN) MIT PD-MEDIKATION, MIT ANDERER MEDIKATION UND OHNE (BEKANNTE) MEDIKATION.....	180
ABBILDUNG 51: ALTER DER PROBANDEN MIT PD-MEDIKATION, MIT ANDERER MEDIKATION UND OHNE (BEKANNTE) MEDIKATION .....	181
ABBILDUNG 52: HÖHE DER PARKIN PROTEIN-LEVEL BEI PROBANDEN (MT UND KONTROLLEN) MIT PD-MEDIKATION, OHNE PD-MEDIKATION UND OHNE (BEKANNTE) MEDIKATION .....	182
ABBILDUNG 53: SNP-VERTEILUNG DER PROBANDEN MIT PD-MEDIKATION .....	184
ABBILDUNG 54: INAS-UNTERGRUPPEN .....	189
ABBILDUNG 55: INAS-UNTERGRUPPEN .....	190
ABBILDUNG 56: ANZAHL DER CAG-WIEDERHOLUNGEN DES MUTIERTEN ATXN3-GENS BEI MT MIT PD-MEDIKATION, OHNE PD-MEDIKATION (ANDERER MEDIKATION) UND OHNE (BEKANNTE) MEDIKATION .....	192

### III. Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: ZUSAMMENFASSENDE TABELLE DER VERSCHIEDENEN GENOTYPEN MIT ABKÜRZUNG, GEN, GENOTYP UND REFERENZ .....	24
TABELLE 2: ÜBERSICHT DER VERWENDETEN GERÄTE MIT HERSTELLERANGABE .....	26
TABELLE 3: ÜBERSICHT DER VERWENDETEN VERBRAUCHSMATERIALIEN MIT HERSTELLERANGABE.....	28
TABELLE 4: ÜBERSICHT DER VERWENDETEN CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN MIT HERSTELLERANGABE.....	29
TABELLE 5: ÜBERSICHT DER VERWENDETEN PUFFER UND LÖSUNGEN MIT IHRER ZUSAMMENSETZUNG .....	31
TABELLE 6: LÖSUNGEN UND IHRE ZUSAMMENSETZUNG FÜR DIE SILBERNITRATFÄRBUNG DER AUFGETRENNTEN APOE DNA FRAGMENTE NACH ENZYMATISCHER AUFTRENNUNG UND PAGE.....	33
TABELLE 7: ÜBERSICHT DER VERWENDETEN PRIMER, IHRER SEQUENZ UND DER DER SEQUENZIERRICHTUNG.....	34
TABELLE 8: RESTRIKTIONSENZYME, ZUGEHÖRIGER PUFFER, OPTIMALE ARBEITSTEMPERATUR, ERKENNUNGSSEQUENZ UND ZUGEHÖRIGER HERSTELLERANGABE.....	35
TABELLE 9: ÜBERSICHT DER VERWENDETEN PROGRAMME UND SOFTWARES UND HERSTELLERANGABE.....	35
TABELLE 10: ANTIKÖRPER FÜR DEN WESTERNBLOT MIT ZUGEHÖRIGEN ANTIKÖRPERN, ANTIGEN, KONZENTRATION, SPEZIES, HERSTELLERN UND ARTIKELNUMMERN ...	36
TABELLE 11: SEKUNDÄRANTI-KÖRPER MIT DEM ZUGEHÖRIGEN ANTIGEN, SPEZIES, KONZENTRATION UND HERSTELLERANGABE .....	36
TABELLE 12: ÜBERSICHT DER VERWENDETEN ANTIKÖRPER, IHREM IMMUNOGEN, HERSTELLER UND DER ZUGEHÖRIGEN ARTIKELNUMMER .....	37
TABELLE 13: ÜBERSICHT DES PCR-ANSATZES ZUR AMPLIFIZIERUNG DER SNPs BP601, BP1239, BP1281 .....	41

TABELLE 14: ÜBERSICHT DER PRIMER ZUR AMPLIFIKATION DER SNPs BP601, BP1239, BP1281 MIT DER JEWELIGEN LAUFRICHTUNG, SEQUENZ, DER FRAGMENTGRÖÙE (BP) UND DER GENAUEN LAGE DER BASENPAARE (BP).....	42
TABELLE 15: ÜBERSICHT ÜBER DAS PROGRAMM DES G-STORM THERMOZYKLEERS ZUR AMPLIFIKATION DER SNP BP601, BP 1239, BP1281 .....	43
TABELLE 16: ÜBERSICHT DES PCR-ANSATZES ZUR AMPLIFIZIERUNG SNPs APOE .	44
TABELLE 17: ÜBERSICHT DES PROGRAMMS DES G-STORM THERMOZYKLEERS ZUR AMPLIFIKATION SNP APOE.....	44
TABELLE 18: RESTRIKTIONSENZYME ZUR AUFTRENNUNG DER DNA IN REGIO DER SNP BP601, BP1239, BP1281 .....	46
TABELLE 19: DIE 6 VERSCHIEDENEN GENOTYPEN DES APOE-GENS.....	47
TABELLE 20: ÜBERSICHT DER INHALTE ZUR HERSTELLUNG DER ENZYMATISCHEN AUFTRENNUNG DER POLYMORPHISMEN IN APOE .....	47
TABELLE 21: ÜBERSICHT DES PROGRAMMS FÜR DEN G-STORM THERMOZYKLER FÜR DIE ENZYMATISCHE AUFTRENNUNG DER POLYMORPHISMEN IN APOE .....	48
TABELLE 22: ÜBERSICHT DES INHALTS FÜR EIN AGAROSEGEL 1,5%, KLEIN .....	49
TABELLE 23: INHALTE FÜR DIE HERSTELLUNG DES 10%IGEN ACRYLAMID-GELS .....	50
TABELLE 24: HERSTELLUNG DER DNA-LEITER ZUM VERGLEICH DER RESTRIKTIONSFRAGMENTE IN APOE .....	50
TABELLE 25: VORGEHEN BEI DER SILBERNITRATFÄRBUNG MIT DEN JEWELIGEN LÖSUNGEN UND DER ZUGEHÖRIGEN INKUBATIONSZEIT (IN MINUTEN) .....	52
TABELLE 26: GELZUSAMMENSETZUNG FÜR SDS-PAGE .....	56
TABELLE 27: ZUSAMMENFASSUNG DER DEN DURCHGEFÜHRTEN ANALYSEN ZUGRUNDELIEGENDEN VERWENDETEN MAUSMODELLE MIT IHRER BEZEICHNUNG, DER JEWELIGEN ABKÜRZUNG UND DER ZUGEHÖRIGEN EXPRIMIERTEN GENE.....	67
TABELLE 28: ZUSAMMENFASSUNG DER AM HÄUFIGSTEN VORGEKOMMENEN METABOLITE IM PLASMA MIT ANZAHL UND ZUGEHÖRIGEM PROZENTANTEIL, (NA=NICHT ANALYSIERT) .....	72
TABELLE 29: ZUSAMMENFASSUNG DER PATHWAYS MIT DEN HÄUFIGSTEN SIGNIFIKANZEN FÜR DAS PLASMA MIT EINER AUZÄHLUNG DER ANZAHL, SIGNIFIKANZ, NAH AN SIGNIFIKANZ UND NICHT SIGNIFIKANT, (NA=NICHT ANALYSIERT).....	74
TABELLE 30: ZUSAMMENFASSUNG DER AM HÄUFIGSTEN VORGEKOMMENEN METABOLITE IM CEREBELLUM MIT ANZAHL UND ZUGEHÖRIGEM PROZENTANTEIL, (NA=NICHT ANALYSIERT) .....	75
TABELLE 31: ZUSAMMENFASSUNG ALLER SIGNIFIKANTEN PATHWAYS IM CEREBELLUM MIT EINER AUZÄHLUNG DER ANZAHL, SIGNIFIKANZ, NAH AN SIGNIFIKANZ UND NICHT SIGNIFIKANT, (NA=NICHT ANALYSIERT) .....	75
TABELLE 32: HÄUFIGKEIT DER SIGNIFIKANZEN ( $P \leq 0,05$ ) UND NAH AN SIGNIFIKANZ ( $P \leq 0,08$ ), PRO VERGLEICHENEN GENOTYP, MIT ENTNAHMESTELLE UND ZEITPUNKT DER ENTNAHME .....	76
TABELLE 33: VERGLEICH DATENERHEBUNG MIT TOONEN ET AL. (ANZAHL TIERE, ENTNAHMEZEITPUNKT, ENTNAHMEORT, DATENERHEBUNG, ANZAHL METABOLITE, ANZAHL DER SIGNIFIKANZEN) .....	82
TABELLE 34: ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE AUS 3.1. ....	84
TABELLE 35: GEMEINSAMKEITEN UND UNTERSCHIEDE CATWALK ZWISCHEN 12 UND 15 MONATE ALTEN TIEREN .....	114
TABELLE 36: ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE DER VERHALTENSANALYSE....	131

TABELLE 37: DEMOGRAFISCHE UND KLINISCHE EIGENSCHAFTEN DER PROBANDEN (KONTROLLEN, NICHT ATAKT. MT, ATAKT. MT) IN DER ANALYSIERTEN ESMI-KOHORTE .....	140
TABELLE 38: ANZAHL PROBANDEN FÜR EINZELNE ZENTREN, AUFGETEILT IN KONTROLLEN, NICHT ATAKT. MT UND ATAKT. MT .....	148
TABELLE 39: ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE AUS ABSCHNITT 3.3.....	168
TABELLE 40: DEMOGRAFISCHE UND KLINISCHE EIGENSCHAFTEN DER PROBANDEN (SCA3 PATIENTEN MIT PD-MEDIKATION, MT UND KONTROLLEN MIT ANDEREN MEDIKAMENTEN, MT MIT ANDEREN MEDIKAMENTEN, MT MIT KONTROLLEN OHNE MEDIKAMENTENEINNAHME UND MT OHNE MEDIKAMENTENEINNAHME) IN DER ANALYSIERTEN ESMI-KOHORTE DIE AUF KLINISCHE DATEN UNTERSUCHT WURDEN .....	173
TABELLE 41: AUFLISTUNG DER BERÜCKSICHTIGTEN PARKINSONMEDIKAMENTE ZUR EINTEILUNG DER PROBANDEN UND ANZAHL DER PROBANDEN, DIE DIESE MEDIKAMENTE EINNEHMEN .....	175
TABELLE 42: PROBANDEN MIT PD-MEDIKATION UND ANZAHL DER PARK2 SNPs JE GENOTYP .....	184
TABELLE 43: ÜBERSICHT DER INAS-UNTERGRUPPEN MIT ANZAHL DER PROBANDEN DIE IN DEN JEWEILIGEN INAS-UNTERGRUPPEN SYMPTOME ZEIGTEN, SOWIE DEREN MEDIKATION EINGETEILT IN (1) MIT PD-MEDIKAMENTEN, (2) OHNE PD-MEDIKAMENTE UND (3) OHNE (BEKANNTE) MEDIKATION (IN %) UND (4) DIE ANZAHL DER PROBANDEN INSGESAMT DIE IM JA/NEIN ENTSCHEID EIN „JA“ DER JEWEILIGEN INAS-UNTERGRUPPE HATTEN.....	186
TABELLE 44: VERGLEICH VON SARA 0-1 (L), 1,5-2,5 (LL), 3-4 (LLL) BEZÜGLICH ANZAHL, GESCHLECHT, ALTER, PD-MEDIKAMENTE, INAS 10 UND 13, RLS, RLS-MEDIKATION. DABEI WERDEN NUR SCA3-PATIENTEN MIT PD-MEDIKATION EINBEZOGEN. ....	194
TABELLE 45: ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE AUS 3.4. ....	196
TABELLE 46: VERGLEICH DER SIGNIFIKANZEN DER DATEN TOONEN ET AL MIT UNSEREN ERGEBNISSEN MIT ANGABE DES ENTNAHMEORTES, ENTNAHMEZEITPUNKT UND SIGNIFIKANZ (IN P).....	205
TABELLE 47: VERGLEICH AAO, CAG-WIEDERHOLUNGSANZAHL, SARA-SCORE, INAS-SCORE ZWISCHEN KONTROLLEN, NICHT ATAKT. MT, ATAKT. MT UND SCA3 PATIENTEN MIT PD-MEDIKATION, MUTATIONSTRÄGER MIT ANDEREN MEDIKAMENTEN UND MT OHNE MEDIKAMENTENEINNAHME .....	227

#### IV. Abkürzungsverzeichnis

AAO	<i>Age at Onset</i>
AB	Abdruckbereich
AD	Alzheimer Erkrankung
ADCA	Autosomal dominant zerebelläre Ataxie
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
APOE	Apolipoprotein E
ARJP	autosomal-rezessiver juveniler Parkinson
AS	Aminosäure
ATXN3	Ataxin-3
BL	<i>Baseline</i>
BMI	<i>Body Mass Index</i>
Bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
CSF	Cerebrospinal fluid
dm	double mutant
DRPLA	Dentatorubrale-pallidolysiale Atrophie
DTT	Dithiothreitol
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	Endoplasmatischen Retikulum assoziierte Degradation
Etbr	Ethidiumbromid
FC	Foldchange
HD	Chorea Huntington Erkrankung
INAS	<i>Inventory of Non-Ataxia Signs</i>
LDS	Lithium Dodecyl Sulfat
MJD	Machado-Joseph-Erkrankung
MRS	Magnetresonanzspektroskopie
MRT	Magnet-Resonanz-Tomographie
MT	Mutationsträger
mtDNA	mitochondriale DNA
NA	nicht analysiert
NES	nukleäres Exportsignal
NFL	Neurofilament leichte Ketten
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
NV	Nachvisite
PBMC	Mononukleäre Zellen des Peripheren Blutes
PD	Parkinsonerkrankung
PolyQ	Polyglutamin
rcf	relative Zentrifugenkraft
RFLP	Restriktionsfragmentlängenanalyse
RLS	<i>Restless-Leg Syndrom</i>
RT	Raumtemperatur
SARA	<i>Scale for the assessment and rating of ataxia</i>
SBMA	spinobulbäre Muskelatrophie
SCA3	Spinozerebelläre Ataxie Typ 3
SDS-Page	Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese
SNP	Einzelnukeotid-Polymorphismen

SZ	Schrittzyklus
TR-FRET	<i>Time-resolved fluorescence resonance energy transfer</i>
UIM	Ubiquitin-interagierende Motive
WT	Wildtyp
YAC	<i>Yeast artificial chromosome</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Spinozerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3)

Bei der Spinozerebellären Ataxie Typ 3 (SCA3) handelt es sich um eine neurodegenerative Erkrankung, die auch unter dem Namen Machado-Joseph-Erkrankung (MJD) bekannt ist. Zugrunde liegt eine Mutation auf dem *ATXN3-/MJD1*-Gen. Es handelt sich bei der SCA3 um eine autosomal dominant vererbte Erkrankung, die zum Formenkreis der zerebellären Ataxien gehört (autosomal dominante zerebelläre Ataxie (ADCA). Ursächlich für diese Mutation ist auf molekulargenetischer Ebene die Expansion der CAG-Wiederholungen im *Ataxin-3*-Gen (*ATXN3*) (*ATXN3*-Gen), welches sich auf dem Chromosom 14q32.1 befindet. Bei gesunden Individuen enthält das *ATXN3*-Gen lediglich 13-36 CAG-Wiederholungen. Ein Krankheitsausbruch äußert sich hingegen mit 55-86 CAG-Wiederholungen, was eine deutliche Verlängerung der Basentriplets darstellt (Adegbuyiro et al., 2017; Kawaguchi et al., 1994; Maruyama et al., 1995). Je nach Quelle variiert die Angabe der CAG-Wiederholungen für Träger der Mutation (Bettencourt & Lima, 2011; Schols et al., 1996). Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass sich in einem intermediären Bereich von 45-54 CAG-Wiederholungen eine unvollständige Penetranz zeigt. Dementsprechend kommt es nicht zwingend zu einer Manifestation der Erkrankung (Ashizawa et al., 2018). Es kommt vor, dass sich sowohl symptomatische als auch asymptotische Träger, sowie Träger mit peripher-nervösen, jedoch ohne zentral-nervöse Symptome, in dieser Gruppe befinden (Gu et al., 2004; Maciel et al., 2001; Padiath et al., 2005; Riess et al., 2008; van Alfen et al., 2001). Diese Annahme unterstützend wurde bereits für Chorea Huntington ein intermediärer Bereich an Triplet-Wiederholungen festgestellt, bei dem sich bei diesen Patienten ebenfalls eine unvollständige Penetranz in der Krankheitsausprägung zeigt (Rubinsztein et al., 1996).

Diese CAG-Verlängerung resultiert in der fehlerhaften Synthese des Ataxin-3 Proteins und somit in abnormal langen Polyglutamin (PolyQ) Veränderungen. Diese führen folgend zu einer Proteinefehlbildung mit Aggregation und

anschließenden nukleären sowie zytoplasmatischen Einschlüssen in neuronalen Zellen (Burnett & Pittman, 2005; Paulson, Perez, et al., 1997).

Die SCA3 zählt aufgrund dessen zu den Polyglutamin-Erkrankungen. Fehlgefaltete und aggregierte Proteine sind charakteristisch für PolyQ-Erkrankungen, wie sie beispielsweise auch bei SCA1,2,6,7,17, Dentatorubrale-pallidolysiale Atrophie (DRPLA) und bei spinobulbärer Muskelatrophie (SBMA) vorkommen (Klockgether et al., 2019). Diese PolyQ-Erkrankungen zeigen zwar ähnliche und teilweise auch gleiche Pathomechanismen, ihnen liegen aber unterschiedlich fehlgefaltete Proteine zugrunde. Beispielsweise handelt es sich bei allen genannten Erkrankungen, ausgenommen SBMA (welche X-chromosomal vererbt wird und somit geschlechtslimitiert ist), um autosomal dominant vererbte Krankheiten, bei denen häufig das Zentrale Nervensystem (ZNS) betroffen ist. Aufgrund der autosomal dominanten Vererbung ist für eine Erkrankung bereits die Mutation auf nur einem der beiden Allele ausschlaggebend. Daher sind die meisten SCA3-Patienten lediglich heterozygote Mutationsträger (Paulson & Shakkottai, 1993). Dennoch wurden auch von einigen homozygoten Mutationsträgern berichtet, bei welchen zwei Kopien des expandierten mutierten *ATXN3*-Gens detektiert werden konnten. Auffällig dabei ist, dass dies zu einem phänotypisch schwereren Krankheitsverlauf und einem früheren Krankheitsbeginn führt (Lang et al., 1994; Li et al., 2020; Lysenko et al., 2010).

Fehlgefaltete Proteine kommen aber auch in diversen anderen neurodegenerativen Erkrankungen wie beispielsweise Alzheimer (AD), Huntington (HD), Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) und Parkinson (PD) vor (Ross & Poirier, 2004).

Normalerweise liegt der Krankheitsbeginn der PolyQ-Erkrankungen erst im Erwachsenenalter und ist mit einer langsamen Progression vergesellschaftet. Zudem haben die PolyQ-Erkrankungen gemeinsam, dass weiterhin eine bewährte Therapie zur Behandlung dieser Erkrankungen fehlt (Paulson et al., 2017).

Die SCA3 ist weltweit die häufigste Erkrankung der ADCA mit einer Prävalenz von 2,7/100.000 (Ruano et al., 2014) und ist mit einem Anteil von 20-50 % in Deutschland im Rahmen der ADCAs vertreten (Hersheson et al., 2012; Paulson, 2007; Whaley et al., 2011).

Mit einem Erkrankungsalter zwischen der dritten und fünften Lebensdekade, zählt die SCA3 generell zu den spät manifestierenden ADCAs (Harding, 1987).

Die Schwere der Erkrankung und somit auch die klinische Ausprägung wird durch die Länge der CAG-Wiederholungen in direkter Weise beeinflusst. Die Anzahl der CAG-Wiederholungen zeigt ebenfalls einen proportionalen Einfluss auf das Erkrankungsalter (Age at Onset (AAO)) (Durr et al., 1996). Jedoch gibt es eine große Varianz bezüglich des AAO. Es wurde von einem Erkrankungsbeginn sowohl mit 5 als auch mit 70 Jahren berichtet. Teilweise sind diese Unterschiede auf die CAG-Wiederholungslänge zurückzuführen, denn längere CAG-Wiederholungen stehen häufig mit einem früheren Erkrankungsbeginn in Zusammenhang (Subramony & Currier, 1996).

Die Anzahl der CAG-Wiederholungen kann jedoch nicht gänzlich das AAO erklären, lediglich zu einem Prozentsatz von 45-62 %. Es besteht eine Varianz des AAO, die sich unabhängig der Länge der CAG-Wiederholungen darstellt, und innerhalb von Familien eine geringere Varianz aufweist als zwischen Individuen unterschiedlicher Familien. Aufgrund dieser Beobachtungen scheint es wahrscheinlich, dass zusätzliche Umwelteinflüsse und genetische Faktoren ebenfalls eine beteiligende Rolle spielen (Akcimen et al., 2020; Schmitz-Hubsch et al., 2008; B. P. C. van de Warrenburg et al., 2005). Zusätzlich konnte eine Instabilität dieser Verlängerung besonders seitens der paternalen Vererbung (in der männlichen Meiose) beobachtet werden. Es kann also zu weiteren Verlängerungen des CAG-Basentriplets in der folgenden Generation kommen. Dieser Effekt wird Antizipation genannt (Donis et al., 2016; Igarashi et al., 1996) und entsteht vorwiegend durch Reparaturmechanismen, die jedoch im Laufe der Zelllinie zu einer Verlängerung führen (Schmidt & Pearson, 2016). Dadurch zeigt sich der Effekt, dass nachfolgende Generationen innerhalb einer Familie schwerer betroffen sind als die vorherige Generation (Maciel et al., 1995; Schmitz-Hubsch et al., 2008; Takiyama et al., 1995). Der Effekt der Antizipation

ist nicht unbekannt bei Spinocerebellären Ataxien und konnte beispielsweise bei SCA1, 2, 6, 7 und 17 festgestellt werden. Wie auch bei Chorea Huntington (HD), SBMA und DRPLA, welche ebenfalls zu den PolyQ-Erkrankungen zählen (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 & Brice, 2008; Tang et al., 2000; Zhuchenko et al., 1997).

Die Länge des *CAG-Repeat* in ATXN3 hat aber auch einen Einfluss auf das Fortschreiten der Erkrankung und somit auf die klinischen Verschlechterungen des Zustandes der Patienten. Dementsprechend sind längere *CAG-Repeats* nicht nur für einen früheren Krankheitsausbruch verantwortlich, sondern auch mit einer schnelleren Progression des Krankheitsverlaufs bei SCA3 assoziiert (Leotti et al., 2021).

Dennoch scheint kein Zusammenhang der *CAG-Repeat*-Länge mit der Ausprägung der zerebellaren Degeneration zu bestehen (Huang et al., 2017).

Die SCA3 äußert sich in einer klinischen Symptomatik mit Beeinträchtigung des Gleichgewichts, des Gangs, der koordinierten Bewegung der Gliedmaßen, Einschränkungen in der Sprache und Degradation des Kleinhirns (Hersheson et al., 2012) sowie in weiteren Bereichen des Nervensystems (Bettencourt & Lima, 2011).

Phänotypisch äußert sie sich demzufolge in breiter Variation. Dabei zeigen sich zentrale klinische Merkmale, wie beispielsweise die Ataxie (=griechisch, „das Fehlen von Ordnung“) der oberen Extremitäten und des Rumpfes, was sich in Bewegungsstörungen der Extremitäten, beispielsweise bei den Handbewegungen, insbesondere mit Schwierigkeiten beim Greifen und Halten und einer unleserlichen Schrift, äußert. Weitere Schwierigkeiten zeigen sich sowohl beim Gehen, Stehen, als auch beim Sitzen.

Ebenfalls häufig beobachtet in SCA3-Patienten sind motorische Störungen im Sinne von pyramidalen Zeichen, Nystagmus, Dysarthrie, und Gesichtsfaszikulation. Bei frühem Krankheitsbeginn zeigen sich häufig Spastiken, extrapyramidale Steifheit und Dystonie. Bei einem späten Krankheitsbeginn wiederum werden distale Atrophie und Sinnesverlust

beschrieben (Coutinho & Andrade, 1978; Rub et al., 2003; Rub, de Vos, Brunt, et al., 2002; Rub, de Vos, Schultz, et al., 2002; Sudarsky & Coutinho, 1995).

Außerdem zeigen sich auch nicht-motorische Störungen wie Schlafstörungen, beispielsweise durch das Restless-Leg Syndrom (RLS)(Schols et al., 1998). Besonders bei SCA3 Patienten mit einer intermediären CAG-Wiederholungslänge kann sich das RLS-Syndrom auch als alleinige Manifestation der Erkrankung äußern (van Alfen et al., 2001).

Weitere nicht-motorische Störungen äußern sich auch teilweise in Depressionen (Schmitz-Hubsch et al., 2011), einem verminderten Sprechvermögen, chronischen Schmerzen und Gedächtnisstörungen.

Die Erkrankung kann sich bereits in der präklinischen Phase in nicht-ataktischen Symptomen äußern, wie beispielsweise anhand von okulomotorischen Defiziten. Diese Beobachtungen wurden bereits bei SCA2 und SCA7 gemacht (Globas et al., 2008). Weitere Untersuchungen zeigten beispielsweise das Vorkommen einer Retinopathie bei SCA3-Patienten mit atrophischer Makulopathie und Ophthalmoplegie. Dies zeigt hingegen einen Unterschied zu Beobachtungen zu einer eher retinalen Degeneration bei Patienten mit SCA7 (Isashiki et al., 2001).

Bei Patienten mit SCA3 zeigen sich also deutliche Unterschiede in der Ausprägung der Krankheit und der verschiedenen Symptome. Diese unterschiedlich starke Krankheitsausprägung bei gleicher Anzahl an CAG-Wiederholungen soll auf verschiedene Isoformen zurückzuführen sein (Paulson, 2007).

Zudem sollen auch klinische Faktoren wie beispielsweise das Körpergewicht einen Einfluss auf die Ausprägung der Erkrankung haben. Untersuchungen zeigten eine signifikante hypothalamische Atrophie von SCA3 Patienten, bei denen das tubuläre Hypothalamusvolumen mit dem Body Mass Index (BMI) assoziiert werden konnte, der außerdem einen indirekten Effekt der CAG-Wiederholungszahl zeigte (Guo et al., 2022).

Aufgrund der hohen Variabilität der Symptomatik sowie des AAO erfolgt jedoch zusätzlich eine Einteilung in insgesamt vier verschiedene Subtypen.

Bei Typ 1 zeichnet sich ein früher Beginn mit einem AAO zwischen 10-30 Jahren und starker Progredienz ab. Die Hauptsymptome sind eine ausgeprägte Rigidität, Dystonie, Ataxie und Spastiken.

Typ 2 hingegen ist der am häufigsten auftretende Subtyp und zeichnet sich mit einem AAO von 20-40 Jahren und durch eine schwere Ataxie sowie Spastiken aus.

Typ 3 zeigt eher einen späten Erkrankungsbeginn in der 4. bis 7. Lebensdekade sowie eine langsame Progredienz. Die vorherrschende Ausprägung des Subtyps 3 sind Polyneuropathien, Sensibilitätsstörungen und Muskelkrämpfe (Rosenberg, 1992; Schols et al., 1996).

Der 4. Subtyp hingegen zeigt einen Parkinson-ähnlichen Phänotyp und ein variables Erkrankungsalter (Coutinho & Andrade, 1978; Maciel et al., 2001; Riess et al., 2008). Typ 4 manifestiert sich dem Parkinsonismus entsprechend in einigen Fällen mit Bradykinesie, Steifigkeit, Dystonie und einem Ruhetremor, zusätzlich zeigte sich ein Ansprechen auf eine Dopamin-Therapie (Bettencourt, Santos, et al., 2011; Buhmann, Glauche, et al., 2003; Burk et al., 1999; Cancel et al., 1995; Durr et al., 1996; Gwinn-Hardy et al., 2001; Paulson, 2007; Subramony et al., 2002; Tuite et al., 1995; Yuan et al., 2019). Weitere Zusammenhänge anderer ADCA und PD konnten bereits in früheren Untersuchungen beispielsweise für SCA8 und SCA17 festgestellt werden. Interessanterweise konnten abnormal verlängerte Gene des SCA8 und SCA17 Gens auch in Patienten mit Parkinsonerkrankung (PD) gefunden werden, was die Vermutung zulässt, dass das Vorhandensein einer SCA8 ursächlich für PD sein kann. Klinisch präsentierten sich diese SCA3-Patienten mit einem für PD typischen Phänotyp. Sie sprachen zudem ebenfalls gut auf eine Therapie mit Levodopa an (Tuite et al., 1995; Wu et al., 2004).

Auch bei der Einteilung der Subtypen lassen sich gewisse Rückschlüsse von der Menge an CAG-Wiederholungen auf die Schwere der Erkrankung schließen. Denn mit mehr als 73 CAG-Wiederholungen erkranken die Träger dieser Allele eher am schweren Typ 1 und zeigen somit stärkere Krankheitssymptome. Wohingegen Individuen mit weniger als 73 CAG-Wiederholungen eher an den milden Subtypen 2 und 3 leiden (Maciel et al., 1995). Selbst innerhalb einer

großen japanischen Familie waren unterschiedliche Phänotypen zu finden. Klinisch äußerten sich sowohl zerebelläre Ataxie, schwere Amyotrophie und juveniler Parkinsonismus innerhalb dieser Familie (Yoritaka et al., 1999).

Neuste Untersuchungen identifizierten überdies einen neuen SCA-Subtyp, der durch eine Expansion mit *CAG-Repeat* innerhalb des Gens in THAP11 entsteht und mit intrazellulärer Aggregation des THAP11 PolyQ-Proteins einhergeht. Diese Ergebnisse erweitern das Spektrum der PolyQ-Erkrankungen (Tan et al., 2023).

Auch wenn es keine offensichtliche klinische Einteilung in die verschiedenen Subtypen gibt, zeigt dies, dass die Heterogenität der Krankheitsausprägung es notwendig machte, verschiedene Subtypen zu klassifizieren.

## **1.2 Biomarker und Scores/Klinische Symptomatik**

Da es bisher nicht möglich war, eine adäquate Therapie für die SCA3 zu etablieren, ist es sinnvoll bereits bei präataktischen Patienten die Anzeichen für den potenziellen Krankheitsbeginn besser bestimmen und vorhersagen zu können. Denn eine genaue Bestimmung des AAO aufgrund der genetisch analysierten *CAG-Wiederholungssequenz* ist derzeit nicht möglich, da nur ca. 50-70 % der Variationen anhand der *Repeat-Wiederholung* erklärbar sind (Bettencourt, Santos, et al., 2011). Hierfür wird seit langem an speziellen Biomarkern geforscht. Dabei unterscheidet man in „*trait*“ und „*state*“ Biomarker. „*Trait*“-Biomarker ermöglichen Aussagen über die An- bzw. Abwesenheit der Krankheit, wie beispielsweise der *CAG-Repeat*. „*State*“-Biomarker hingegen tätigen eine Aussage über die Schwere der Erkrankung (Lima & Raposo, 2018; Weir et al., 2011).

Bisher hat sich weitgehend der *SARA-Score* (*Scale for the assessment and rating of ataxia*) für die Bestimmung der ataktischen Symptome bewährt (Subramony, 2007). Hierfür wurde kürzlich auch eine deutsche Version des *SARA-Scores* veröffentlicht (Silberbauer et al., 2023). Aber auch wenn die Ataxie das Hauptsymptom der ADCAs darstellt, wurden außerdem nicht-ataktische Symptome bei den Patienten festgestellt. Zur Bewertung der nicht-ataktischen

Symptome hat sich der INAS (*Inventory of Non-Ataxia Signs*) in den letzten Jahren bewährt (Jacobi et al., 2013). Es handelt sich dabei um eine Liste von neurologischen Zeichen, die dem Behandler ermöglicht das Vorhandensein und den Schweregrad von nicht-ataktischen Anzeichen auf standardisierte Weise zu kategorisieren.

Auch modulierende Faktoren in der SCA3 und weiteren neurodegenerativen Erkrankungen, beispielsweise HD, sind laufend Teil der Forschung. Diese dienen zum einen der Einordnung der Patienten bezüglich ihres genetischen Hintergrundes und erhöhen dadurch die Aussagekraft spezifischer Tests. Zum anderen soll dies eine genauere Vorhersage des Krankheitsbeginns ermöglichen (Gusella & MacDonald, 2009).

Hierzu zählen Einzelnukleotid-Polymorphismen (*single nucleotide polymorphism* (SNP)), welche Varianten einzelner Basen im Genom sind und bei mehr als 1 % der untersuchten Allele auftauchen (Richards et al., 2015). Bekannt sind ca. 11 Millionen SNPs im humanen Genom, die sowohl in Introns als auch Exons vorkommen können. Sie können die Genexpression sowohl funktional als auch neuronal beeinflussen. Im *PARK2*-Gen sind 3 SNPs Gegenstand derzeitiger Forschung, die alle einen Aminosäuren (AS)-Austausch in der Proteinsequenz zur Folge haben. Dabei handelt es sich um die SNPs an den Basenpaaren (Bp) 601, Bp 1239 und Bp 1281 (Lucking et al., 2003). Ihnen wird eine mögliche Beeinflussung in der Krankheitsausprägung zugeschrieben. Dabei soll die heterozygote Variante des SNP an Bp 601 in SCA3-Patienten häufiger vorkommen als in Kontrollen (Satoh & Kuroda, 1999). Einige Parkin Polymorphismen scheinen Risikofaktoren für sporadischen oder familiär bedingten PD darzustellen. Der SNP an Bp 1281 hingegen scheint einen protektiven Einfluss zu haben und protektiv gegen autosomal rezessiven juvenilen Parkinson (ARJP) zu sein (Lucking et al., 2003). Zudem soll dieser einen besonderen Einfluss auf das AAO haben, was Vorstudien unserer Abteilung zeigten (Diplomarbeit J. Weber).

Untersuchungen von Patienten auf den Azoren zeigten neben den *PARK2* SNPs Bp 601, Bp 1239 und Bp. 1281 auch Varianten im *Interleukin-6* und *Apolipoprotein E(APOE)*-Gen. Diese hatten im Vergleich zu anderen Patienten

einen früheren Erkrankungseintritt und dementsprechend auch ein früheres Eintreten von SCA3-Symptomen (Raposo et al., 2017).

Das *APOE*-Gen translatiert ein ubiquitinierendes Protein das besonders in inter- und extrazellulären Bereichen hoch exprimiert ist. Es hat 3 Hauptallele  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$ , and  $\epsilon 4$  mit den Isoformen E2, E3, E4. Diese beeinflussen die Struktur des Proteins sowie dessen Bindung mit Lipiden und Rezeptoren. E2 hat dabei eine bis zu 50-mal schlechtere Bindung (Mahley, 1988). Zudem ist E2 assoziiert mit einer gesteigerten Prävalenz, früherem AAO bei PD, sowie Huntington, aber einem geringeren Risiko für Demenz (Sweigart et al., 2021; Velez et al., 2016). E4 hingegen scheint ein gesteigertes Risiko und ein früheres AAO bei sporadischem Alzheimer herbeizuführen und außerdem zu einer schlechteren Heilung nach Hirntrauma und zu einem höheren Risiko für kognitive Beeinträchtigungen beizutragen (Turner et al., 2022).

### **1.3 Parkinsonismus in SCA3-Patienten**

Der Parkinsonismus in genetisch identifizierten SCA3-Patienten ist in der Literatur bisher wenig beschrieben worden, jedoch war die SCA3 die erste SCA in der ein Patient mit PD Phänotyp beschrieben wurde, der eine positive Reaktion auf Levodopa zeigte (Tuite et al., 1995). Häufig wurde vor der SCA3 ein PD diagnostiziert, da der Phänotyp klinisch nicht von der PD zu unterscheiden war und ebenfalls auf eine Therapie mit Levodopa anschluss (Bettencourt, Santos, et al., 2011; Buhmann, Bussopulos, et al., 2003; Tuite et al., 1995).

Seitdem konnte ein parkinsonischer Phänotyp auch in SCA2, SCA6, SCA8 und SCA17 beschrieben werden. Dieser äußert sich in einem atypischen Parkinsonismus, zeigt jedoch eine Reaktion auf die Therapie mit Levodopa (Park et al., 2015).

Klinisch äußern sich die Symptome in einem frühen Krankheitsbeginn mit den typischen PD-Symptomen: Ruhetremor, Rigidität und Bradykinesie. In späteren Stadien entwickelte sich eine periphere Neuropathie und eine milde Ataxie (Lu, Chang, et al., 2004). Dieser Zusammenhang konnte ebenfalls bei SCA2-Patienten festgestellt werden (Lu, Wu Chou, et al., 2004). Klinisch konnten an

SCA2- und SCA3-Patienten signifikante Veränderungen mit ausgedehntem neuronalem Verlust der Substantia nigra im Thalamus, Pons und in Nervenzellen im Hirnstamm gezeigt werden. Der Verlust der motorischen Territorien war deutlich schwerwiegender als der in limbischen und assoziativen Territorien (Schols et al., 2015).

Bei den meisten beschriebenen Patienten mit SCA3 und PD-Symptomen handelt es sich um Patienten mit weniger als 70 *CAG-Repeats*. Bei PD-Patienten in Taiwan zeigten sich ebenfalls verlängerte *CAG-Repeats* in SCA8 und SCA17 (Wu et al., 2004).

Zusätzlich zu dem bereits beschriebenen Subtyp 4 konnten Untersuchungen zeigen, dass es auch Veränderungen an verschiedenen weiteren Genen gibt, die sich in einem Parkinson-ähnlichen Phänotyp mit Tremor, Bradykinesie und Rigor darstellen. Erste Untersuchungen an Patienten zeigten, dass eine Veränderung des APOE und DJ-1, sowie im Interleukin-6 auch einen gewissen Bezug zum Parkinson-ähnlichen Phänotyp darstellen (Bettencourt, Santos, et al., 2011). Für verschiedene Polymorphismen des *APOE*-Gens, speziell Träger des APOE  $\epsilon$ 2 Allel, konnte gezeigt werden, dass diese Veränderung einen deutlichen Einfluss auf das AAO bei SCA3-Patienten zeigt (Bettencourt, Raposo, et al., 2011; Peng et al., 2014; Raposo et al., 2017). Weitere Untersuchungen zeigten, dass das APOE  $\epsilon$ 2 Allel ebenfalls mit sporadischem PD assoziiert werden konnte (Huang et al., 2004). In zwei SCA3 Patienten konnten zudem Parkinson-Merkmale gefunden werden und ein weiterer Patient zeigte sogar einen vollständigen Parkinson-ähnlichen Phänotyp. Diese drei Patienten hatten gemeinsam, dass sie Träger des Genotyps APOE  $\epsilon$ 2/ $\epsilon$ 3 waren (Bettencourt, Santos, et al., 2011).

#### **1.4 Diagnostik und Therapie der SCA3**

Wie auch bei anderen CAG-Wiederholungs- oder PolyQ-Erkrankungen gibt es bisher keine kausale Therapie, die diese Erkrankungen verhindern oder heilen, den Erkrankungsbeginn stoppen, oder das Vorschreiten der Erkrankung verlangsamen kann (Jacobi et al., 2011; Klockgether & Paulson, 2011).

Rückschlüsse aus anderen seltenen Erkrankungsgruppen sind jedoch zum Verständnis der PolyQ-Erkrankungen unerlässlich und können helfen die Erkenntnisse aus der Forschung auch auf diese zu projizieren. Denn vereinernd für diese Erkrankungen ist die Tatsache, dass es sich um ausdifferenzierte Zellen ohne weiteres Teilungsvermögen, sprich Neuronen, handelt. Daher stehen weitere Umweltstressoren im Verdacht durch DNA-Schäden und nachfolgende fehlerhafte Reparaturen eine *Repeat*-Expansion zu bedingen (Chatterjee et al., 2015). Dabei sind die pathogenetischen Mechanismen jedoch weiterhin unklar (Evers et al., 2014).

Die durchschnittliche Überlebensrate nach Erstmanifestation der Erkrankung variiert von ungefähr 20 bis 25 Jahren, mit einer reduzierten Lebenserwartung um fast 15 Jahre (Kieling et al., 2007). Die häufigste Todesursache ist begründet in der Immobilisation, herbeigeführt durch die Erkrankung der SCA3, welche nachfolgend Lungenerkrankungen begünstigt (Diallo et al., 2018). Daher ist eine gezielte Diagnostik wichtig. Ein besonderes Augenmerk soll dabei auf die Familienanamnese gelegt werden. Auch eine Diagnostik mittels Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) wird als Basisdiagnostik genutzt. Zusätzlich soll ein weiteres *Screening* auf die gängigsten Formen der ADCA durchgeführt werden (van de Warrenburg et al., 2014).

Auch wenn besonders der Subtyp 4 auf bestimmte Parkinson-Medikamente anspricht (Zhang et al., 2021) ist bisher jedoch keine kausale Therapie der SCA3 bekannt (McLoughlin et al., 2020). Es gibt lediglich verschiedene therapeutische Möglichkeiten pharmakologisch, physiotherapeutisch oder logopädisch zu intervenieren (Wang, 2018).

Dabei existieren gezielte Behandlungsstrategien besonders für Symptome wie Dysarthrie, Dysphagie, Spastiken, Dystonie, Muskelkrämpfe, Schlafstörungen und RLS (Brusse et al., 2007; Paulson & Ammache, 2001; Schols et al., 2004; Soong & Paulson, 2007)

Bisher konnten gezielte Untersuchungen, und in der Literatur für die symptomatische Therapie diskutierte Wirkstoffe, wie Riluzol, Varenicil oder Amantadin, noch nicht die Wirksamkeit bestimmter Pharmaka bestätigen. Auch die im Maus-Modell untersuchte Gabe von Riluzol zeigte zwar eine Abnahme an

löslichem Ataxin-3 Protein, jedoch keine Verbesserung der Symptome (Schmidt et al., 2016)

## 1.5 Ataxin-3 Protein

Das Ataxin-3 Protein ist ein deubiquitinierendes Enzym (DUB) mit einem Gewicht von ca. 41 kDa, das durch die Translation aus dem *ATXN3*-Gen entsteht (Costa Mdo & Paulson, 2012). Aufgrund von Mutationen des *ATXN3*-Gens kommt es durch eine PolyQ-Expansion zu pathologischen Veränderungen des Proteins. Der Terminus für das expandierte pathologische Protein als auch das nicht-expandierte nicht-pathologische Protein lautet *full-length Ataxin-3* (Paulson, Das, et al., 1997). Ataxin-3 ist ubiquitär im Körper vertreten und sowohl die mutierte Form als auch die nicht mutierte Form wird nicht nur im Gehirn, sondern auch im gesamten restlichen Körper produziert. Dennoch ist Ataxin-3 größtenteils im Zytoplasma, aber auch im Zellkern und an den Mitochondrien, zu finden (Paulson, 2007). Dabei zeigen sich mindestens 20 verschiedene Isoformen des Proteins, die, unabhängig von der Mutation, durch verschiedene *Splice*-Varianten entstehen. Sie unterscheiden sich zwar an ihrem C-terminalen oder N-terminalen Ende (Bettencourt et al., 2010), der grundsätzliche Aufbau von Ataxin-3 bleibt jedoch gleich. Dennoch wird diskutiert ob diese unterschiedlichen Isoformen eine unterschiedlich starke Krankheitsausprägung bei gleicher Anzahl an CAG-Wiederholungen zur Folge haben (Paulson, 2007).

Betrachtet man vorerst den Aufbau des Proteins mit seinen funktionellen Elementen (Abbildung 1) ist am stark konservierten N-terminalen Ende eine Papain-like Cystein-Protease Domäne lokalisiert, auch Josephin-Domäne genannt. Sie besteht hauptsächlich aus  $\alpha$ -Helices und hat die Fähigkeit Ubiquitin-Bindungen proteolytisch zu spalten (Scheel et al., 2003). Unterstützend wirkt Ataxin-3 in Verbindungen mit den Ubiquitin-Interagierenden Motiven (UIMs) als Polyubiquitinketten-editierendes Enzym (Mao et al., 2005), welches stabilisierend bei der Interaktion zwischen dem katalytischen Zentrum in der Josephin-Domäne und dem polyubiquitinierten Substrat wirken kann (Burnett et

al., 2003). Mittels der UIM kann Ataxin-3 an die Polyubiquitin-Kette eines Substrates binden und diese schneiden, beziehungsweise deren Elongation verhindern. Auf diese Weise interagiert Ataxin-3 mit der E3-Ubiquitin-Protein Ligase CHIP und PARK2.

Die Interaktion untereinander begünstigt die Degradierung von Ubiquitin-markierten Substraten (Scaglione et al., 2011). Zusätzlich zur Josephin-Domäne enthält das Ataxin-3-Protein zwei nukleäre Exportsignale (NES 77, NES 141). Das C-terminale Ende ist eher unstrukturiert und enthält zudem ein Kernlokalisierungssignal (NLS) (Antony et al., 2009), den PolyQ-Bereich, sowie die Ubiquitin-interagierenden Motive, von denen je nach Isoform 2 oder 3 UIMs vorliegen (Masino et al., 2003). UIM3 ist beispielsweise nicht in allen Isoformen enthalten (Burnett et al., 2003; Weishaupl et al., 2019).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung Ataxin-3-Protein**

Abb. 1 zeigt die schematische Darstellung des Ataxin-3-Proteins. Am N-terminalen Ende befindet sich die Josephin-Domäne, welche zwei nukleäre Exportsignale (NES) beinhaltet. Daneben befinden sich zwei Ubiquitin-interagierende Motive (UIM1, UIM2), sowie am C-terminalen Ende ein drittes (UIM3), je nach vorliegender Isoform. Dazwischen liegt der Polyglutaminbereich (PolyQ), sowie ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) (modifiziert nach Durcan and Fon, 2013, McLoughlin et al., 2020)

Ataxin-3 hilft bei der Stabilisierung oder Aktivität von vielen Proteinen in diversen zellulären *Pathways*, eingeschlossen proteotoxische Stressreaktion, Alterung und Zelldifferenzierung. Es wird angenommen, dass die Expansion des PolyQ-Trakt in ATXN3 eine veränderte Konformation im Protein fördert (Costa Mdo & Paulson, 2012).

Ataxin-3 wirkt am proteasomalen Proteinabbau mit und dient der Regulierung der Transkription (Evers et al., 2014). Als Beispiel soll hier die Bindung des Ataxin-3 an den Transkriptionspromotor des Gens für die Superoxiddismutase 2 (SOD2) genannt werden. Es handelt sich um ein antioxidatives Enzym und die Bindung

erfolgt bei oxidativem Stress und führt zu einer vermehrten Expression des Gens für SOD2. Diskutiert wird eine Relevanz beim Einfluss auf mögliche Pathomechanismen in der SCA3 (Araujo et al., 2011). Beobachtungen zeigten auch eine vermehrte nukleäre Lokalisation von Ataxin-3 bei zellulärem Hitzeschock (Reina et al., 2010). Eine weitere Funktion, die ATXN3 zugeschrieben wird, ist beispielsweise die Interaktion mit dem *Valosin-containing protein* (VCP/p97) (Laco et al., 2012). Durch die Bindung von ATXN3 an VCP/p97 wird die im Endoplasmatischen Retikulum assoziierte Degradation (ERAD) verhindert, was den Anstieg von ERAD-Substraten in der Zelle zur Folge hat. Bei ERAD handelt es sich um ein Protein-Qualitätskontrollsystem, das für die Degradation von fehlgefalteten Proteinen zuständig ist. Somit sorgt die Bindung von ATXN3 für die Verbesserung dieses Protein-Qualitätskontrollsystems (Hampton, 2002; Kobayashi et al., 2002).

Die Josephin-Domäne des Ataxin-3 spielt weiterhin eine Rolle in der Protein-Degradierung durch Cysteinproteasen (Nicastro et al., 2005; Scheel et al., 2003) und greift zudem auch in Prozesse des Ubiquitin Systems ein, beispielsweise bei der Qualitätskontrolle oder Membran-Fusionen von Proteinen (Mao et al., 2005). Dabei besitzt das Ataxin-3 Protein eine gewisse Ubiquitin-Protease-Aktivität, indem die UIMs des Ataxin-3 Proteins polyubiquitylierte Proteine binden (Burnett et al., 2003; Donaldson et al., 2003). Anschließend werden die ubiquitinierten Proteine durch die Konjugate geschnitten oder modifiziert (Burnett & Pittman, 2005; Scaglione et al., 2011; Winborn et al., 2008). Das dient vorrangig der Regulation der Deubiquitinierungs-Aktivität und trägt zur Fähigkeit von Ataxin-3 bei Aggresome zu bilden (Todi et al., 2010).

Das N-terminale Ende hingegen ermöglicht eine Bindung an Histone und dadurch eine Hemmung der jeweiligen Acetylierung (Li et al., 2002).

Weitere Aufgaben bestehen in der Interaktion mit DNA-Reparaturenzymen und es soll ein Mitwirken bei der Organisation und Funktion des Zytoskeletts bestehen (Rodrigues et al., 2007; Wang et al., 2000).

Dennoch scheinen, nach Untersuchungen bei *Caenorhabditis elegans* und in Ataxin-3 *knock-out*-Mäusen, die Funktionen von Ataxin-3 nicht essenziell für die

Lebensfähigkeit des Organismus zu sein (Rodrigues et al., 2007; Schmitt et al., 2007; Switonski et al., 2011)

Entsteht eine Mutation des *ATXN3*-Gens, resultiert dies in einer expandierten Polyglutamin-Sequenz am C-Terminus des translatierten Ataxin-3 Proteins, die eine veränderte Funktion, Interaktion und Bildung unlöslicher Aggregate zur Folge hat (Costa Mdo & Paulson, 2012), welche wiederum zu intranukleären und zytoplasmatischen Einschlüssen in großen Teilen des Gehirns führen (Zoghbi & Orr, 2000). Die Aggregatbildung scheint demnach aufgrund der proteolytischen Spaltung von *ATXN3* zu entstehen. Dies gilt als Bestätigung der Toxischen-Fragment-Hypothese, welche vorerst für HD aufgestellt wurde (Haacke et al., 2006; Rubinsztein, 2002; Rubinsztein et al., 1996).

Darüber hinaus zeigen sich zytotoxische Eigenschaften, die zum Apoptose-Anstieg im Zellmodell, sowie zur Neurodegeneration im Tiermodell, führten (Goti et al., 2004; Yoshizawa et al., 2000; Yoshizawa et al., 2001). Jedoch ist auch das N-terminale Ende bei der Pathogenese der SCA3 von Bedeutung, denn im Zellmodell führen auch N-terminale Fragmente zur Aggregatbildung (Yoshizawa et al., 2001). Diese sind zwar zum einen im Zytoplasma lokalisiert, führen aber dennoch zu Neuronenverlust und Neurodegeneration bei Analysen im Tiermodell (Hubener et al., 2011).

Dennoch ist der Zusammenhang der Aggregate in der SCA3 noch nicht eindeutig geklärt (McLoughlin et al., 2020). Bekannt ist, dass es bei expandiertem *ATXN3* zu einer Beeinträchtigung unterschiedlicher Zellfunktionen kommt. Dabei kommt es zu mitochondrialen Dysfunktionen, zu vermehrten reaktiven Sauerstoffspezies, und einer erhöhten Rate der Mitochondrien-vermittelten Apoptose (Harmuth et al., 2018; Hsu et al., 2017; Laco et al., 2012; Tsai et al., 2003).

Jedoch konnte gezeigt werden, dass die Toxizität der SCA3 nicht ausschließlich auf interzelluläre Aggregate zurückzuführen ist. Man geht stattdessen davon aus, dass zusätzlich lösliche PolyQ-haltige Fragmente, die durch die proteolytische Spaltung durch Caspasen und Calpaine entstehen, ebenfalls einen Einfluss auf die Pathogenese der SCA3 haben. Darüber hinaus geht man davon aus, dass die pathogene Komplexität durch Beteiligung einer RNA-Toxizitätskomponente

und andere PolyQ-Expansionsstörungen ebenfalls einen Einfluss auf die Pathogenese haben (Evers et al., 2014).

Es zeigt sich eine Beeinträchtigung im zellulären Autophagie-Prozess, der somit zu verringertem Abbau von Beclin-1 mit vermehrter Autophagosombildung führt (Ashkenazi et al., 2017). Zusätzlich unterliegt auch ATXN3 bei der Degradation selbst dem Prozess der Autophagie (Nascimento-Ferreira et al., 2011).

## 1.6 Parkinson-assoziiertes Protein Parkin

In diesem Kontext ist als weiterer Interaktionspartner von Ataxin-3 das Protein Parkin, eine neuroprotektive E3-Ubiquitin-Ligase, bekannt. Parkin wird durch das *PARK2*-Gen auf Chromosom 6q25.2-27 translatiert. *PARK2* besteht aus 12 Exonen aus denen Parkin aus 465 Aminosäuren (AS) bei einer molekularen Masse von 50 kDa gebildet wird und in 6 bekannten Isoformen vorkommt. Die Expression ist ubiquitär, Parkin ist jedoch vorwiegend im Zytosol zu finden. Grundsätzlich zeigt der Aufbau des Proteins (Abbildung 2) am N-terminalen Ende eine *Ubiquitin-like-domain* (UBL), ein Linker-Element mit Schnittstellen für Caspasen (Kahns et al., 2003; Kahns et al., 2002). Am C-terminalen Ende befindet sich die RING-Box, bestehend aus drei Domänen, die sich aus RING1, *in-between* RING (IBR) und RING2 zusammensetzen (Shimura et al., 2000).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung des Parkin-Proteins**

Abb. 2 zeigt die schematische Darstellung des Parkin-Proteins. Am N-terminalen Ende befindet sich eine Ubiquitin-like-domain (UBL), am C-terminalen Ende befindet sich die RING-Box mit den drei RING-Domänen (RING1, *in-between* RING (IBR), RING2). (modifiziert nach (Durcan & Fon, 2013))

Zu den Funktionen des Proteins Parkin zählt die Regulation vielfältiger neuronaler und nicht-neuronaler Zellen. Unter anderem reguliert es den Ablauf von bestimmten Enzymen und katalysiert den Ubiquitin-Transfer von Enzymen

auf verschiedene Protein-Substrate (Cookson, 2003; Houlden & Singleton, 2012; Zhang et al., 2015). Zudem fördert Parkin die Autophagie von geschädigten Mitochondrien, in die es selektiv rekrutiert werden kann (Narendra et al., 2008). Kommt es zum Parkin-Mangel, wird die Akkumulation von Cyclin E verstärkt. Die Überexpression hingegen verringert die Akkumulation von Cyclin E und schützt diese somit vor Apoptose (Staropoli et al., 2003).

Außerdem bildet Parkin einen Komplex mit dem Hitzeschock-Protein Hsp70 und dem Proteasom, womit die Ubiquitinierung und die proteolytische Eliminierung von expandierten PolyQ-Proteinen, wie Ataxin-3, prozessiert wird. Hsp70 verbessert die Parkin-Bindung und die Ubiquitinierung des Ataxin-3. Man nimmt an, dass Hsp70 helfen kann fehlgefaltete Proteine zu akquirieren und somit endoplasmatisch-retikulären Stress zu reduzieren. Im Verlust der Parkin-Funktion könnte somit eine Akkumulation toxischer Proteine resultieren, welche wiederum zu neurodegenerativen Erkrankungen beitragen (Tsai et al., 2003).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass das Protein Parkin ein Interaktionspartner von Ataxin-3 ist und Parkin durch vorhandenes expandiertes (*full-length*) Ataxin-3 verstärkt abgebaut wird (Durcan et al., 2011).

Parkin scheint in der Lage zu sein, toxische Proteine zu beseitigen und somit eine protektive Funktion bei neurodegenerativen Erkrankungen auszuüben. Es konnte eine Verbindung zwischen  $\alpha$ -Synuclein und Parkin festgestellt werden, bei der Parkin dieses vor toxischen Effekten retten kann. Denn bei Überexpression von Parkin wird die Sensitivität für Proteasomeninhibitoren gesenkt. Antisense *knockdown* von Parkin hingegen hebt die Protease-Sensitivität der Proteaseinhibitoren wieder. Mutiertes  $\alpha$ -Synuclein sorgt für eine selektive Toxizität bei catecholaminergen Neuronen in primären *midbrain* Kulturen (Petrucci et al., 2002). Zudem soll Parkin auch in Zusammenhang mit ER-Stress (Ansammlung von Proteinen mit fehlerhafter Faltung im endoplasmatischen Retikulum (ER)), aufgrund von fehlgefalteten Proteinen, durch eine Hoch-Regulierung, die Degradation der fehlgefalteten Proteine ermöglichen (Imai et al., 2000).

Eine Assoziation von Parkin mit mitochondrialer DNA (mtDNA) wurde sowohl *in vitro* in proliferierenden und differenzierten SH-SY5Y Zellen als auch *in vivo* in

murinem und humanem Gehirn gezeigt. Der Einfluss von Parkin äußert sich bei der Überexpression von Parkin, indem sich ein positiver Effekt auf Replikation und Transkription von mtDNA zeigt. Gleichzeitig konnte eine Schutzfunktion der mtDNA durch Parkin vor oxidativem Stress beobachtet werden. Als Schlussfolgerung wurde Parkin daher eine anti-apoptotische und anti-oxidative Funktion in neuronalen oder myogenen Zellen zugeschrieben (Kuroda et al., 2006; Rothfuss et al., 2009).

In Verbindung mit dem Protein Parkin und einer Mutation auf dem zugrunde liegenden entsprechenden *PARK2*-Gen ist die Parkinson-Erkrankung bekannt. Beginn der Erkrankung liegt im Regelfall zwischen 20 und 40 Jahren (Biskup et al., 2008) und äußert sich typischerweise mit motorischen Fluktuationen und Dyskinesie (Kitada et al., 1998). Dennoch konnten unterschiedliche Formen der PD klassifiziert werden, die jeweils durch verschiedene Mutationen des *PARK2*-Gens ausgelöst werden. Wie beispielsweise eine *loss-of-function* Mutation, die das juvenile rezessiv-vererbte Parkinson-Syndrom auslöst (ARJP). Denn Untersuchungen an Mäusen zeigten eine Expression großer Parkin-Mengen im Hirnstamm dieser. Bei den betroffenen Zellen handelte es sich hauptsächlich um Neuronen. (Stichel et al., 2000). Aber nicht bei allen Formen ist die Rolle des Proteins Parkin für die Erkrankung bekannt. Die Pathogenese der PD wird aber auch durch andere Gene wie beispielsweise *PINK1* oder das *DJ1*-Gen beeinflusst. Jedoch kann die Veränderung des Gens nicht in allen Fällen bei PD als Ursache zugrunde gelegt werden, denn nur in 50 % der Fälle konnte eine pathogene Veränderung des Gens als Ursache für die PD festgelegt werden und in nur 20 % aller isolierten juvenilen PD-Fällen (Pirkevi et al., 2009).

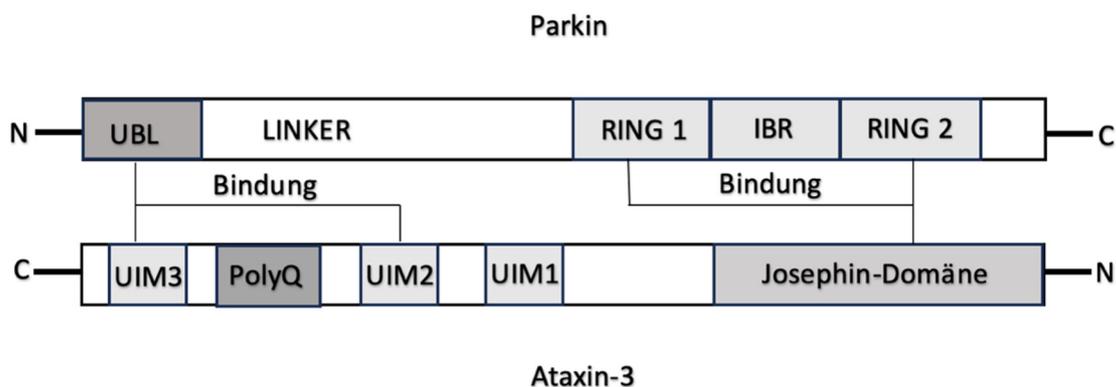
Eine Involvierung von Parkin in den Proteinabbau besteht in Zusammenarbeit mit dem Ubiquitin-konjugierenden Enzym UbcH7. Mutiertes Parkin hingegen zeigt keine Ubiquitin-Protein-Ligase Aktivität mehr. Es zeigt sich hingegen eine Akkumulation von Proteinen, die bislang nicht identifiziert werden konnten. Diese verursachen den selektiven Zelltod ohne Formation von *Lewy bodies*. Auch bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen, die charakterisiert sind durch die Beteiligung abnormaler Protein-Ubiquitinierung, wie beispielsweise bei

Alzheimer, CAG-Repeat Erkrankungen oder ALS, konnte dies beobachtet werden (Shimura et al., 2000).

### 1.7 Parkin und seine Interaktion mit Ataxin-3

Als mögliche Erklärung für zusätzliche Parkinson-Symptome bei SCA3-Patienten kann die Interaktion zwischen Ataxin-3 und Parkin abgeleitet werden. Es konnte gezeigt werden, dass eine direkte Interaktion dieser beiden Proteine stattfindet. Der Interaktionsmechanismus liegt einerseits N-Terminal zwischen der UBL-Domäne des Parkin und den drei C-terminalen UIMs des Ataxin-3. Eine weitere Bindungsstelle, diesmal C-Terminal, besteht zwischen den Domänen RING1, IBR, RING2 und der Josephin-Domäne (Bai et al., 2013). Die Bindung zwischen Parkin an die UIMs von Ataxin-3 wird bei Auto- und Polyubiquitinierung von Parkin verstärkt, denn auf diese Weise findet eine Wechselwirkung zwischen den erzeugten Polyubiquitinketten zwischen den Interaktionspartnern statt (Matsuda et al., 2006).

In Abbildung 3 sind beide Proteine und ihre Interaktion schematisch dargestellt. Durch diese direkte Interaktion kann es durch expandiertes (*full-length*) Ataxin-3 zum Abbau von Parkin über die Deubiquitinierung des Parkins kommen (Durcan & Fon, 2011).



**Abbildung 3: Interaktion der Proteine Parkin und Ataxin-3**

Abb. 3 zeigt, wie Parkin mit der N-terminalen (N) Ubiquitin-like-Domäne (UBL) an die Ubiquitin-interagierenden Motive UIM1 und UIM2 des Ataxin-3-Proteins bindet. Die C-terminale (C) RING-Box, bestehend aus RING1, dem in-between-RING (IBR) und RING2, bindet an die Josephin-Domäne des Ataxin-3 (modifiziert nach Durcan & Fon, 2013).

Die Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen kann eine Erklärung für den bei einigen Patienten auftretenden Parkinson-ähnlichen Phänotyp darstellen (Durcan & Fon, 2013). In Studien konnte diese Interaktion zwischen einem 149 AS großen Ataxin-3-Fragment, welches einen expandierten 79Q Polyglutamin-Bereich aufweist, und Parkin gezeigt werden. Dabei wurde Ataxin-3 von wildtypischem Parkin *in vitro* ubiquitiniert. Dementsprechend führt eine Überexpression von Parkin zu verminderter Aggregation und verringerter Zytotoxizität der Proteine mit expandiertem PolyQ-Bereich (Tsai et al., 2003). Wildtypisches nicht expandiertes Ataxin-3 zeigt hingegen keinen Regulationseffekt auf Parkin.

Zusätzlich zeigte sich, dass die Parkin-Clearance durch Autophagie gefördert wurde und somit verringerte Parkin-Level in transgenen Mäusen beobachtet werden konnten. Diese Reduktion der Parkin-Level lassen vermuten, dass ein Einfluss auf die Pathogenese der SCA3 besteht (Durcan et al., 2011). Somit ist es nicht verwunderlich, dass einige SCA3-Patienten einen phänotypischen Parkinsonismus zeigen (Durr et al., 1996; Tuite et al., 1995; Yoritaka et al., 1999).

## **1.8 Ziele dieser Arbeit**

Solange die Erforschung bestimmter Krankheitsbilder und die Suche nach Therapien besteht, ist es wichtig diese Erkrankungen rechtzeitig zu erkennen. Dies bedeutet Erkrankungen bei Patienten bereits vor Ausbruch zu erkennen oder bereits adäquat zu behandeln, bevor ein irreversibler Schaden eintritt, in der Hoffnung die Progression der Krankheit somit zu verlangsamen und bestenfalls den Krankheitsausbruch zu verhindern. Hierbei hilft die Analyse und der Vergleich geno- und phänotypischer Merkmale zwischen Erkrankten und denen, die zwar genotypisch erkranken werden, der Krankheitsausbruch jedoch noch nicht stattgefunden hat, und gesunden Probanden. Zu diesem Zweck dienen in Bereichen der Diagnostik, Prognose und Therapie so genannte Biomarker. Hierbei ist es wichtig, dass diese Biomarker eine hohe Zuverlässigkeit sowie eine gute Verfügbarkeit aufweisen und ohne große Belastung für den Patienten zu

gewinnen sind. Daher werden Markern die über eine einfach venöse Blutentnahme gewonnen werden können eine große Bedeutung zugeschrieben. Diese Arbeit teilt sich in zwei Teile, wobei sich der erste Teil der Untersuchungen mit der Kreuzung eines SCA3 Mausmodells und eines Parkin knockout Modells zur Aufklärung des Einflusses von Parkin auf die Pathogenese der SCA3 beschäftigt. Anhand von Metabolomdaten sollen gezielt genotypische Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Mausmodelle und somit auch der Einfluss von Parkin auf die Pathogenese der SCA3 untersucht werden. In Verhaltensanalysen soll dem gegenüber, eine phänotypische Ausprägung von Parkin auf die Pathogenese der SCA3 untersucht werden.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit Analysen von in Probanden gewonnener DNA und mononukleären Zellen des Peripheren Blutes (PBMCs). In vorausgegangenen Untersuchungen in unserem Institut wurde die Eignung von *full-length* Ataxin-3 und Parkin als potenzielle Biomarker für den Krankheitsverlauf bereits überprüft. Dementsprechend soll in dieser Arbeit die Proteinmenge von Parkin anhand einer großen Gruppe von Probanden erhoben werden und innerhalb von 3 verschiedenen Gruppen, in SCA3 Patienten, prä-ataktischen Mutationsträgern und Kontrollen, untersucht werden. Um zu untersuchen, welchen Einfluss Parkin auf die PD-Symptomatik in einigen SCA3-Patienten hat, wurden die Probanden zusätzlich in weiterführenden Untersuchungen in SCA3-Patienten mit und ohne PD-Symptomatik eingeteilt. Diese Einteilung erfolgte anhand der Medikation in SCA3-Patienten mit PD-Medikation, mit anderer Medikation als PD und ohne Medikamenteneinnahme. Außerdem soll eine Korrelation der Parkin Proteinmenge mit klinischen Parametern, wie Alter, Geschlecht, Erkrankungsbeginn, sowie CAG-Wiederholungssequenz und bekannten klinischen Scores wie SARA (*Scale of the assessment and rating of ataxia*) und INAS (*Inventory of non-ataxia signs*), erstellt und evaluiert werden. Zudem sollten Faktoren, die die Entstehung, den Erkrankungsbeginn und die Schwere sowie Progression der SCA3-Erkrankung beeinflussen, untersucht und ebenfalls in Bezug zu den Daten gestellt werden. Daher wurde in dieser Arbeit auch der Einfluss von einzelnen bekannten SNPs von *PARK2* und *APOE* untersucht.



## 2 Material und Methoden

### Statement zum Ethikvotum

Die jeweiligen Analysen und Versuche, welche an Mäusen durchgeführt wurden, wurden unter HG5/14 beim Regierungspräsidium Tübingen genehmigt. Alle Arbeiten mit humanem Biomaterial für die DNA-Analysen und die Analysen mittels TR-FRET wurden durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät geprüft und unter der Nummer 911/2019BO2 genehmigt. Der Einschluss der Probanden in die Studie und die Abnahme der Biomaterialien erfolgte erst nach der schriftlichen Zustimmung der Probanden. Die Abnahme der Proben bei den europäischen Partnern wurde durch lokale Ethik-Behörden rechtlich geprüft und genehmigt.

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Mäuse

Um den Einfluss von Parkin auf die Pathogenese der SCA3 zu untersuchen, wurde eine Ataxin-3 Maus (YAC84Q, (Cemal et al., 2002)) mit einer Parkin *knockout* Maus gekreuzt und die dabei entstandenen vier verschiedenen Genotypen (Wildtyp, hemizygoter YAC84Q, PARK2 homozygoter knockout (-/-), doppelt-mutierte Maus YAC/PARK (-/-)) *in vivo* analysiert.

Bei den verschiedenen Genotypen handelt es sich um folgende Tiere:

Eine Wildtypmaus, welche unverändert ist und somit das murine *Ataxin-3* und *PARK2*-Gen exprimiert. Diese Mauslinie wird im Folgenden als WT abgekürzt.

Eine YAC84Q Maus, die sowohl das murine *Ataxin3* Gen und das murine *PARK2* Gen und zusätzlich den humanen Lokus, inklusive des humanen Promoters, aller 3' und 5' regulatorischen Elemente des humanen *Atxn3* mit 84 Glutaminen hemizygot exprimiert (YAC84Q, (Cemal et al., 2002)). YAC steht dabei für *Yeast*

*artificial chromosome*. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden diese *single mutant mouse YAC84Q* Tiere als SCA3 YAC abgekürzt.

Eine homozygote PARK2 knockout (ko/ko) Maus, bei welcher das komplette murine *PARK2* (Itier et al., 2003) Gen nicht mehr exprimiert wurde. Allerdings ist bei dieser Maus das murine *Atn3* vorhanden, nicht aber das humane *ATXN3* Gen. Im Folgenden wird diese Maus als PARK2 ko Maus abgekürzt.

Zusätzlich wurde noch eine doppelt mutierte Maus untersucht, bei der es sich um eine Kreuzung zwischen der SCA3 YAC und der PARK2 ko Maus handelte. Bei dieser war das murine *PARK2* homozygot ausgeschaltet. Zusätzlich exprimierte diese Mauslinie aber noch hemizygot das humane *ATXN3*, sowie den murinen *Atn3* Locus. Diese Maus wurde im Folgenden als *double mutant mouse YAC84Q/PARK2-ko* (dm-YAC/PARK) bezeichnet.

Zur Übersicht ist in Tabelle 1 nochmal eine Zusammenfassung der verschiedenen Genotypen mit Abkürzung, Gen, Genotyp und Referenz dargestellt.

Tabelle 1: Zusammenfassende Tabelle der verschiedenen Genotypen mit Abkürzung, Gen, Genotyp und Referenz

Abkürzung	Gen	Genotyp	Referenz
WT		wt/wt	
SCA3 YAC	<i>ATXN3</i>	YAC84Q/YAC84Q	(Cemal et al., 2002)
PARK2 ko	<i>PARK2</i>	-/-	(Itier et al., 2003)
dm-YAC/PARK	<i>ATXN3</i> <i>PARK2</i>	Hemizygot YAC84Q -/-	(Cemal et al., 2002; Itier et al., 2003)

Bei den oben genannten Tieren wurden Metabolomanalysen im Alter von 2 Monaten und im Alter von 12 Monaten durchgeführt. Pro Genotyp, Alter und Geschlecht wurden fünf Tiere getestet. Hierbei wurden jeweils Plasma- und Cerebellumproben entnommen. Die Ergebnisse nach 2 Monaten bilden somit die *Baseline* der Untersuchung ohne Pathologie bzw. mit beginnender Pathologie. Das bedeutet es liegen weder Aggregate noch ein neurologischer Phänotyp bzw. ein offensichtlicher Phänotyp vor.

Die Ergebnisse nach 12 Monaten veranschaulichen die neurologische Entwicklung, mit neurologisch sichtbarer Pathologie, Aggregaten und falls vorhanden mit neurologischem Phänotyp. Dieser äußert sich in neurologischen Merkmalen wie geminderter Balance, Gangartstörung und Gewichtsreduktion. Bei den Verhaltensanalysen handelt es sich um regelmäßige Körpergewichtsmessungen (alle 2 Wochen über 80 Wochen), den RotaRod Test (3, 6, 9, 12, 15 Monate), CatWalk (12, 15 Monate) und LabMaster (3 Monate) (vgl. Abbildung 7).

### 2.1.2 Probanden

Bei den untersuchten Probanden-Proben wurden Proben des transnationalen Forschungsvorhabens *European Spinocerebellar Ataxia Type 3/Machado-Joseph Disease Initiative* „ESMI“ mit einer großen Kohorte von über 400 SCA3-Patienten, präataktischen Mutationsträgern und Kontrollprobanden einbezogen. Zur Vereinfachung des Leseflusses bezieht sich das in dieser wissenschaftlichen Arbeit gewählte generische Maskulinum immer auf alle Geschlechter, nicht nur auf das männliche Geschlecht.

Bei ESMI handelt es sich um eine SCA3/MJD Initiative mit Patienten aus Portugal (Coimbra, Azoren), Deutschland (Bonn, Tübingen, teilweise Aachen, Heidelberg), Großbritannien (London) und den Niederlanden (Nijmegen, Groningen). Zudem wurden gesunde Verwandte der Patienten, aber auch in den Kliniken liegende Patienten, die keine neurologische oder neurodegenerative Erkrankung hatten sowie an ESMI beteiligte Kliniker und Laborpersonen als Kontrollprobanden rekrutiert. Die Probanden, einschließlich SCA3 Mutationsträger und gesunde Kontrollprobanden, wurden in den jeweiligen Zentren unter Einhaltung standardisierter Untersuchungsprotokolle untersucht. Zusätzlich haben die Probanden, nach Aufklärung vor Ort und vor der Aufnahme in die Studie die *Declaration of Helsinki* unterschrieben. Die klinischen Untersuchungen beinhalteten jeweils eine *Baseline* Visite mit klinischer Untersuchung der ataktischen Symptome anhand des SARA-Score und der nicht ataktischen Symptome anhand des INAS-Score. Die jeweiligen zugehörigen

Untersuchungsbögen befinden sich im Anhang unter Anhang 1 und Anhang 2. Zudem wurden teilweise sowohl Ganganalysen und MRT-Untersuchungen als auch eine standardisierte Blutabnahme durchgeführt. Anschließend erfolgte die klinische Untersuchung. In den darauffolgenden Jahren erfolgen zusätzlich jährliche Abnahmen von Biomaterialien für longitudinale Untersuchungen.

### 2.1.3 Geräte und Zubehör

Tabelle 2: Übersicht der Verwendeten Geräte mit Herstellerangabe

Gerät	Name	Hersteller
Agarose-Gelkammer	<i>Perfect Blue Mini S+L</i>	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
BioPhotometer		Eppendorf AG, Hamburg, D
Zentrifuge	Centrifuge 5417 C, 5810 R, 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg, D
	<i>UVP GelStudio PLUS Analyser</i>	Analytik Jena, D
Homogenisator	S12-5S VDI 12	VWR International GmbH, Darmstadt, D
Elektrophoresesystem	Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH Kapellenstraße 12 D-85622 Feldkirchen
<i>Microplate Reader Synergy</i> HT	KC4 v3.4	BioTek Instruments, Winooski, Vermont, USA
Mikrowelle		Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern, D

<i>Multimode Plate Reader EnVision 2105 mit TRF Light Unit 337 nm</i>	EnVision Manager	PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA
Pipette	Research 0,1-2,5 µL Research 0,5-10 µL Research 10-100 µL Research 100-1000 µL	Eppendorf AG, Hamburg, D
<i>Thermocycler</i>	G-Strom GS1	Alpha Metrix Biotech, Rödermark, D
Vortexer	Heidolph Reax Control	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, D
	VF2	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, D
	Vortex Mixer 7-2020	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, D
Waage	LS 6200C SCS	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, CH

## 2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien mit Herstellerangabe

Bezeichnungen	Name	Hersteller
Falcon 15 ml Falcon 50 ml	<i>Cellstar Tube 15 ml</i> <i>Cellstar Tube 50 ml</i>	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Filterpapier (0,8 mm)	Filterpapier für Westernblot	biostep GmbH, Burkhardtsdorf, D
Injektions-Kanüle	<i>Sterican Gr. 1</i>	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Multipetten-Spitze 10 ml Multipetten-Spitze 5 ml	<i>Combitips advanced 10 ml</i> <i>Combitips advanced 5 ml</i>	Eppendorf AG, Hamburg, D
<i>PCR-Strips</i>	<i>0,2 ml 8-Strip PCR-Tubes</i>	Starlab International GmbH, Hamburg, D
Pipettenspitze 0,5-10 µl  Pipettenspitze 10-100 µl  Pipettenspitze 100-1000 µl	Tipone 10/20 µl CL Graduated Tip Tipone 200ul CL Ultra Point Graduated Tip Tiptone 1000ul Graduated Tip	Starlab International GmbH, Hamburg, D
PVDF-Membran	PVDF-Membran mit niedriger Fluoreszenz, 0,2 µm, 7 cm x 8,4 cm	ThermoFischer Scientific, D
Reaktionsgefäß 1,5 ml Reaktionsgefäß 2 ml	<i>Reaction Tube 1,5 ml</i> <i>Reaction Tube 2 ml</i>	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D

Skalpelli	<i>Feather Disposable Scalpel</i>	GF Health Products Inc., Atlanta, USA
Stripette	Falcon, 2 ml <i>Serological Pipet</i>	Corning Incorporated, USA
	Falcon, 5 ml <i>Serological Pipet</i>	
	Falcon, 10 ml <i>Serological Pipet</i>	
	Falcon, 25 ml <i>Serological Pipet</i>	
	Falcon, 50 ml <i>Serological Pipet</i>	
UV-Licht-stabiles Reaktionsgefäß	<i>Safe-Lock Tubes 1.5 ml, amber</i>	Eppendorf AG, Hamburg, D
384 Well Platte	<i>CulturPlate-384 F</i>	PerkinElmer, Weltham, Massachusetts, USA
96 Well Platte		Greiner Bio-One GmbH

### 2.1.5 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Chemikalien und Reagenzien mit Herstellerangabe

Chemikalien	Hersteller
Agarose SeaKem LE Agarose	Lonza Group Ltd, Basel, CH
Ampuwa (Wasser für Injektionswege)	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, D
Ammoniumperoxidsulfat (APS) 10 %	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Betain	<i>Betaine</i> Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>(Bis)-Acrylamide solution 29:1</i>	<i>AppliChem GmbH</i>
<i>(Bis)-Acrylamide solution 19:1</i>	<i>Bio-Rad Laboratories</i>

Bradford-Reagenz	<i>Protein Assay Dye Reagent Concentrate</i> Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA
Bromphenolblau (1 % in ddH <sub>2</sub> O)	PanReacAppliChem ITW Reagents
BSA-Lösung	<i>Bovine Serum Albumin Fraction V</i> Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
<i>Complete Protease Inhibitor</i>	<i>Complete, EDTA-free</i> Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
dNTPS	<i>PCR Grade Nucleotide Mix</i> Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Essigsäure 100 %	Merck KGaA, Darmstadt, D
Ethanol	Ethanol absolute p.A. PanReac AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid p. A, (1 %- Lösung in H <sub>2</sub> O) für die Elektrophorese C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> BrN <sub>3</sub>	Merck KgaA, Darmstadt, D
Formaldehydlösung 37 %	Merck KgaA, Darmstadt, D
Lithium dodecyl sulfat (LDS)	AppliChem GmbH
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	QIAGEN GmbH, Hilden, D
Milchpulver	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Natriumcarbonat	Merck KGaA, Darmstadt, D
<i>O'Gene Ruler Ladder mix, ready-to-use</i>	Thermo Scientific
Silbernitratlösung	Carl Roth GmbH + Co. KG
Salpetersäure 100 %	Merck KGaA
Salzsäure	Merck KGaA

Taq-Polymerase	QIAGEN GmbH, Hilden, D
TEMED	PanReacAppliChem ITW Reagents
<i>Tricine</i>	
Triton X-100	Triton X-100, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
10x PCR-Puffer	QIAGEN GmbH, Hilden, D
5x <i>Q-Solution</i>	QIAGEN GmbH, Hilden, D

### 2.1.6 Puffer und Lösungen

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Puffer und Lösungen mit ihrer Zusammensetzung

Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
AlwNI	10.000 U/ml
BaeGI	10.000 U/ml
Blockingreagenz (5 % Milchpulver)	20 ml 1x TBS 1 g Milchpulver
<i>Cut Smart Buffer</i>	10x Concentrate
Detektionspuffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 400 mM NaF 0,1 % BSA 0,05 % Tween-20
<i>Dilution Buffer</i>	50 mM Trizma Base (pH 8,0)
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
FG3-Puffer	FlexiGen DNA Kit Qiagen, Hilden, D
HhaI	10.000 U/ml
Lysepuffer	DPBS 1 % Triton X-100 1x <i>Complete Protease Inhibitor</i>

<i>NE Buffer 1.1</i>	<i>10x Concentrate</i>
Orange G - 6x Ladepuffer	5 mM Orange G 0,4 mM Ficoll PM400
<i>Ponceau S-staining solution</i>	0,1 % Ponceau S, 5 % HAc
<i>Stripping Buffer</i>	25 mM Glycin 35 mM SDS 1 % Tween20 pH 2,0
Taq $\alpha$ I	10.000U/ml
3,5x Bis-Tris	1.3 M Bis-Tris; pH 6,5 – 6,8
4x LDS	2,5 M Tris 50 % Glycerine (86 %) 2,5 % Phenol red 294 mM LDS 2,1 mM EDTA
10x DTT (1,4 Dithiothreitol)	1 M DTT
10x TBE	(Tris Borat EDTA Puffer) 89 mM Tris base 90 mM boric acid 2 mM EDTA pH 8.0
20x TBS	1 M Tris 5 M sodium chloride
20x TBS-T	1 M Tris 5 M sodium chloride 0,05 % (m/v) Tween20
20x Transferpuffer	0,5 M Bicine 0,5 M Bis-Tris 20,5 mM EDTA
20x MOPS	1 M MOPS 1 M Tris

	69,3 mM SDS 20,5 mM EDTA
50x TAE	121 g Tris 28,55 ml Acetic Acid 50 ml 0.5 EDTA ph 8.0 auf 500 ml MilliQ

### 2.1.7 Lösungen für die Silbernitratfärbung

*Tabelle 6: Lösungen und ihre Zusammensetzung für die Silbernitratfärbung der aufgetrennten APOE DNA Fragmente nach enzymatischer Auftrennung und PAGE*

Lösung	Zusammensetzung
Ethanol (10 %)	20 ml Ethanol (99,8 %) 180 ml MilliQ H <sub>2</sub> O
Salpetersäure (1 %)	3 ml Salpetersäure (65 %) 197 ml MilliQ H <sub>2</sub> O
Silbernitrat (0,2 %)	8 ml silver nitrate solution (5 %) 192 ml MilliQ H <sub>2</sub> O
Natriumcarbonat (0.28 M) + 0.02 % Formaldehyd	8,76 g Natriumcarbonat 100 µl Formaldehyd (0.02 %) 250 ml MilliQ H <sub>2</sub> O
Essigsäure (10 %)	20 ml acetic acid (100 %) 180 ml MilliQ H <sub>2</sub> O

### 2.1.8 Primer

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

*Tabelle 7: Übersicht der verwendeten Primer, ihrer Sequenz und der der Sequenzrichtung*

Gen	Name	Sequenz	Richtung
Parkin Exon 4	SNP	GGC CGA TTC TCT TGG CAG TA	Vorwärts
Parkin Exon 4	SNP	TCA CAC CGT AAC AGA AGC CC	Rückwärts
Parkin Exon 10	SNP	TGT TGC ACA AGC CAG AGG AA	Vorwärts
Parkin Exon 10	SNP	GGG CAT GAT GCT GCT AAA GG	Rückwärts
Parkin Exon 11	SNP	ATC TCT TCC CCG CTC CTA CG	Vorwärts
Parkin Exon 11	SNP	ATC TCT TCC CCG CTC CTA CG	Rückwärts
APOE		GAG ACG CGG GCA CGG CTG TCC	Vorwärts
APOE		GCA CGC GGC CCT GTT CCA CC	Rückwärts

## 2.1.9 Restriktionsenzyme

Tabelle 8: Restriktionsenzyme, zugehöriger Puffer, optimale Arbeitstemperatur, Erkennungssequenz und zugehöriger Herstellerangabe

Enzym	Puffer	Optimale Aktivität (°C)	Erkennungssequenz	Hersteller
AlwNI	<i>Cut Smart Buffer</i>	37	5'...CAGNNN*CTG...3' 3'...GTC*NNNGAC...5'	NEB
BaeGI	<i>NE Buffer 1.1</i>	37	5'...GKGCM*C...3' 3'...C*MCGKG...5'	NEB
HhaI	<i>Cut Smart Buffer</i>	37	5'...GCG*C...3' 3'...C*GCG...5'	NEB
TaqαI	<i>Cut Smart Buffer</i>	65	5'...T*CGA...3' 3'...AGC*T...5'	NEB

## 2.1.10 Programme

Tabelle 9: Übersicht der verwendeten Programme und Softwares und Herstellerangabe

Programm	Hersteller
<i>Detection Device WB (Odyssey Fc)</i>	Binder Tuttlingen, D
<i>EnVision Manager</i>	PerkinElmer Wltham, Massachusetts, USA
<i>Gen5 Mikropate Reader and Image Software (Version 3.11)</i>	BioTek Instruments Winooski, Vermont, USA
<i>Graph Pad Prism 8</i>	GraphPad Softwaer Inc., La Yolla, USA
MS Office 2017	Microsoft Corporation, Redmond USA
<i>VisionWorks</i>	Analytik Jena AG, Jena, D

### 2.1.11 Antikörper Westernblot

Tabelle 10: Antikörper für den Westernblot mit zugehörigen Antikörpern, Antigen, Konzentration, Spezies, Herstellern und Artikelnummern

Primär-antikörper	Antigen	Konzentration	Spezies	Hersteller	Artikelnummer
Parkin	Kaninchen	1:200	Kaninchen	Abcam Cambridge, Vereinigtes Königreich	Ab15954
Anti- $\beta$ -actin	$\beta$ -actin	1:5000	Maus	Merck/Sigma- Aldrich, Darmstadt, D	A2228

### 2.1.12 Sekundärantikörper

Tabelle 11: Sekundärantikörper mit dem zugehörigen Antigen, Spezies, Konzentration und Herstellerangabe

Sekundärantikörper	Antigen	Spezies	Konzentration	Hersteller
IRDye 800CW <i>goat anti-Mouse</i>	Maus	Ziege	1:5000	LI-COR Biotechnology GmbH
IRDye 800CW <i>goat anti-Rabbit</i>	Kaninchen	Ziege	1:5000	LI-COR Biotechnology GmbH

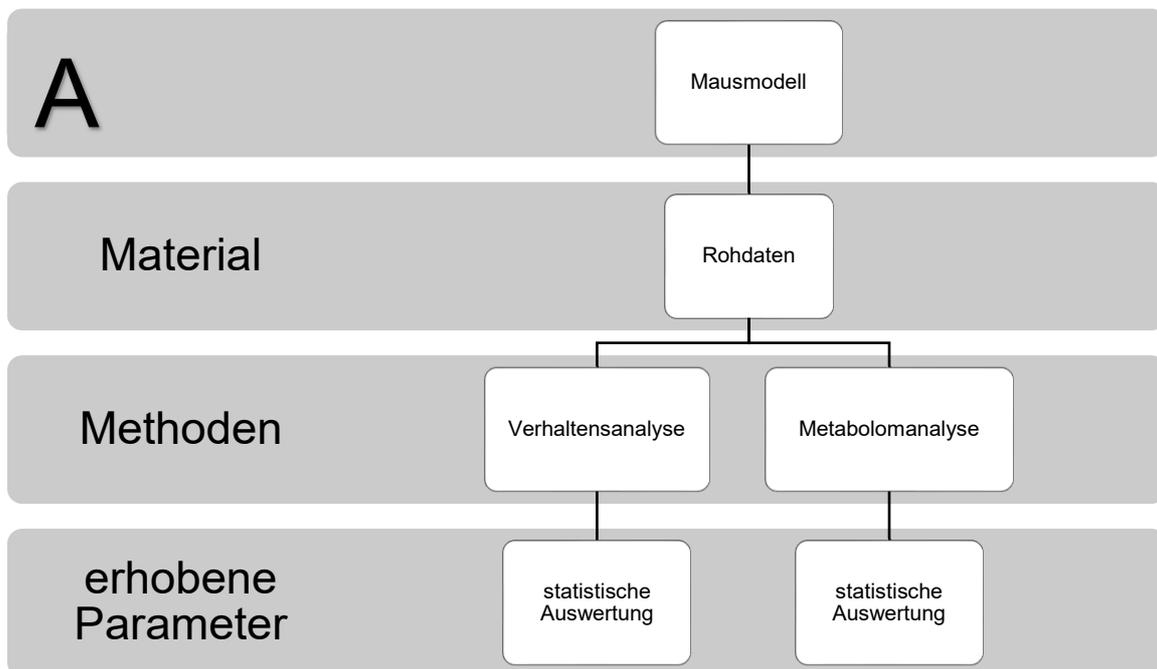
### 2.1.13 Antikörper TR-FRET

Tabelle 12: Übersicht der verwendeten Antikörper, ihrem Immunogen, Hersteller und der zugehörigen Artikelnummer

Bezeichnung	Immunogen	Hersteller	Artikelnummer des Herstellers
Parkin2-D2	AS 250-350 human <i>Parkin polyclonal</i>	abcam Cambridge, Vereinigtes Königreich	ab87198
Prk8-Tb	AS 399-465 human <i>Parkin monoclonal</i>	abcam Cambridge, Vereinigtes Königreich	ab77924

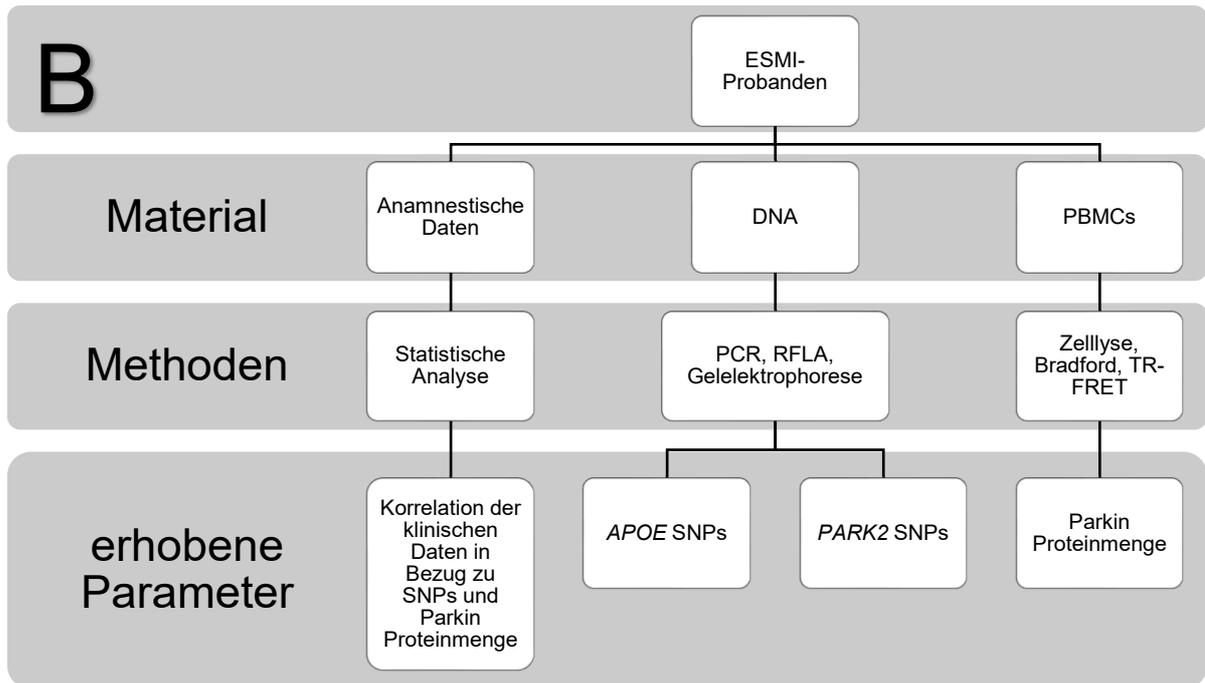
## 2.2 Methoden

Abbildung 4 zeigt eine Übersicht über die durchgeführten Methoden und erhobenen Parameter für die durchgeführten Auswertungen. Abbildung 4A stellt diese Übersicht mit den bereits im Vorfeld durchgeführten Methoden für das Mausmodell dar. Abbildung 4B zeigt dementsprechend eine Übersicht für die ESMI-Probanden mit den in dieser Arbeit durchgeführten Methoden und den dabei erhobenen Parametern.



**Abbildung 4: Zusammenfassung der vorhandenen Materialien und durchgeführten Methoden sowie die dadurch erhobenen Parameter**

*A: Mausmodell: Die vorhandenen Rohdaten, bereits vorhandene Ergebnisse der Verhaltensanalyse und Metabolomdaten wurden in dieser Arbeit statistisch ausgewertet*



**Abbildung 5: Zusammenfassung der vorhandenen Materialien und durchgeführten Methoden sowie die dadurch erhobenen Parameter**

*B: ESMI-Probanden: Hier lagen anamnestiche Daten vor, die statistisch analysiert wurden und schlussendlich mit den klinisch erhobenen Parametern korreliert wurden. Zudem lagen sowohl DNA- als auch PBMC-Proben vor. Die DNA wurde hinsichtlich der spezifischen SNPs (APOE und PARK2) mittels PCR, RFLA und Gelelektrophorese untersucht. Die PBMCs hinsichtlich der Proteinkonzentration von Parkin mittels Zellyse, Bradford und TR-FRET.*

## Molekularbiologische Methoden

### DNA-Methoden

#### 2.2.1 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Die in dieser Arbeit verwendete DNA lag aufgrund vorangegangener durchgeführter Analysen bereits in isolierter Form vor. Daher konnte sie direkt für folgende Versuche verwendet werden:

Mithilfe des BioPhotometers wurden Konzentrationsbestimmungen der verwendeten DNA-Proben durchgeführt. Die BlankwertEinstellung erfolgte mittels FGB3 Lösung aus dem Flexikit in welcher die DNA isoliert wurde. Hierfür wurde 1,5 µl FGB3 Lösung auf die gereinigten Glasplatten aufgetragen und als Blankwert eingestellt. Anschließend konnte die Glasplatte erneut gereinigt, 1,5 µl

der DNA wurde auf die Glasplatte pipettiert und mittels der Voreinstellung für dsDNA und dem eingestellten Blankwert die Konzentration bei 260 nm Wellenlänge bestimmt. Diese Wellenlänge entspricht dem Absorptionsmaximum des  $\pi$ -Elektronen-Bindungssystems der DNA-Basen. Zur Ermittlung der Reinheit der jeweiligen Probe, wurde diese zusätzlich bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Anhand dieser Konzentrationsbestimmung wurde dementsprechend die Menge für die Verwendung der Polymorphismenbestimmung zum Einsatz in die PCR bestimmt. Je nach Höhe der DNA-Konzentration musste die Menge der Probe folglich verdünnt werden.

### 2.2.2 Polymorphismenbestimmung

Zur Untersuchung des Parkinson-assoziierten Proteins Parkin wurde die DNA der Probanden hingehend auf drei im *PARK2*-Gen bekannten Polymorphismen untersucht. Hierbei handelt es sich um die Polymorphismen AG<sup>601</sup>C/AA<sup>601</sup>C (AS 167), G<sup>1239</sup>TA/C<sup>1239</sup>TA (AS 380) und G<sup>1281</sup>AT/A<sup>1281</sup>AT (AS 394).

Zur Untersuchung des Gens *APOE* wurde die DNA der Probanden hingehend auf die bekannten Polymorphismen untersucht. Dabei handelt es sich um die Polymorphismen  $\epsilon 2/ \epsilon 2$ ,  $\epsilon 2/ \epsilon 3$ ,  $\epsilon 3/ \epsilon 3$ ,  $\epsilon 3/ \epsilon 4$ ,  $\epsilon 2/ \epsilon 4$ ,  $\epsilon 4/ \epsilon 4$ .

Damit diese Untersuchung anhand der Gelelektrophorese möglich werden kann, musste die vorhandene DNA mittels Polymerase-Ketten-Reaktion amplifiziert werden.

### 2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur DNA-Amplifizierung

Bei der PCR handelt es sich um ein thermozyklisches Verfahren zur exponentiellen Vervielfältigung spezifischer DNA-Abschnitte. Indem ein Mastermix (Tabelle 13) mit den notwendigen Inhaltsstoffen der klassischen PCR, sowie den jeweils spezifischen Primern hergestellt wird, kann anschließend jeder einzelnen Probe der entsprechende Polymorphismus zugeordnet werden. Somit sollen im Verlauf dieser Arbeit die Polymorphismen im *PARK2* Aufschluss über eine potenzielle Korrelation von klinischen Parkinsonerkrankung (PD)-

Symptomen in SCA3-Patienten geben. Zu den klassischen Bestandteilen der PCR zählen, zusätzlich zu den bereits erwähnten Primern, der dNTP-Mix mit Desoxyribunukleosid-Triphosphaten (dNTPs) (mit den Basen A, C, G, T), als Bausteine der DNA-Synthese und die Taq-Polymerase. Zur Initiierung der PCR werden zunächst die Wasserstoffbrückenbindungen der DNA, welche als Doppelhelix vorliegt, bei hoher Temperatur denaturiert. Liegt die DNA anschließend als Einzelstrang vor, kann die Primerhybridisierung durch spezifische Anlagerung der jeweiligen Primer (Tabelle 14) für die Amplifikation der *PARK2* spezifischen SNPs (Bp601, Bp1239, Bp1281) komplementär zu den 5' Enden erfolgen. In Folge dessen werden ausschließlich die benötigten Abschnitte der DNA vervielfältigt. An den Primern startet die Hybridisierung der dNTPs. Hierfür wird im letzten Schritt der PCR, der Elongation, die eigentliche DNA-Synthese initiiert, indem mit den dNTPs eine Verlängerung der einzelnen Enden durch die Taq-Polymerase erzielt wird. Die Amplifizierung verläuft auf optimaler Arbeitstemperatur der Taq-Polymerase. Nach einer gewissen Laufzeit wird die Elongation durch einen Temperaturwechsel beendet und der Zyklus startet erneut. Sobald ausreichende Sequenzen zur Analyse amplifiziert wurden, kann die Finale Elongation starten. Nach Ende der Amplifikation liegt anschließend eine große Menge des benötigten PCR-Produkts vor. Das Programm zur Amplifizierung der *PARK2* SNPs ist in Tabelle 15 aufgelistet.

Tabelle 13: Übersicht des PCR-Ansatzes zur Amplifizierung der SNPs Bp601, Bp1239, Bp1281

Reagenzien	Volumen (µl)
10x PCR Puffer	2,0
Wasser, AMPUWA	13,3
dNTP Mix 10mM	0,5
Primer, vorwärts	1,0
Primer, rückwärts	1,0
Taq Polymerase	0,2
Isolierte DNA	2,0
Gesamtvolumen	20,0

Zu Beginn wurde somit ein Mastermix, wie in Tabelle 13 aufgelistet, hergestellt. Der Reaktionsansatz für die PCR setzte sich aus 18 µl Mastermix und jeweils 2

µl DNA zusammen. Danach wurde der Reaktionsansatz wie bereits beschrieben im Thermozykler amplifiziert.

*Tabelle 14: Übersicht der Primer zur Amplifikation der SNPs Bp601, Bp1239, Bp1281 mit der jeweiligen Laufrichtung, Sequenz, der Fragmentgröße (Bp) und der genauen Lage der Basenpaare (Bp)*

Primer	Richtung	Sequenz (5'-3')	Fragmentgröße (Bp)	SNP Bp
Parkin SNP Exon 4	Vorwärts	GGC CGA TTC TCT TGG CAG TA	696	601
Parkin SNP Exon 4	Rückwärts	TCA CAC CGT AAC AGA AGC CC	696	601
Parkin SNP Exon 10	Vorwärts	TGT TGC ACA AGC CAG AGG AA	648	1239
Parkin SNP Exon 10	Rückwärts	GGG CAT GAT GCT GCT AAA GG	648	1239
Parkin SNP Exon 11	Vorwärts	ATC TCT TCC CCG CTC CTA CG	441	1281
Parkin SNP Exon 11	Rückwärts	ATC TCT TCC CCG CTC CTA CG	441	1281

Tabelle 15: Übersicht über das Programm des G-Storm Thermozyklers zur Amplifikation der SNP Bp601, Bp 1239, Bp1281

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min)	Zyklus (Anzahl)
Temp. Schritt (Initiale Denaturierung)	95	5	
Temp. Schritt (Denaturierung)	95	0,45	35
Temp. Schritt (Anlagerung)	55	1	35
Temp. Schritt (Elongation)	72	1	35
Temp. Schritt (Finale Elongation)	72	6	
Lagerung	10	∞	

Zur weiteren Prozessierung der PCR-Produkte wurden diese in zwei Teile aufgeteilt. Eine Teilprobe (8.25 µl) wurde zur Durchführung des Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus von dem restlichen Probenvolumen abgetrennt. Die andere Teilprobe (11.75 µl) wurde bei 4°C gelagert.

## 2.2.4 APOE PCR

Die PCR wurde nach dem wie bereits bei 2.2.3 beschriebenen Vorgehen mit dem in Tabelle 16 beschriebenen Mastermix und dem in Tabelle 17 beschriebenen Programm im Thermozykler durchgeführt.

Tabelle 16: Übersicht des PCR-Ansatzes zur Amplifizierung SNPs APOE

Reagenzien	Finalkonzentration (c)	Volumen ( $\mu$ l)
H <sub>2</sub> O		17,3
10x PCR buffer, Qiagen	1x	2,5
MgCl <sub>2</sub>		2
dNTP mix	0,2 mM	0,5
Primer Forward V243	0,3 $\mu$ M	0,3
Primer Reverse V244	0,3 $\mu$ M	0,3
Taq Polymerase	1.25 U/ $\mu$ l	0,1
DNA		2
Total		25

Tabelle 17: Übersicht des Programms des G-Storm Thermozyklers zur Amplifikation SNP APOE

Schritt	Temperatur ( $^{\circ}$ C)	Zeit (min)	Zyklus (Anzahl)
Temperatur beheizter Deckel	110		
Starttemperatur	95		
Zyklusstart			
Temperatur Schritt	95	0,5	34
Temperatur Schritt	67	0,5	34
Temperatur Schritt	72	0,5	34
Zyklusende			
Temperatur Schritt	72	7	
Lagerung	12	$\infty$	

### 2.2.5 Restriktionsfragmentlängenanalyse (RFLP)

RFLP beruht auf der Tatsache, dass bei genomischer DNA individuell verschiedene Schnittstellen für Restriktionsenzyme existieren und dementsprechend spezifisch lange Restriktionsfragmente entstehen. Die Restriktionsenzyme schneiden ausschließlich an der jeweiligen Restriktionsregion unter Entstehung von „*sticky*“ oder „*blunt ends*“. Bei „*sticky ends*“ handelt es sich um kohäsive DNA-Fragmente, bei denen zueinander versetzte Enden entstehen. Hierbei findet man, je nach verwendetem Enzym, überhängende Basen entweder am 5'-Ende oder am 3'-Ende. Im Gegensatz dazu entstehen durch das Schneiden der Restriktionsenzyme bei „*blunt ends*“ glatte Enden, die nicht zueinander versetzte DNA-Fragmente vorweisen. Die Schnittstellen für die einzelnen Enzyme sind individuell verschieden, aufgrund dessen ist das Ergebnis jeweils ein Fragment spezifischer Länge. Die Ermittlung des Polymorphismus erfolgt anhand eines Vergleichs. Hierbei werden die in der RFLP entstandenen Fragmente bzw. deren Fragmentlängen mit DNA-Fragmenten bereits bekannter Länge verglichen. Dafür werden diese der Länge nach mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Über die ermittelte Länge kann nachfolgend der Haplotyp, entsprechend der Länge der Banden, erschlossen werden. Die für *PARK2* spezifischen Angaben über die Restriktionsenzyme sind der Tabelle 18 zu entnehmen.

Die abgetrennte Teilprobe (8.25 µl, wie unter PCR beschrieben) wurde mit dem entsprechenden Enzym (0.15 µl) und dem zugehörigen Puffer (1.25 µl) vermengt. Für *PARK2* gibt es für jedes der drei zu analysierenden SNPs ein Restriktionsenzym, welches eine spezifische optimale Aktivitätstemperatur besitzt. Damit das Enzym die Teilprobe verdauen konnte, musste dieser Mix in *PCR-Stripes* pipettiert werden. Diese wurden zur Restriktion bei der entsprechenden optimalen Aktivitätstemperatur für jeweils 90 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion zur Denaturierung der Enzyme für 20 Minuten bei 80 °C inkubiert und bei 10 °C bis zur Entnahme gelagert. Alle Temperaturschritte erfolgten im G-Strom GS1 PCR-Zykler. Während der Inkubation erkennen die Endonukleasen die spezifische DNA-Sequenz und

schneiden dort. Wir verwendeten ausschließlich Endonukleasen, die „sticky ends“ produzieren.

Tabelle 18: Restriktionsenzyme zur Auftrennung der DNA in Regio der SNP Bp601, Bp1239, Bp1281

SNP Bp	Endo-nuklease	Restriktionsposition	Restriktionsregion	Genotyp	Erwartete Produktlänge (bp)	Optimale Aktivität
601	AlwN1	360/357	5'...CAGNN N*CTG...3' 3'...GTC*NN NGAC...5'	A/A G/A G/G	696 339,357,669 339,357	37 °C
1239	BaeG1	161/157 367/363	5'...GKGCM *C...3' 3'...C*MCG KG...5'	C/C G/C G/G	161, 206, 281 161, 206, 208, 367 281,367	37 °C
1281	Taq $\alpha$ 1	228/230	5'...T*CGA ...3' 3'...AGC*T ...5'	A/A G/A G/G	441 213,228,441 213,228	65 °C

### 2.2.6 Enzymatische Auftrennung

Anhand des Enzyms HhaI (vgl. Tabelle 8) wurde die amplifizierte DNA geschnitten, um diese anschließend auf die 6 verschiedenen Genotypen des *APOE*-Gens (Tabelle 19) zu untersuchen.

Tabelle 19: Die 6 verschiedenen Genotypen des *APOE*-Gens

Genotypen	Fragmentlänge
ε2/ ε2	<b>39 + 16 + 91 + 18 + 83 + 7 + 11 + 13 + 32</b>
ε2/ ε3	<b>39 + 16 + 91 + 18 + 83 + 7 + 11 + 13 + 32 + 48 + 35 + 32</b>
ε3/ ε3	<b>39 + 16 + 91 + 18 + 48 + 35 + 7 + 11 + 13 + 32</b>
ε3/ ε4	<b>39 + 16 + 91 + 18 + 48 + 35 + 7 + 11 + 13 + 32 + 19 + 72</b>
ε2/ ε4	<b>39 + 16 + 91 + 18 + 83 + 7 + 11 + 13 + 32 + 72 + 48 + 35</b>
ε4/ ε4	<b>39 + 16 + 19 + 72 + 18 + 48 + 35 + 7 + 11 + 13 + 32</b>

Die enzymatische Auftrennung erfolgte unter Herstellung des in Tabelle 20 beschriebenen Mastermixes. Im Thermozykler fand die Restriktion mit dem in Tabelle 21 beschriebenen Programms statt.

Tabelle 20: Übersicht der Inhalte zur Herstellung der enzymatischen Auftrennung der Polymorphismen in *APOE*

Inhalt	Volumen (μl)
H <sub>2</sub> O	2,5
Cut Smart Buffer	1,5
Enzyme HhaI	1,0
PCR product	10
Total	15

Tabelle 21: Übersicht des Programms für den G-Storm Thermozykler für die enzymatische Auftrennung der Polymorphismen in APOE

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (h)
Temperatur beheizter Deckel	112	
Temperatur Schritt	37	4
Temperatur Schritt	65	0,25
Lagerung	10	∞

### 2.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Gel-Elektrophorese werden die DNA-Sequenzen nach ihrer Größe entsprechend durch Anlegen einer elektrischen Spannung aufgetrennt. Dieser Schritt erfolgt auf einem Agarosegel. Der Vorgang resultiert auf negativ geladenen Phosphatresten, welche sich im Rückgrat der DNA befinden. Die Phosphatreste sorgen dafür, dass die DNA innerhalb des entstandenen elektrischen Feldes in Richtung der Anode wandert. Zusätzlich bildet das Agarosemedium eine porige Struktur, welche der DNA den nötigen Widerstand zur Auftrennung bietet. Aufgrund des umgekehrt proportionalen Zusammenhangs zwischen Geschwindigkeit und Molekulargewicht der DNA-Stränge, wandern dementsprechend kleine DNA-Stränge schneller und somit weiter im Medium als größere DNA-Stränge.

Dieses Standardverfahren nutzten wir zur Genotypisierung der einzelnen *PARK2* SNPs, die zuvor mithilfe der PCR amplifiziert wurden. Zuerst wurde ein Agarosegel (2,5 %), bestehend aus 2,5 g Agarose, 100 ml TBE-Puffer mit 0,6 µg/ml Ethidiumbromid (Etbr), hergestellt. Etbr fungiert hier als Farbstoff. Er interkaliert in der DNA und wird mittels UV-Licht detektiert. Anschließend werden somit die PCR-Banden mittels *Analyzer* sichtbar gemacht. Zur Auswertung der Genotypen nach der Restriktionsfragmentlängenanalyse, wurden die vor der RFLP abgenommenen unverdauten Proben und die in der RFLP verdauten Proben zum direkten Vergleich nebeneinander auf das 2,5 %ige Agarosegel aufgetragen. Hierfür wurden jeweils 5 µl Orange G Lösung als Ladepuffer (vgl. Tabelle 5) zu 10 µl der verdauten (Teilprobe 1), und 10 µl der unverdauten

(Teilprobe 2) Probe, zugefügt. Dieser Ladepuffer erhöht die Dichte der Proben und gewährleistet somit, dass die Proben bei Auftragen in die Geltaschen absanken. Die Produkte der PCR wurden somit elektrophoretisch in dem Agarosegel der Länge nach aufgetrennt. Die Länge der entstandenen Banden konnte mit dem Größenstandard *O'Gene Ruler Ladder mix* (Tabelle 4), welcher zum Größenvergleich in die erste Tasche des Gels aufgeladen wurde, verglichen werden. Die Gele wurden ausschließlich in 1x TBE-Puffer und bei 120 V 30-45 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt. Die Länge der geschnittenen PCR-Produkte wurde anschließend mit der entsprechenden Produktlänge zur Bestimmung der Genotypen verglichen. Alle Gele wurden anschließend mit dem *Analyzer* und der *Vision Works Software* verbildlicht.

Zur Kontrolle der *APOE*-PCR wurde jeweils eine Agarose Gelelektrophorese mit einem 1,5 %-Gel durchgeführt (Tabelle 22). Auch das 1,5 % Gel wurde wie das 2,5 % Gel beschrieben mit dem Inhalt aus Tabelle 22 hergestellt.

Die Proben wurden jeweils mit 5 µl des PCR-Produktes und mit 5 µl Orange G vorbereitet und anschließend, nach einem in das erste *Well* pipettierten Ladepuffers mit 100 bp in die folgenden Wells pipettiert. Das Gel wurde bei 100 V 35 Minuten laufen gelassen und anschließend mit dem *UVP GelStudio PLUS analyzer* und der *VisionWorks Software* visualisiert.

Tabelle 22: Übersicht des Inhalts für ein Agarosegel 1,5%, klein

Inhalt	Volumen
Agarose	0,75 g
1x TBE	50 ml
EtBr	3 µl

### 2.2.8 PAGE-Gelelektrophorese

Für die anschließende Gelelektrophorese des *APOE*-Gens musste aufgrund der kleineren Fragmente, sowie der geringen Unterschiede zwischen den Fragmentgrößen ein 10 %iges Polyacrylamid-Gel, wie in Tabelle 23 beschrieben, hergestellt werden.

Die Probenvorbereitung erfolgte mit 3  $\mu$ l des verdauten PCR-Produkts und 3  $\mu$ l 6x DNA loading dye. Derselbe DNA loading dye wurde ebenfalls für die wie in Tabelle 24 hergestellten DNA-Leiter genutzt, die zum Längenvergleich der Fragmente in die erste und letzte Tasche gefüllt wurde.

Tabelle 23: Inhalte für die Herstellung des 10%igen Acrylamid-Gels

Inhalt (2 Gele)	Volumen
MiliQ Wasser	12,8 ml
TAE Buffer	400 $\mu$ l
Acrylamide 30 % 1:19	6,7 ml
TEMED	16 $\mu$ l
APS 10 %	120 $\mu$ l
Total	20 ml

Tabelle 24: Herstellung der DNA-Leiter zum Vergleich der Restriktionsfragmente in APOE

Bestandteile	Volumen ( $\mu$ l)
DNA ladder (0,5-1 $\mu$ g for 5mm lane)	1-2
6x DNA Loading Dye	0,5
Deionisiertes Wasser	1,5-0,5
Total	3

Zur Herstellung des Gels wurden zwei Glasplatten (*spacer plate* und *short plate*) mit Isopropanol gereinigt und in die innere Laufkammer der Elektrophoreseeinheit eingebaut. Mit einer Stripette wurde das, wie in Tabelle 23 beschrieben, hergestellte Gel zwischen die Glasplatten gefüllt und ein Kamm wurde direkt eingesetzt, um identisch große Taschen zu erhalten. Nach 15 Minuten war das Gel auspolymerisiert und konnte in das Elektrophoresebecken übertragen werden. Anschließend musste die Laufkammer mit Ladepuffer befüllt werden. Bei dem Laufpuffer handelte es sich um einen 1x TAE-Puffer (16 ml 50x TAE auf 800 ml MilliQ). Nun konnte der Kamm entfernt werden und mit dem Ladepuffer gespült werden. Anschließend wurden die vorbereiteten Proben in die Taschen des Gels geladen. Die jeweils erste und letzte Tasche wurde mit der

DNA-Leiter gefüllt, um die Fragmentlängen mit Längen bekannter Größe zu vergleichen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V und 250 mA für 1 Stunde.

#### *2.2.9 Färbung mit Etbr bei APOE-Bestimmung*

Für die Färbung des Gels mit Etbr wurde eine 1:50.000 Verdünnung hergestellt. Hierfür wurden 50 ml TAE und 1 µl Etbr in einem Plastikgefäß vermischt. Das Gel musste für 10-15 Minuten in dieser Flüssigkeit bei Raumtemperatur inkubieren. Anschließend konnte das Gel mit dem UVP *GelStudio PLUS analyzer* (analytic jena, Germany) und der *VisionWorks Software* visualisiert werden.

#### *2.2.10 Färbung mit Silbernitrat bei APOE-Bestimmung*

Als eine weitere durchgeführte Methode zur Färbung der aufgetrennten DNA wurde die Färbung mit Silbernitrat genutzt. Diese Methode sollte aufgrund ihrer detailreichen und hohen Sensitivität die kleinen Fragmentstücke deutlich aufgetrennt sichtbar machen. Hierfür wurde das Gel, auf dem sich die aufgetrennte DNA befand, welche mittels PAGE Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt wurde, von den Glasplatten der SDS-PAGE entfernt und mittels verschiedener Lösungen wie in Tabelle 25 dargestellt in einer Box auf dem Rüttler gefärbt. Wichtig für die Färbeschritte ist es, dass das Gel nach Inkubation mit der 0,2 % Silbernitratlösung nur noch lichtgeschützt in einer dunklen Box weiter gefärbt wurde. Sowohl die Silbernitratlösung als auch die 0,28 M Natriumcarbonat Lösung sollten vor jedem Färbeschritt neu hergestellt werden, alle weiteren gebrauchten Lösungen können wiederverwendet und gelagert werden. Alle genutzten Lösungen wurden wie in Tabelle 6 beschrieben hergestellt.

*Tabelle 25: Vorgehen bei der Silbernitratfärbung mit den jeweiligen Lösungen und der zugehörigen Inkubationszeit (in Minuten)*

Lösung	Inkubationszeit (Minuten)
Ethanol	10
Salpetersäure (1 %)	5
ddH <sub>2</sub> O (Waschschritt)	2 (2-Mal)
Silbernitrat (0,2 %)	20
ddH <sub>2</sub> O (Waschschritt)	2 (2-Mal)
Natriumcarbonat (0,28 M) + 0,02 % Formaldehyd	15 – 20
Essigsäure	0,5
ddH <sub>2</sub> O (Waschschritt)	2 (2-Mal)

## **Proteinbiochemische Methoden**

### *2.2.11 Lyse Mononukleärer Zellen des Peripheren Blutes (PBMC)*

Für die durchgeführten Versuche lag ein Teil der Proben bereits als lysierte Homogenate vor. Für alle weiteren Proben wurden lysierte Homogenate hergestellt. Dieses Vorgehen erfolgte in einer sterilen Werkbank in der Zellkultur, um Kontaminationen zu vermeiden.

Zur Herstellung der Homogenate, wurden die bei -80 Grad gelagerten Falcons, welche die PBMCs enthielten, in einem Wasserbad aufgetaut. Hierfür wurden die Pellets zur Reinigung in 1 ml DPBS aufgenommen. Anschließend mussten die *Tubes* gevortext werden, bis sich die Pellets vollständig aufgelöst hatten. Um die PBMCs für folgende Versuche nutzen zu können, wurden die Falcons bei 500 rcf 5 Minuten zentrifugiert und der entstandene Überschuss abgesaugt. Hierbei musste darauf geachtet werden, kein Zellmaterial abzusaugen. Dieser Waschvorgang wurde bis zu 2-mal, je nach Verschmutzungsgrad, mit DPBS wiederholt.

Zu den gewaschenen Pellets konnte anschließend 15 bis 30  $\mu\text{l}$  Lysepuffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 5), je nach Größe der Pellets (kleines Pellett 15  $\mu\text{l}$  Lysepuffer, großes Pellet 30  $\mu\text{l}$  Lysepuffer), hinzugefügt werden.

Folgend war eine Inkubation von 30 Minuten auf Eis. Während dieser Inkubationszeit wurde jedes Falcon zur vollständigen Lyse der PBMCs alle 10 Minuten für eine Minute gevortext.

Mittels dieses Vorgangs folgt die Entstehung von vollständigen Homogenaten, bestehend aus Zellinhalt und Resten der Zellwände.

Diese Homogenate konnten entweder direkt für weitere Versuche genutzt oder anschließend bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

Hierbei wurde darauf geachtet die Auftauzyklen möglichst zu reduzieren, um eine möglichst hohe und anhaltende Qualität der Proben für alle Versuche zu gewährleisten.

#### *2.2.12 Proteinbestimmung nach Bradford*

Die Proteinbestimmung nach Bradford ist eine kolometrische Methode zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen (Bradford, 1976). In dieser Arbeit wurde anhand dieser Methode der Gesamtproteingehalt der vorhandenen PBMCs bestimmt. Hierbei kann durch gleichzeitige Erstellung einer Kalibrierungsgeraden unter Verwendung einer bekannten Menge Rinderserumalbumin (BSA) zur Proteinkonzentration die unbekannte Probe bei einer Absorption von 595 nm quantifiziert werden. Denn mittels einer Farbreaktion, abhängig von der Bindung des Farbstoffs an Proteine, ergeben sich unterschiedlich starke Absorptionen der verschiedenen Proteine. Hierfür wurden die lysierten PBMC-Proben mit 1  $\mu\text{l}$  auf 799  $\mu\text{l}$  MilliQ  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt. Für die Eichreihe wurde jeweils 0,25 mg/ml BSA in einer Menge von jeweils 0, 1, 2, 5, 10, 15, 20  $\mu\text{g}$  auf 800  $\mu\text{l}$  MilliQ  $\text{H}_2\text{O}$  aufgefüllt. Zwei Teile Bradford-Reagenz wurden mit drei Teilen Wasser verdünnt und anschließend je 200  $\mu\text{l}$  zu den verdünnten Proben und der Eichreihe gegeben und durch den *Microplate Reader* gemessen. Mit Hilfe dieser Eichkurve konnte der Gesamtproteingehalt der einzelnen Proben folglich berechnet werden. Diese Berechnung erfolgte in Excel

über die Funktion  $y = m \cdot x + t$  (m: Steigung, t: y-Achsen-Abschnitt) mit Hilfe der gemessenen Extinktion. Anschließend folgte die Berechnung der Konzentration in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  unter Einbeziehung des Gesamtvolumens der Probe und der jeweiligen

Vorverdünnung mit der Formel: 
$$\frac{\text{Proteinmenge}}{\frac{\text{eingesetztes Endvolumen}}{1000}}$$

### 2.2.13 Western Blot Analysen

Da für diese Arbeit die Einzelproteinmenge des Proteins Parkin von Bedeutung war, musste eine Methode zur Bestimmung dieser gefunden werden. Beim Western Blot handelt es sich um ein Standardverfahren in der Proteinanalyse. Hierbei werden die aufgetrennten Proteine von einem Gel auf eine Membran transferiert, was als *Blotting* bezeichnet wird. Anschließend können die Proteine mithilfe von spezifischen Antikörpern detektiert und mittels enzymgekoppelten Sekundärantikörpern schlussendlich visualisiert werden.

### 2.2.14 Vorbereitung der Proben

Zuerst werden die Proben in einem elektrischen Feld separiert. Diese Trennung erfolgt unter Nutzung der Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page), einer Variante der Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Anschließend werden die bereits getrennten Proteine auf eine geeignete Membran durch Elektroblotting transferiert. Dieses Verfahren immobilisiert die Proteine und sorgt dafür, dass sie detektiert werden können.

Für den Western Blot musste vorerst eine Ultraschall Behandlung der bereits lysierten Homogenate durchgeführt werden, um eine gute Proben-Homogenität zu gewährleisten.

Anschließend wurden die Proben zusammen in einen Bradford (wie in 2.2.12 Proteinbestimmung nach Bradford beschrieben) aufgetragen. Um die Proteine ausschließlich der Größe nach aufzutrennen, war es notwendig die Proben vor der SDS-Page vorzubereiten, sodass alle Proben negative Ladung erhielten.

Zur Proteinisolierung wurde dementsprechend ein Mastermix mit einem Finalen Volumen von 20  $\mu\text{l}$  hergestellt. Dieser besteht aus 7,5  $\mu\text{l}$  4x Lithium Dodecyl Sulfat (LDS), welches sicherstellt, dass das Parkin eine konstante negative Ladung aufweist und somit nur nach seinem molekularen Gewicht, unabhängig zur vorherigen Ladung, aufgetrennt wird. Weiterhin bestand der Mastermix aus 3,0  $\mu\text{l}$  1 M 1,4-Dithiothreitol (DTT), welches dafür sorgte, dass alle Sulfid Bindungen getrennt wurden und das Protein linearisiert vorlag. Der Rest des Mastermixes bestand aus der jeweiligen Probe, welche mit DPBS verdünnt wurde, sodass jede Probe die gleiche totale Konzentration von 50  $\mu\text{g}$  besaß. Um das Protein zu denaturieren, wurden alle vorbereiteten Proben bei 70 °C für 10 Minuten mit 600 rpm im Thermoschüttler inkubiert und erneut Ultraschall-behandelt. Bis zur Auftrennung wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

### 2.2.15 SDS-Page

Zur Auftrennung der Proteine wurde ein Polyacrylamidgel als Trennmedium genutzt. Abhängig von der Effizienz der Trennung und der Größe des Proteins wurde festgelegt, wie hoch die Konzentration des (Bis-)Acrylamid sein musste. Das fertiggestellte Gel bestand aus 1/3 Sammelgel und 2/3 Trenngel, welche übereinander gegossen wurden.

Bevor die Gele hergestellt werden konnten, wurden zwei Glasplatten (*spacer plate und short plate*) mit Isopropanol gereinigt und zusammen in eine Kammer zum Gießen des Gels eingebaut. In dieser Arbeit sollte das Protein Parkin, welches eine Molekularmasse von 52 kDa hat, getrennt werden. Somit wurde ein 12 % Trenngel und ein 6 % Sammelgel hergestellt. Die Zusammensetzung der Gele ist Tabelle 26 zu entnehmen.

Tabelle 26: Gelzusammensetzung für SDS-Page

	Trenngel	Sammelgel
Konzentration	12 %	6 %
Inhaltsstoffe	Volumen	
MilliQ H <sub>2</sub> O	3,16 ml	2,58 ml
3,5x Bis-Tris Puffer	2,84 ml	1,42 ml
(Bis-)Acrylamid 29:1 (30%)	4,00 ml	1,00 ml
APS 10%	60 µl	30 µl
TEMED	8 µl	4 µl

Als erstes wurde das Trenngel hergestellt und zwischen die gereinigten und getrockneten Glasplatten gefüllt. Für einen gleichmäßigen und geraden Abschluss zwischen den Gelen wird Isopropanol während des Aushärtens über die Trenngelschicht gefüllt. Nach fertiger Aushärtung wurde das Isopropanol wieder entfernt. Anschließend wurde das Sammelgel (Tabelle 26) hergestellt und auf das bereits ausgehärtete Trenngel aufgetragen. Sofort nach Einfüllen des Sammelgels wurde ein Kamm der passenden Größe mit 10 identischen Taschen, für Proben und Marker, von oben eingeführt und belassen, bis auch dieses Gel ausgehärtet war. Nach vollständiger Aushärtung wurde zuerst die innere Laufkammer, in der sich das Gel befand, in das Laufbecken eingespannt, folgend wurden sowohl die Kammer als auch das Becken mit 1x MOPS-Puffer aufgefüllt. Bevor man die Taschen mit den Proben befüllen konnte, musste erst der Kamm entfernt und die Taschen mit dem 1x MOPS-Puffer gespült werden. Die Proben wurden gevortext und die Taschen jeweils mit 20 µl der vorbereiteten Proben befüllt. Die erste und letzte Tasche diente zur Aufnahme von jeweils 1,5 µl Marker, zur späteren Fragmentlängenkontrolle. Damit eine gleichmäßige Lauffront entstehen konnte, war anzustreben alle vorhandenen Taschen zu befüllen. Dadurch kommt es am Ende nicht zu einer ungleichmäßigen Lauffront im Gel. Die Laufzeit betrug 1 Stunde und 30 Minuten bei 100 V und 250 mA.

### 2.2.16 Western Blot

Für den Western Blot werden die bereits durch die SDS-Page separierten Proteine auf eine PVDF-Membran (für Parkin 8,5 mm x 7,5 mm) mit einer Porengröße von 0,2 µm übertragen. Durch diese Übertragung ist die Identifizierung der Proteine mittels späterem *Elektroblotting* möglich. Denn die negativ geladenen Proteine wandern von der Kathode zur Anode und binden folglich an die PVDF-Membran. Die feste Bindung an die Membran sorgt für eine Immobilisierung der Proteine, welche daraufhin durch die Primärantikörper angreifbar werden und anschließend mittels Immunfärbung visualisiert werden können.

Die vorbereitete PVDF-Membran wird in reinem Ethanol aktiviert und anschließend mit MilliQ gewaschen. Dies ermöglicht die Bindung der Proteine im Transfer. Die *Whatman Paper* (9 mm x 9 mm), welche als Filterpapier dienen, und die PVDF-Membran wurden danach in Transferpuffer eingelegt. Diesen Vorgang nennt man Äquilibrieren. Anschließend wurde das Gel aus der Elektrophoreseeinheit entfernt und ungenutzte Ränder wurden abgeschnitten. Mittels einer Kompressionskassette, in der sich auf jeder Seite ein Faserpolster befand, wurde das Gel mit der PVDF-Membran oberhalb jeweils von zwei Filterpapieren (*Whatman Paper*) umschlossen und in die Kompressionskassette eingepackt. Hierbei musste darauf geachtet werden keine Blasen zwischen die einzelnen Bestandteile zu bringen, da diese den Proteintransfer beeinträchtigen können. Die fest verschlossene Kassette wurde anschließend in den Tank eingesetzt, in dem sich Transferpuffer befand. Bei diesem Transfer war die Kassette vollständig mit Puffer bedeckt (*Wet-Transfer*). Zur Verhinderung des Erhitzens des Puffers wurde ein Kühlungssystem mit einer Temperatur von 25 °C eingeschaltet. Zusätzlich hielt ein Rührfisch den Puffer in Bewegung. Die Laufzeit des Transfers betrug 2 Stunden bei 80 V und 100 mA.

Zur Überprüfung, ob der Proteintransfer erfolgreich war, wurde die Membran für ca. 5 Minuten in Ponceau S Lösung reversibel gefärbt. Hierfür musste die Membran in eine kleine Box gelegt und vollständig mit Ponceau S Lösung

bedeckt werden um dann bei Raumtemperatur (RT) auf dem Rüttler zu inkubieren. Hiernach konnte die Membran in ihrer Größe auf ein angemessenes Maß reduziert werden, bevor sie erneut 2-mal mit MilliQ gewaschen wurde. Anschließend konnte die Färbung auf dem Wippschüttler mit 1x TBS entfärbt werden.

### 2.2.17 Antikörperinkubation

Für die Detektion der gesuchten Proteine wurden alle weiteren Schritte in einem 15 ml Falcon durchgeführt. Hierfür wurden die Membranen in ein Falcon überführt und alle unspezifischen Bindungsstellen mit Blocking-Reagenz über 1 Stunde bei RT geblockt. Nach dem Blocken erfolgte ein erneuter Waschgang mit 1x TBS-T Puffer von 3 Durchläufen. Hierbei wurde überschüssiges Milchpulver entfernt. Da in dieser Arbeit ausschließlich Parkin und als Ladekontrolle Anti- $\beta$ -Actin nachgewiesen werden sollte, wurde zuerst der Primärantikörper Parkin (ab15954) (vgl. Tabelle 12) auf ein Endvolumen von 5 ml und einer Konzentration 1:200 mit 1x TBS-T verdünnt und in das Falcon gefüllt. Nachdem eine Inkubation über Nacht bei 4 °C stattfand, erfolgten drei weitere Waschschriffe über 5 Minuten mit jeweils 5 ml 1x TBS-T Puffer. Schlussendlich wurde eine finale Inkubation für 1 Stunde bei RT mit geeigneten Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpern, die sich gegen die Spezies des Primärantikörpers richten, durchgeführt. Die genutzten Sekundärantikörper sind Tabelle 11 zu entnehmen. Diese wurden ebenfalls auf ein Endvolumen von 5 ml bei einer Konzentration von 1:5000 verdünnt. Die Inkubation musste aufgrund der Fluoreszenzmarkierung lichtgeschützt auf einer Rollwippe stattfinden. Ein letzter Waschgang mit 4 Wiederholungen für jeweils 5 Minuten mit 5 ml 1x TBS-T Puffer erfolgte im Anschluss.

Die Detektion erfolgte mithilfe des Odyssey FC (Li-COR Biotechnology) bei 800 nm. Um anschließend Anti- $\beta$ -Actin nachweisen zu können musste der Sekundärantikörper gegen Parkin entfernt werden. Dieser Vorgang nennt sich *Membran-Stripping*. Hierfür wurde 10 ml *Stripping-Puffer* verwendet und in das Tube gefüllt, um dort 10 Minuten zu inkubieren. Dieser Vorgang wurde 2-Mal

wiederholt. Anschließend erfolgte ein erneuter Waschgang (3-Mal mit 5 ml 1x TBS-T Puffer). Folglich kann die Membran wieder geblockt und der bereits beschriebene Vorgang mit Anti- $\beta$ -Actin als Ladekontrolle durchgeführt werden.

#### *2.2.18 Proteinbestimmung mittels Förster-Resonanz-Energietransfer (TR-FRET)*

Um eine sehr geringe Proteinmenge von Parkin in PBMCs sensitiv nachweisen zu können, wurde zur Analyse der Einzelproteinmenge die Methode des TR-FRET in unserem Labor etabliert.

Sie basiert auf der Gegebenheit, dass zwei spezifische Antikörper, welche fluoreszenz-markiert wurden, an ein bestimmtes Protein-Molekül binden und deren Fluoreszenzemission nach Anregung durch einen Laser gemessen werden kann. In dieser Arbeit ist der TR-FRET zur Bestimmung des Proteins Parkin genutzt worden.

Es gibt immer ein Donor- und ein Akzeptormolekül, welche am gleichen Molekül binden. Falls diese Antikörper in nächster Nähe von 5-9 nm binden, erfolgt daraufhin ein Energietransfer dessen Höhe in einem detektierbaren Fluoreszenzsignal resultiert.

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Antikörpern handelt es sich um Prk8-Tb als Donor und Parkin2-D2 als Akzeptor (siehe Tabelle 12), welche im Folgenden mit Tb und D2 abgekürzt werden.

Die verwendete Probenkonzentration wurde in vorherigen Versuchen auf eine für diese Versuche ideale Menge von 0,2-0,4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  ermittelt und in jeweils 5  $\mu\text{l}$  Volumen mit DPBS verdünnt. Die verwendeten Proben lagen als Homogenate vor und wurden in Duplikate auf eine 384-well Platte pipettiert. Als Negativkontrolle dienten jeweils bis zu 10 *Wells*, in welche DPBS, das als Lysepuffer für die Proben diente, geladen wurde.

Der Antikörpermix bestand aus sowohl 0,3  $\text{ng}/\mu\text{l}$  Tb und 10  $\text{ng}/\mu\text{l}$  D2, als auch der erforderlichen Menge Detektionspuffer. Dieser Antikörpermix wurde für jeden Versuch frisch vorbereitet. Zu jeder Probe, sowie zu den Negativkontrollen, musste 1  $\mu\text{l}$  des Antikörpermix pipettiert werden.

Zur Kontrolle erfolgte jeweils nach Zugabe des Antikörpermix eine Kontrollmessung im *Multiplate Reader* (EnVision). Für die Inkubation von 24 Stunden bei 4 °C, wurde die 384-well Platte in Aluminiumfolie eingepackt und sicher im Kühlschrank gelagert. Nach dieser Inkubationszeit konnte die tatsächliche Messung erfolgen.

Um die Rohdaten in ein korrespondierendes Signal zu konvertieren, musste eine Kalkulation stattfinden, die ihren Quotienten der Werte bei den Wellenlängen 665 nm und 620 nm erhielt. Zudem musste das Hintergrundsignal über folgende Gleichung rausgerechnet werden:

$$\Delta F = \frac{\text{Ratio}_{620}^{665}(\text{sample}) - \text{Ratio}_{620}^{665}(\text{background})}{\text{Ratio}_{620}^{665}(\text{background})} * 100$$

Um die Werte auf die bereits durch die Proteinbestimmung mittels Bradford ermittelte Gesamtproteinmenge zu beziehen und somit die finale Signalstärke zu ermitteln, musste diese anhand der folgenden Gleichung ermittelt werden.

$$\Delta F_c = \frac{\Delta F}{\text{total amount of protein Bradford} \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}}}$$

## 2.3 Statistik

Die Statistik der Metabolomdaten wurde durch die Firma *MedDay Pharmaceuticals* durchgeführt und ausschließlich durch mich ausgewertet. Hierfür waren Rohdaten und die Ergebnisse des *Kruskal-Wallis* Test vorhanden.

### 2.3.1 Verwendete Tests zur statistischen Analyse

Für die Auswertung der Daten und die graphische Darstellung dieser wurde das Programm GraphPad PRISM genutzt.

Die Durchführung der Verhaltensanalyse der Mäuse erfolgte bereits im Vorfeld dieser Arbeit. Die statistische Analyse erfolgte hingegen durch mich. Hierbei wurde bei dem RotaRod Test immer eine *ANOVA* durchgeführt. Die restlichen Tests wurden bei longitudinalen Tests mittels *Turkey multiple comparison* Test, alle anderen mittels *Welsh Correction* analysiert.

Die Analyse der Patientendaten erfolgte ausschließlich durch mich.

Vor jeder Analyse wurde der *Shapiro Wilk* Test auf Normalverteilung einer Gauß'schen Verteilung angewendet. Anschließend wurde bei Normalverteilung  $\leq 2$  n der *t-Test* und bei Normalverteilung mit  $\geq 2$  n eine *ANOVA* mit *multiple comparisons* durchgeführt. War keine Normalverteilung gegeben, wurde bei mehr als zwei Gruppen der *Kruskal-Wallis* Test durchgeführt und bei weniger als zwei Gruppen der *Mann-Whitney* Test.

Alle Signifikanzen  $p \leq 0,05$  wurden mit (\*) markiert, (\*\*) zeigt Signifikanzen von  $p \leq 0,01$  und (\*\*\*) zeigt Signifikanzen  $p \leq 0,001$ . Lagen die Ergebnisse nahe dem signifikanten Bereich von  $p=0,05$ , wurden diese mit ihrem Punktwert beschriftet. Normalverteilte Diagramme zeigen den Median + SEM und nicht Normalverteilte Diagramme zeigen den Median + IQA, sofern nicht anders beschriftet.



### 3 Ergebnisse

Da sich bei einigen SCA3-Patienten PD-Symptome zeigen, sollte der zugrunde liegende Zusammenhang genauer untersucht werden. Dabei ist die direkte Interaktion der Deubiquitinprotease ATXN3 und Parkin als E3-Ligase, welche für die Entstehung von juvenilem Parkinson verantwortlich gemacht wird, ein zu untersuchender Faktor.

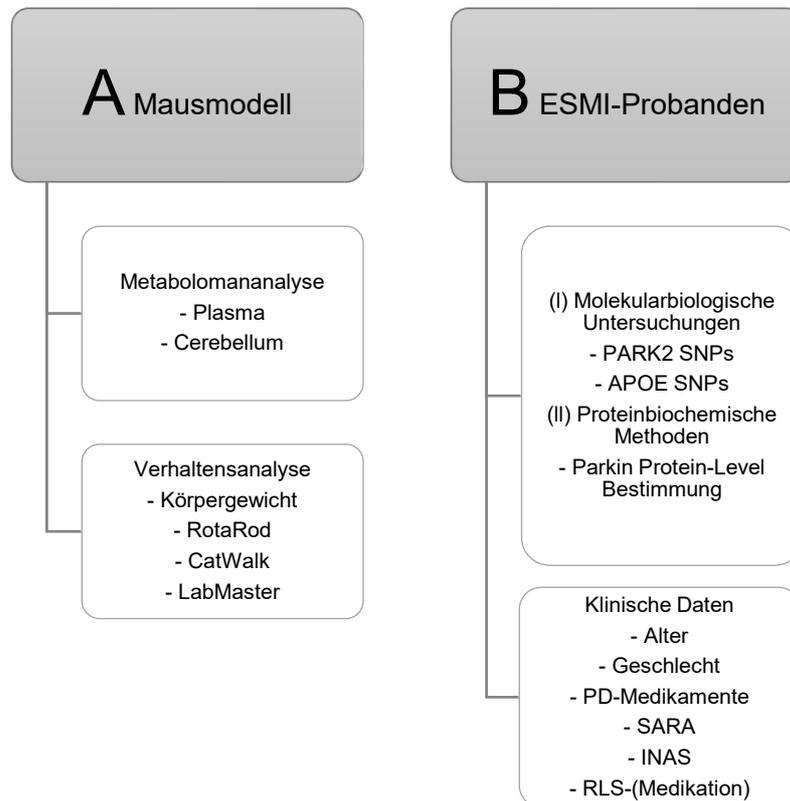
Derzeit ist noch unklar ob genetische Veränderungen oder die Parkin-Expression für die PD-Symptome in SCA3 verantwortlich gemacht werden können. Aus diesem Grund teilt sich die Arbeit in 2 Teile.

Der erste Teil (A) behandelt die grundlagenwissenschaftliche Auswertung eines SCA3 Mausmodells, welches mit einer Parkin *knockout* Maus gekreuzt wurde. Zusätzlich zu dieser Auswertung erfolgten verhaltensanalytische und neuropathologische Untersuchungen. Dies sollte zur Aufklärung des Einflusses von Parkin auf die Pathogenese der SCA3 beitragen.

Der zweite Teil (B) dieser Arbeit behandelt die Analyse von Parkin in SCA3-Patienten. Als Grundlage diente die ESMI-Kohorte, welche SCA3-Patienten, präataktische Mutationsträger und Kontrollprobanden beinhaltete. Diese Mutationsträger bestehen aus Probanden mit und ohne Parkinson (PD)-Symptome. Hierfür wurde die DNA dieser Probanden auf die gängigen *PARK2* SNPs untersucht und die Parkin Protein-Level in PBMC-Proben mittels TR-FRET bestimmt. Da die Untersuchung der APOE SNPs mit den beschriebenen Methoden in unserem Labor noch weiter etabliert werden muss, um aussagekräftige Ergebnisse zu liefern und diese Etablierung im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgen konnte, wurden daher nur Vorarbeiten zur Etablierung geleistet. Aus diesem Grund können hier keine Ergebnisse der APOE SNPs miteinbezogen werden. Ein weiterer großer Baustein dieser Arbeit war der erstmalige Bezug der molekularbiologischen Daten des Patientenmodells auf ihre klinischen Daten und somit der Bezug zwischen der genotypischen und phänotypischen Ausprägung der SCA3 und des Einflusses von Parkin auf die symptomatische Ausprägung der SCA3 Mutationsträger. Dieser Bezug erfolgte auf klinische Daten wie beispielsweise PD-Medikation, PD-

Symptome, aber auch auf Daten wie Alter, Geschlecht, SARA und INAS sowie Restless-Leg-Syndrom (RLS) und dessen Medikation.

In Abbildung 6 ist eine Übersicht der 2 Teile dieser Arbeit mit ihrem Inhalt dargestellt.



**Abbildung 6: Übersichtsdiagramm zur Darstellung der 2 Teile dieser Arbeit**

*A: Mausmodell mit Metabolomanalyse und Verhaltensanalyse, B: ESMI-Probanden und an ihnen durchgeführte molekularbiologische Untersuchungen (PARK2 SNPs, APOE Genotypisierung), Proteinbiochemische Untersuchungen (Parkin Protein-Level Bestimmung), klinische Daten (Alter, Geschlecht, PD-Medikamente, INAS, SARA, RLS-(Medikation))*

## TEIL A:

### **Kreuzung eines SCA3 Mausmodells und Parkin *knockout* Modells zur Aufklärung des Einflusses von Parkin auf die Pathogenese der SCA3**

Alle Laboranalysen wie Zucht, Haltung, Durchführung der Verhaltensanalyse und Präparation der Tiere waren zu Beginn dieser Arbeit bereits abgeschlossen. Diese Arbeit beinhaltet nur die Auswertung der hierfür zur Verfügung gestellten verhaltensanalytischen Daten.

Die in Tabelle 1 aufgeführten Genotypen sind die den durchgeführten Analysen zugrunde liegenden verwendeten Mausmodelle. Von jedem Genotyp waren für die Analysen 10 Individuen, jeweils 5 weibliche und 5 männliche vorhanden. Diese vier verschiedenen Genotypen wurden in die nachfolgenden Analysen einbezogen:

- (I) 10 Wildtyp (WT) Mäuse, welche sowohl das murine *Ataxin-3* Gen als auch das murine *PARK2* Gen exprimieren.
- (II) 10 homozygote Parkin *knockout* (ko/ko) (*PARK2* ko) Mäuse, welche homozygot nur das murine *Ataxin-3* Gen exprimieren, jedoch nicht mehr das murine *PARK2* Gen.
- (III) 10 YAC84Q (*single mutant*) (SCA3 YAC) Mäuse, welche sowohl das murine *Ataxin-3* Gen, als auch das murine *PARK2* Gen, sowie zusätzlich den humanen Lokus inklusive des humanen Promoter und aller 3' und 5' regulatorischen Elemente des humanes *ATXN3* mit 84 Glutaminen exprimieren.
- (IV) 10 YAC84Q/*PARK2* (*double mutant*) (dm-YAC/*PARK*) Mäuse, welche das murine *Ataxin-3* Gen exprimieren. Das murine *PARK2* Gen wurde homozygot ausgeschaltet. Der humane Lokus, welchen die SCA3 YAC Mäuse exprimieren, wird bei der dm-YAC/*PARK*-Maus hemizygot exprimiert.

Jede dieser Mäuse wurde, wie in Abbildung 7 ersichtlich, jeweils für eine Metabolomanalyse sowohl eine Probe aus dem Plasma als auch des

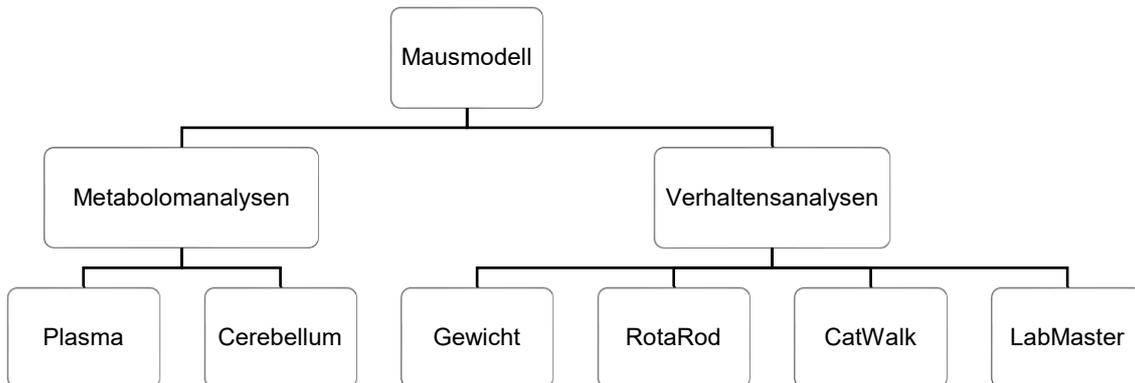
Cerebellums im Alter von 2 Monaten (vor Erkrankungsbeginn) und 12 Monaten (Neurodegeneration bereits vorhanden) zur Analyse entnommen.

Weiterhin wurden zur phänotypischen Bewertung vier verschiedene Verhaltensanalysen durchgeführt. Eine Übersicht dieser Analysen ist ebenfalls in Abbildung 7 dargestellt. Diese Analysen dienten der Bewertung des Körpergewichts, der Balance und Koordination durch das RotaRod, des Laufmusters mittels Catwalk, der Aktivität und des Angstverhaltens der einzelnen Mäuse mittels LabMaster. Diese Analysen fanden über einen Zeitraum von bis zu 15 Monaten statt, aber die jeweiligen Untersuchungen fanden zu unterschiedlichen Zeitpunkten statt (Abbildung 8). In einem zweiwöchigen Rhythmus erfolgte eine Körpergewichtsmessung. Balance und Koordination wurden durch den RotaRod Test alle 3 Monate, im Alter von 3, 6, 9, 12 und 15 Monaten durchgeführt. Der Catwalk Test zur Kontrolle des Laufmusters und -verhaltens wurde mit 12 und 15 Monaten durchgeführt und die Ergebnisse der LabMaster Untersuchung zur Analyse von Aktivität und Angstverhalten liegen zu einem Alter von 3, 9 und teilweise mit 15 Monaten vor.

Für diese Arbeit wurde lediglich die Auswertung dieser Analysen durchgeführt, die Untersuchungen sind zu einem früheren Zeitpunkt bereits durch Mitarbeiter des Instituts für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik durchgeführt worden. Die Metabolomanalyse sowie die Probenentnahme war ebenfalls bereits im Vorhinein durch Labormitarbeiter und durch das Unternehmen *MedDay Pharmaceuticals* durchgeführt worden. In dieser Arbeit erfolgte ausschließlich die Auswertung dieser Ergebnisse.

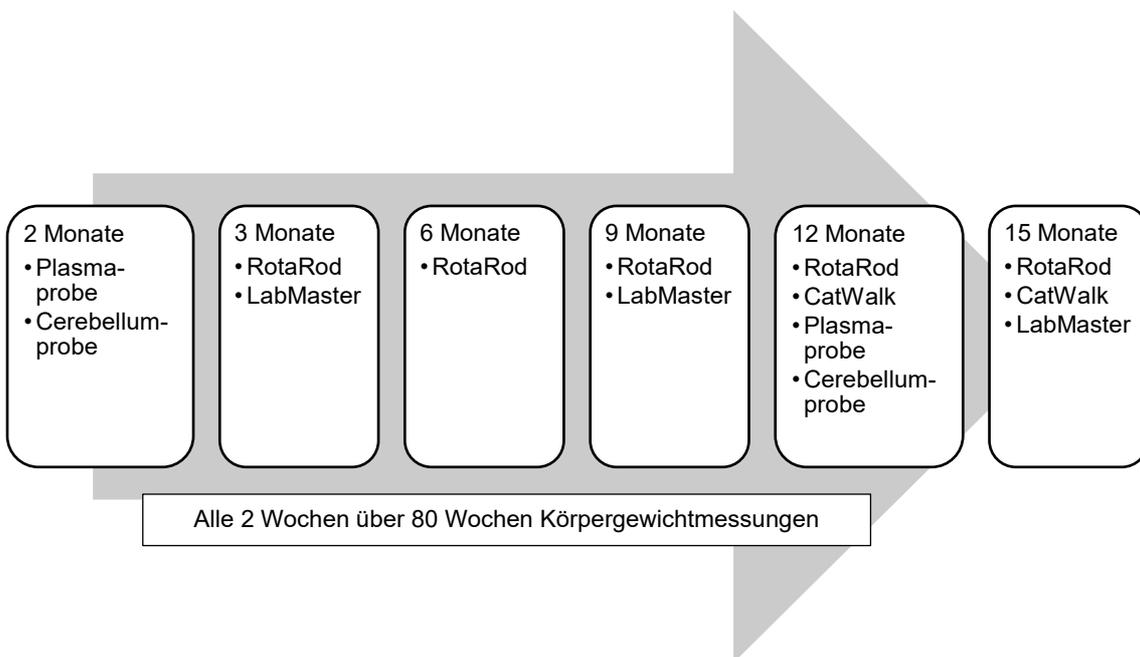
Tabelle 27: Zusammenfassung der den durchgeführten Analysen zugrundeliegenden verwendeten Mausmodelle mit ihrer Bezeichnung, der jeweiligen Abkürzung und der zugehörigen exprimierten Gene

	Mausmodell			
Bezeichnung	Wildtyp	Parkin <i>knockout</i> (ko/ko)	YAC84Q ( <i>single mutant</i> )	YAC84Q/PARK2 ko ( <i>double mutant</i> )
Abkürzung	WT	PARK2 ko	SCA3 YAC	dm-YAC/PARK
Murines <i>Ataxin-3</i> Gen	exprimiert	exprimiert	exprimiert	exprimiert
Murines <i>PARK2</i> Gen	exprimiert	homozygot ausgeschaltet	exprimiert	homozygot ausgeschaltet
Humaner Lokus mit humanem Promoter 3' und 5' regulatorische Elemente humanes <i>ATXN3</i> mit 84 Glutaminen	nicht vorhanden	nicht vorhanden	hemizygot exprimiert	hemizygot exprimiert



**Abbildung 7: Übersicht der anhand des Mausmodells durchgeführten Analysen**

Die Analysen des Mausmodell unterteilt sich zum einen in eine Metabolomanalyse bei der sowohl Plasma- als auch Cerebellum-Proben analysiert wurden und zum anderen in die Verhaltensanalyse bestehend aus den Teilbereichen Gewicht, RotaRod, CatWalk und LabMaster



**Abbildung 8: Zeitstrahl der am Mausmodell durchgeführten Methoden**

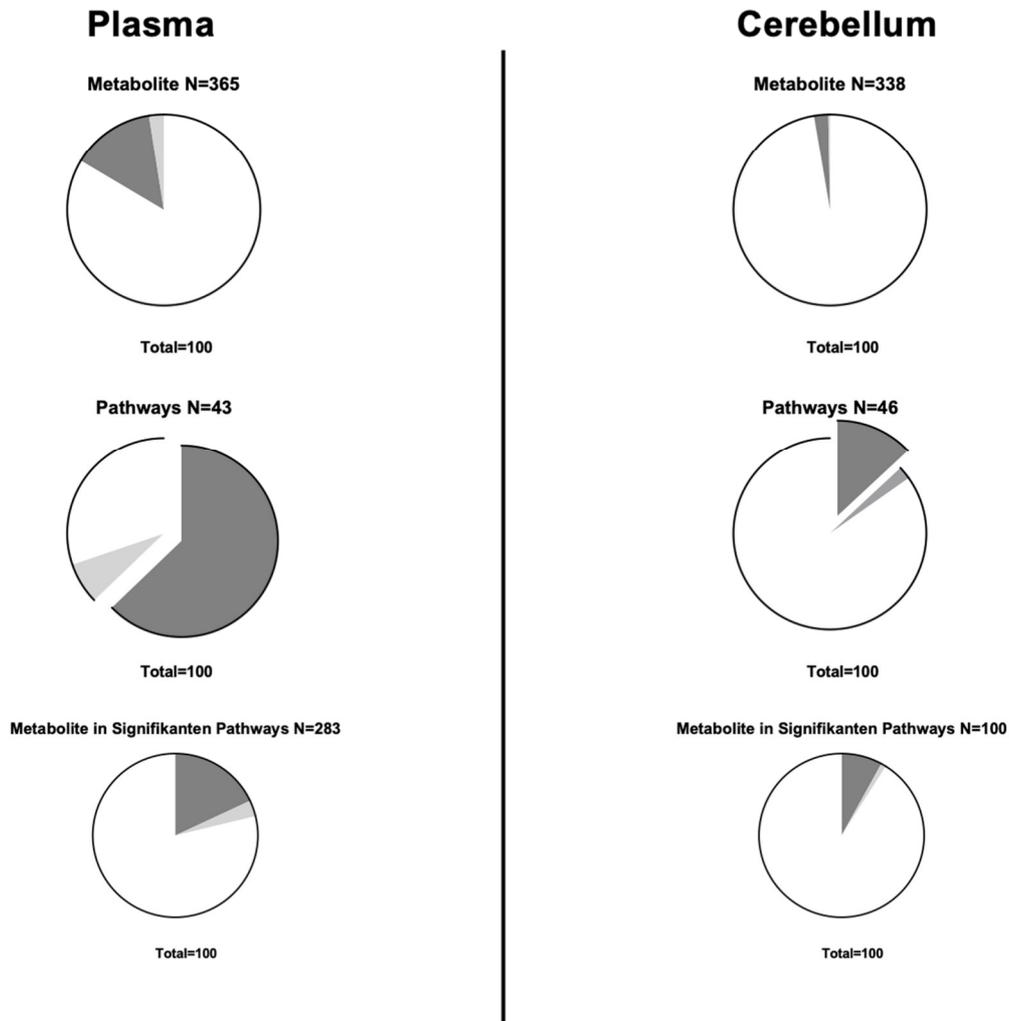
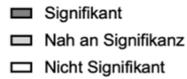
Die Untersuchungen fanden in einem Zeitraum von 2 Wochen bis 15 Monaten statt. Die Körpergewichtsmessungen wurden zweiwöchentlich für einen Zeitraum von 80 Wochen durchgeführt. Der RotaRod Test wurde alle 3 Monate mit 3, 6, 9, 12 und 15 Monaten angewendet, um Balance- und Koordinationsdefizite zu bewerten. Der Catwalk Test zur Untersuchung des Laufverhaltens wurde mit 12 und 15 Monaten durchgeführt. Der LabMaster Test wurde mit 3, 9 und teilweise mit 15 Monaten jeweils über einen Zeitraum von 70 Stunden durchgeführt. Hierbei wurden die Aktivität und das Angstverhalten bewertet. Die Cerebellum- und Plasmaproben zur Metabolomanalyse wurden von 2 und 12 Monate alten Tieren präpariert.

### 3.1 Auswertung der Metabolomdaten des Mausmodells

Um den Einfluss von Parkin auf die Pathogenese der SCA3 zu untersuchen, sollten die Mäuse nun anhand der Ausprägung der verschiedenen Metabolite verglichen werden. Die statistische Analyse der Metabolomdaten erfolgte durch die Firma *MedDay Pharmaceuticals*, die Auswertung erfolgte selbstständig durch mich. Zugrunde lagen jeweils Proben der verschiedenen Mausmodelle (WT, SCA3 YAC, PARK2 ko, dm-YAC/PARK), die untereinander verglichen wurden. Die Vergleiche erfolgten jeweils zwischen den *single mutant* Genotypen (PARK2 ko oder SCA3 YAC) und dem WT oder den *single mutant* Genotypen mit den dm-YAC/PARK-Mäusen. Von allen Genotypen wurden jeweils 5 männliche und 5 weibliche Mäuse zu jedem Entnahmezeitpunkt für die Analyse herangezogen. Diese Proben wurden aus dem Plasma und dem Cerebellum, dem Hauptpathogeneseort der SCA3, bei 2 und 12 Monate alten Tieren entnommen. Bei der Analyse des Metaboloms konnten, wie in Abbildung 9 dargestellt, insgesamt 365 verschiedene Metabolite im Plasma und 338 Metabolite im Cerebellum identifiziert werden.

Die im Plasma vorhandenen Metabolite konnten auf 43 zugehörige *Pathways* aufgeteilt werden. Somit wurden übergeordnete Gruppen erstellt, in die diese Metabolite eingeteilt werden konnten. Exemplarisch in Tabelle 28 sind die 7 häufigsten *Pathways* im Plasma aufgeführt. Hierbei handelte es sich um den *Aspartat Metabolismus*, *Beta-Alanin Metabolismus*, *Lysin Metabolismus*, *Pyrimidin Metabolismus*, *Purin Metabolismus* und *Histidin Metabolismus*. 77 der Metabolismen konnten keiner übergeordneten Gruppe zugeteilt werden und wurden daher mit nicht analysiert (NA) beschrieben. Das bedeutet, dass beispielsweise 23 verschiedene Metabolite zum Aspartat Metabolismus zugehörig waren. Von den identifizierten 43 *Pathways* konnten in 27 *Pathways* signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen festgestellt werden. In einigen *Pathways* waren häufiger signifikante Metabolite vorzufinden als in anderen *Pathways*. Zudem waren auch unterschiedlich viele Metabolite den jeweiligen *Pathways* zugeteilt worden. Daher bietet Tabelle 29 einen Überblick über die 7 *Pathways*, die die meisten signifikanten Unterschiede

aufwiesen. 16 *Pathways* dieser insgesamt 43 *Pathways* zeigten keine signifikanten Abweichungen, bei 3 dieser 16 *Pathways* lag jedoch mit  $p \leq 0,08$  beinahe eine signifikante Abweichung vor. In Abbildung 9 sind diese 27 signifikanten *Pathways* nochmal genauer aufgeschlüsselt worden. Diese 27 *Pathways* setzen sich zusammen aus 283 Metaboliten, von denen insgesamt 51 signifikant ( $p \leq 0,05$ ) waren, 9 beinahe signifikant ( $p \leq 0,08$ ) und 223 nicht signifikant verändert, obwohl sie den signifikanten *Pathways* zugehörig waren. Diese Aufschlüsselung erfolgte ebenfalls für die im Cerebellum gewonnenen Metabolite (338, Abbildung 9). Hier konnten die 338 Metabolite sogar in 45 verschiedene *Pathways* eingeteilt werden, jedoch zeigten nur 6 *Pathways*, einschließlich *NA*, *Purin Metabolismus*, *Amino Sugar Metabolismus*, *Valin*, *Leucin and Isoleucin Metabolismus*, *Glycerol Phosphat Shuttle* und *Methionin Metabolismus*, signifikante Abweichungen, 39 hingegen zeigten keine signifikante Veränderung. Auch hier wurden die 6 signifikanten *Pathways* noch genauer beleuchtet. Sie bestanden aus 100 inkludierten Metaboliten, von denen lediglich 8 signifikante Abweichungen zeigten, einer nahe der Signifikanz lag und 91 zeigten keine signifikanten Abweichungen.



**Abbildung 9: Zusammenfassung signifikanter Metabolite**

Dargestellt sind die gefundenen Metabolite, einmal im Plasma und einmal im Cerebellum. Hierbei wurde jeweils die Gesamtzahl aller Metabolite unabhängig vom Genotyp der Tiere gezeigt. Links oben für das Plasma ( $n=356$ ) mit den gefärbten Anteilen in dunkelgrau für signifikante Veränderungen (14%), in hellgrau nah an einer Signifikanz (2 %) und nicht signifikante Anteile in weiß (84 %). Links in der Mitte für das Plasma alle Pathways ( $n=43$ ), in die die darüber dargestellten Metabolite aufgeteilt werden können. Die dunkelgraue Färbung zeigt Pathways die signifikante Metabolite enthielten (63 %), hellgrau die nah an einer Signifikanz lagen mit  $p \leq 0,08$  (7 %) und weiß die nicht signifikanten Pathways (30 %). Links unten ( $n=283$ ) sind die einzelnen Metabolite die in den signifikanten Pathways aus der Mitte eingeteilt wurden gezeigt. Dabei waren 18 % der Metabolite signifikant, 3 % beinahe signifikant und 79 % der Metabolite wiesen keine Signifikanzen auf. Rechts oben ist die Gesamtzahl aller Metabolite für das Cerebellum ( $n=365$ ) gezeigt. In dunkelgrau die signifikanten Metabolite 2,4 %, in hellgrau 0,3 % nah an einer Signifikanz, in weiß die nicht signifikanten Metabolite mit 97,3 %. Rechts in der Mitte zeigt die Pathways ( $n=45$ ) in die diese Metabolite eingeteilt werden konnten für das Cerebellum mit 13 % signifikanten, 2 % nah der Signifikanz und 85 % nicht Signifikanten Metaboliten dar. Und rechts unten stellt die einzelnen Metabolite ( $n=100$ ), die in den signifikanten Pathways aus der Mitte dargestellt wurden dar. Dabei waren 8 % signifikant, 1 % beinahe Signifikant und 91 % nicht signifikant.

In Tabelle 28 findet sich eine Zusammenfassung der Metabolite, die im Plasma am häufigsten vorkamen, mit der jeweiligen Anzahl und dem zugehörigen prozentualen Anteil. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist die Tabelle nur auf die am häufigsten vorkommenden Metabolite beschränkt und eine ausführliche Tabelle mit den gesamten Metaboliten ist im Anhang zu finden (Anhang 3). Wenn man die nicht zugeteilten (nicht analysiert, NA) Metabolite (n=77) im Plasma unberücksichtigt lässt, waren bei den signifikanten Veränderungen am häufigsten Aspartat Metabolismus (n=23) und Purin Metabolismus (n=17) zu finden. Gefolgt von den Pyrimidin (n=14) und Histidin Metabolismus mit 14-mal und dem Beta-Alanin- und Lysin Metabolismus mit jeweils 13-mal.

*Tabelle 28: Zusammenfassung der am häufigsten vorgekommenen Metabolite im Plasma mit Anzahl und zugehörigem Prozentanteil, (NA=nicht analysiert)*

Plasma: Metabolite	Anzahl	Anteil von allen Metaboliten in %
NA	77	21,62
Aspartat Metabolismus   Dipeptide	23	6,46
Purin Metabolismus	17	4,77
Pyrimidin Metabolismus	14	3,93
Histidin Metabolismus	14	3,93
Beta-Alanin Metabolismus	13	3,65
Lysin Metabolismus	13	3,65

Nachdem in Tabelle 28 aufgelistet wurde welche Metabolite in allen vier Genotypen und unabhängig vom Genotyp zu finden waren und wie häufig diese detektiert werden konnten, sollten anschließend die *Pathways*, die am häufigsten im Plasma vorkamen und die meisten signifikanten Unterschiede beim Gruppenvergleich der WT-Mäuse mit den Mutanten aufwiesen, aufgelistet werden. Da dies als generelle Übersicht dienen sollte, erfolgte noch keine Unterscheidung in welchem Vergleich und zwischen welchen der drei Mutanten diese signifikanten Unterschiede festgestellt werden konnten. Die Unterschiede wurden bemessen aufgrund der *Foldchanges* (FC), die im Vergleich zwischen zwei Genotypen, also jeweils den WT-Mäusen im Vergleich mit einem Mutanten,

gemessen wurden. Dabei ist die Menge 1 der FC die Menge der WT-Mäuse und ein vergrößerter FC > 1 zeigt somit mehr Expression in den Mutanten im Vergleich zu den WT-Mäusen an, ein verringerter FC < 1 zeigt weniger Expression in den Mutanten gegenüber den WT-Mäusen an. Diese sollen hier noch nicht weiter spezifiziert werden, werden aber im Folgenden näher beschrieben. Berücksichtigt wurden alle *Pathways*, welche sich signifikant mit  $p \leq 0,05$  unterschieden, nah an einer Signifikanz mit  $p \leq 0,08$  waren. Als nicht signifikant wurden alle *Pathways* eingeteilt, die bei  $p \geq 0,08$  lagen.

Diese Auflistung ist in Tabelle 29 dargestellt. Sie beschränkt sich auf die 7 *Pathways*, die am häufigsten vorkamen und viele Signifikanzen aufwiesen. Auch hier ist die ausführliche Tabelle im Anhang zu finden (Anhang 3). Neben den nicht zugeteilten (NA, 77-mal), die aus diesem Grund nicht näher betrachtet wurden, war der Aspartat Metabolismus mit 23 Metaboliten sehr häufig vertreten. Von den enthaltenen 23 einzelnen Metaboliten waren 8 signifikant im Vergleich der *Foldchanges* von jeweils zwei Genotypen. Außerdem zeigten der Phenylalanin und Tyrosin Metabolismus, zu dem 13 Metabolite zugeordnet werden konnten, 4 Signifikanzen und der Alanin Metabolismus (10-mal) ebenfalls 4 Signifikanzen im Vergleich der WT mit den Mutanten (SCA3 YAC, PARK2 ko, dm-YAC/PARK). Beta-Alanin (13-mal), Lysin (13-mal) und Pyrimidin (14-mal) zeigten jeweils 3 signifikante Abweichungen.

Tabelle 29: Zusammenfassung der Pathways mit den häufigsten Signifikanzen für das Plasma mit einer Aufzählung der Anzahl, Signifikanz, nah an Signifikanz und nicht signifikant, (NA=nicht analysiert)

Plasma: Pathways	Anzahl insgesamt	davon signifikant (p≤0,05)	Nah an Signifikanz (p≤0,08)	nicht signifikant (p>0,08)
NA	77	5	3	69
Aspartat Metabolismus   Dipeptide	23	8	0	15
Phenylalanin und Tyrosin Metabolismus	13	4	0	9
Alanin Metabolismus   Bile Acid Biosynthesis	10	4	0	6
Beta-Alanin Metabolismus	13	3	0	10
Lysin Metabolismus	13	3	0	10
Pyrimidin Metabolismus	14	3	2	9

Interessant war im Anschluss der Vergleich mit den Proben des Cerebellums. Hier sollte untersucht werden, ob dieselben signifikanten Metabolite und Pathways wie im Plasma im Vergleich der WT-Mäuse in Bezug auf die Mutanten gefunden werden konnten und welche Tendenzen sich in Bezug auf die FC auch im Cerebellum zeigten, um das Plasma als Entnahmestelle zu verifizieren. Hier kamen die nicht-zuordenbaren Metabolite (NA) 39-mal vor. Wie im Plasma kamen sowohl der Purin Metabolismus (n=29), als auch der Aspartat Metabolismus (n= 22) mehrfach vor. Anders als im Plasma häuften sich im Cerebellum noch der Alanin (n=17) und Glutamat Metabolismus (n=16).

Tabelle 30 zeigt dementsprechend eine Zusammenfassung der am häufigsten vorkommenden Metabolite im Cerebellum mit zugehöriger ausführlicher Tabelle im Anhang (Anhang 9) Betrachtet man nun ebenfalls die Pathways und die herausgearbeiteten signifikanten Veränderungen, stellt man fest, dass sich keinerlei Ähnlichkeiten mit den Signifikanzen der häufigsten Pathways im Plasma zeigten. Tabelle 31 zeigt eine Zusammenfassung der gesamten vorkommenden Pathways im Cerebellum. Auch hier konnten viele Metabolite nicht zugeordnet werden und waren daher mit NA bezeichnet worden, jedoch gab es lediglich eine

Signifikanz im Vergleich der FC der WT-Mäuse mit den Mutanten. Sowohl im Purin Metabolismus (29-mal), als auch im Amino-Zucker Metabolismus (15-mal) gab es 2 signifikante Abweichungen. Im Valin, Leucin und Isoleucin Metabolismus (10-mal), dem Glycerol Phosphat Shuttle (4-mal) und dem Methionin Metabolismus (3-mal) war nur ein signifikanter *Pathway* erkennbar.

*Tabelle 30: Zusammenfassung der am häufigsten vorgekommenen Metabolite im Cerebellum mit Anzahl und zugehörigem Prozentanteil, (NA=nicht analysiert)*

Cerebellum: Metabolite	Anzahl	Anteil von allen Metaboliten (in %)
NA	39	11,54
Purin Metabolismus	29	8,58
Aspartat Metabolismus	22	6,51
Alanin Metabolismus	17	5,03
Glutamat Metabolismus	16	4,73

*Tabelle 31: Zusammenfassung aller signifikanten Pathways im Cerebellum mit einer Aufzählung der Anzahl, Signifikanz, nah an Signifikanz und nicht signifikant, (NA=nicht analysiert)*

Cerebellum: Pathways	Anzahl insgesamt	davon signifikant ( $p \leq 0,05$ )	Nah an Signifikanz ( $p \leq 0,08$ )	nicht signifikant ( $p > 0,08$ )
NA	39	1	0	38
Purin Metabolismus	29	2	1	26
Amino Sugar Metabolismus	15	2	0	13
Valin, Leucin and Isoleucin Metabolismus	10	1	0	9
Glycerol Phosphat Shuttle	4	1	0	3
Methionin Metabolismus	3	1	0	2
Total	100	8	1	91

### 3.1.1 Vergleich Metabolomdaten der Mutanten mit den WT-Mäusen

Nachdem allgemein herausgearbeitet wurde, welche Metabolite zu finden waren und welche *Pathways* signifikante Unterschiede aufwiesen, war es für den Vergleich der Mutanten mit dem WT interessant herauszufinden, bei welchen Gruppen und in welchem Vergleich der Gruppen signifikante Unterschiede festgestellt werden können.

Zur besseren Übersichtlichkeit sind die Daten in Tabelle 32 nochmal zusammengefasst worden. Hier sind die Häufigkeiten je Gruppe im Vergleich mit Entnahmestelle und Entnahmezeitpunkt der signifikanten Abweichungen zueinander aufgetragen.

Tabelle 32: Häufigkeit der Signifikanzen ( $p \leq 0,05$ ) und nah an Signifikanz ( $p \leq 0,08$ ), pro verglichenen Genotyp, mit Entnahmestelle und Zeitpunkt der Entnahme

Vergleich zwischen	Entnahmestelle	Zeitpunkt	Signifikanzhäufigkeit ( $p \leq 0,05$ )	Nah an Signifikanz ( $p \leq 0,08$ )
SCA3 YAC vs. WT	Plasma	2 Monate	2	0
		12 Monate	1	1
	Cerebellum	2 Monate	0	0
		12 Monate	0	0
PARK ko vs. WT	Plasma	2 Monate	2	5
		12 Monate	0	0
	Cerebellum	2 Monate	0	0
		12 Monate	0	0

dm-YAC/PARK vs. WT	Plasma	2 Monate	39	3
		12 Monate	4	0
	Cerebellum	2 Monate	0	0
		12 Monate	0	0
dm-YAC/PARK vs. SCA3 YAC	Plasma	2 Monate	9	2
		12 Monate	4	0
	Cerebellum	2 Monate	0	0
		12 Monate	0	0
dm-YAC/PARK vs. PARK ko	Plasma	2 Monate	1	0
		12 Monate	1	0
	Cerebellum	2 Monate	0	0
		12 Monate	0	0

Zu der Darstellung der einzelnen Metabolite und der zugehörigen *Pathways* sollte ebenfalls eine Aufschlüsselung dieser Ergebnisse auf die verschiedenen Entnahmezeitpunkte erfolgen. Denn hier war es wichtig zu erschließen, ob bereits Veränderungen im Plasma mit 2 Monaten zu erkennen waren, die sich mit 12 Monaten weiter ausprägten und auch mit 2 oder 12 Monaten im Cerebellum zu finden waren, oder ob signifikante Unterschiede im Krankheitsverlauf (10 Monate später) nicht mehr nachweisbar waren. Zudem

sollte untersucht werden, ob das Plasma als möglicher Entnahmeort zur Feststellung von signifikanten pathologischen Veränderungen dem Pathogeneseort Cerebellum gegenüber ebenfalls geeignet war. Hierzu sind alle signifikanten Veränderungen der Metabolite mit signifikanten *Foldchanges* und  $p \leq 0,05$  aus Gründen der Übersicht für das Plasma in Anhang 3 und Anhang 4 und für das Cerebellum in Anhang 5 und Anhang 6 aufgelistet.

Beginnend mit dem Plasma zeigten sich 3 signifikante Unterschiede im Vergleich der WT-Mäuse mit den SCA3 YAC-Mäusen. Erkennbar war ein signifikant geringer *Foldchange* ( $p=0,0203$ ) der *3-Hydroxypicolinic-acid* im Alter von 2 Monaten. Im Verlauf zum zweiten Messzeitpunkt mit 12 Monaten zeigte sich zwar eine Zunahme der *Foldchanges* (FC) aber diese war nicht mehr signifikant bei 12 Monaten ( $p=0,5515$ ). Mit signifikant erhöhtem FC (2,03) und  $p=0,0325$  zeigte sich *3-Hydroxybutyric-acid* mit 2 Monaten. Hier waren die FC jedoch mit 12 Monaten wieder geringer (0,73) und zeigten keine signifikanten Unterschiede mehr zwischen den SCA3 YAC-Mäusen und den WT-Mäusen ( $p=0,6511$ ). Weiterhin zeigte sich Kreatinin mit signifikant ( $p=0,0362$ ) geringeren FC (0,68) zum Messzeitpunkt von 12 Monaten, mit 2 Monaten waren bei ähnlich hohen Expressionen noch keine signifikanten Unterschiede erkennbar ( $p=0,9821$ ).

Im Vergleich der WT-Mäuse mit den PARK2 ko-Mäusen wurden 2 signifikante Unterschiede festgestellt. Es zeigte sich ein erhöhter FC (2,38) mit einer Signifikanz von  $p=0,0378$  im Alter von 2 Monaten für Thymidin. Mit 12 Monaten war eher ein verringerter FC (0,68) erkennbar, der jedoch nicht signifikant war. Eine weitere Signifikanz ( $p=0,0203$ ) zeigte sich mit 2 Monaten im 5-AMP, dGMP-Metabolismus mit einem stark erhöhten FC (2,84), der wiederum mit 12 Monaten eher verringert war und auch keine Signifikanz im Vergleich zwischen den WT-Mäusen mit den PARK2 ko-Mäusen mehr zeigte.

Die meisten Signifikanzen zeigten sich im Vergleich zwischen den *double mutant*, also den dm-YAC/PARK-Mäusen, und den WT-Mäusen. *L-Citrulline* hatte signifikant erhöhte FC (1,8) mit 12 Monaten von 0,0234, aber noch nicht mit 2 Monaten. Allerdings war mit 2 Monaten bereits eine Erhöhung der FC (1,5) erkennbar. Dieser Sachverhalt zeigte sich ebenfalls für *L-Aspartic-acid*. Sowohl mit 2 und 12 Monaten zeigten sich signifikant erhöhte FC mit einer Signifikanz

von  $p=0,0279$  und  $p=0,0209$  bei bei *D-Glucuronic-acid* | *D-Galacturonic-acid* | *Galacturonic-acid*. Auch *Malonic-acid* hatte massiv erhöhte FC im Vergleich zu den WT-Mäusen mit 11,2 mit 2 Monaten ( $p=0,0203$ ) und nur geringfügig verminderten FC (7,16) mit 12 Monaten ( $p=0,0497$ ). Signifikant erhöhte FC waren ebenfalls im Alter von 2 Monaten, aber nicht mehr mit 12 Monaten für *5AMP*, *dGMP*, *UMP*, *Argininosuccinic-acid*, 3 mal bei *Lysine*, *L-Cysteine-S-Sulfate*, *Cinnamic acid*, *Nicotinamide*, *Dihydrouracil* | *1-Methylhydantoin*, *2-Oxobutyric-acid*, *3-Methylcrotonyl-glycine* | *N-Tiglylglycine*, *Biotin*, *3-Hydroxybutyric-acid*, *N-Acetyl-L-alanine*, *Isoleucine* | *Leucine* | *L-Norleucine*, *N-N-Dimethylglycine*, *3-Amino-3-4-hydroxyphenyl-propanoic-acid* | *Tyrosine*, *2-Aminoisobutyric-acid* | *Aminobutyric-acid*, 2 mal bei *Histidine*, *UMP*, *Arginine*, *Panthenol*, *5-Deoxy-5-methylthioadenosine*, *Triethanolamine*, *Cytidine*, *Phenylalanine*, *Leucine* | *L-Norleucine*, *Tyrosine*, *3-Ureidopropionic-acid*, *Histidine*, *L-Glutamine* | *D-Glutamine*, 2 mal bei *L-Citrulline*, *O-Phosphorylethanolamine* vorhanden. Aus Gründen der Übersicht ist eine ausführliche Tabelle dazu im Anhang zu finden (Anhang 8).

Auffällig im Plasma war, dass bei allen Mutanten eine Erhöhung bei *L-Citrulline* festgestellt werden konnte, die mehrfach signifikant im Vergleich zwischen den WT-Mäusen und dm-YAC/PARK-Mäusen auffiel. Dennoch konnten im Vergleich mit den anderen Mutanten auch Abweichungen in Form von Tendenzen ( $p=0,08$ ) erkannt werden. Sowohl die FC als auch die Signifikanzen sind im Vergleich in Anhang 8 nochmal gegenübergestellt.

Wie bereits herausgearbeitet zeigten sich in diesen Daten wenige Signifikanzen beim Vergleich der Metabolite zwischen den WT-Mäusen und den Mutanten im Cerebellum. Im Vergleich der WT-Mäuse und der SCA3 YAC-Mäuse waren keinerlei signifikante Unterschiede festzustellen. Im Vergleich der WT-Mäuse mit den PARK2 ko-Mäuse hingegen konnten mit 2 Monaten ähnlich hohe FC (1,08) zwischen den beiden Genotypen im Valin, Leucin und Isoleucin Metabolismus mit einer Signifikanz von  $p=0,0325$  festgestellt werden, die jedoch mit 12 Monaten zwar weiterhin bei einem FC von 1,01 lagen, aber mit  $p=0,6666$  nicht mehr signifikant waren. Weitere 3 signifikante Unterschiede waren im Vergleich zwischen den WT-Mäusen und den dm-YAC/PARK-Mäusen zu finden. Es

zeigten sich vergleichbar hohe FC im Alter von 2 Monaten bei Glycerol-3-Phosphat mit einer Signifikanz von  $p=0,0258$  und leicht verringerten FC der dm-YAC/PARK-Mäuse gegenüber den WT-Mäusen mit 12 Monaten, welche keine Signifikanz mehr aufwiesen. Signifikant verringerte FC (0,66) der dm-YAC/PARK-Mäuse waren auch bei N-Acetyl-D-Glucosamin mit 12 Monaten festzustellen ( $p=0,0441$ ), die im Alter von 2 Monaten zwar schon verringerte FC (0,85) aufwiesen, aber noch nicht signifikant verringert waren. Signifikant erhöhte FC (1,29) zeigten sich hingegen für Aspartylglycosamin mit 2 Monaten, die mit 12 Monaten keine Signifikanz mehr zeigten.

Die restlichen beschriebenen signifikanten Unterschiede zeigten sich im Vergleich zwischen den dm-YAC/PARK-Mäusen und den anderen mutierten Genotypen (SCA3 YAC und PARK2 ko) und sollen in dieser Arbeit nicht weiter beschrieben werden.

Dazu finden sich im Anhang Übersichten in Form von Tabellen mit Aufzählungen der signifikanten Metabolite im Plasma im Vergleich zwischen den dm-YAC/PARK- und SCA3 YAC-Mäusen unter Anhang 10 und den dm-YAC/PARK- im Vergleich mit den PARK2 ko-Mäusen unter Anhang 11. Eine Aufzählung der signifikanten Metabolite des Cerebellums ist im Vergleich zwischen den dm-YAC/PARK- und SCA3 YAC-Mäusen unter Anhang 12 zu finden. Zwischen den dm-YAC/PARK und PARK2 ko-Mäusen gab es keine signifikanten Metabolite.

Erkennbar war, dass sich die signifikanten Unterschiede im Cerebellum darauf bezogen, dass es sich um annähernd gleiche FC zwischen den zwei verglichenen Gruppen handelte.

Gemeinsamkeiten zeigten sich insofern, dass auch beim Glycerol-3-Phosphat alle ähnliche FC hatten, aber nur im Vergleich zwischen den WT-Mäusen und den dm-YAC/PARK-Mäusen signifikant waren. Dieses Phänomen zeigte sich auch für N-Acetyl-D-Glucosamin. Hier konnten ebenfalls in allen Vergleichen niedrige FC festgestellt werden, jedoch keine Signifikanzen, außer im Vergleich der WT-Mäuse mit den dm-YAC/PARK-Mäusen im Alter von 12 Monaten. Dieser Sachverhalt zeigte sich auch für Aspartylglycosamin mit einer Signifikanz im Vergleich mit dem dm-YAC/PARK Mäusen im Alter von 2 Monaten. *3-Hydroxy-3-methylglutartic-acid* hatte ähnliche FC im Vergleich der WT-Mäuse mit den

Mutanten, aber nur im Vergleich der WT-Mäuse mit den PARK2 ko-Mäusen waren diese im Alter von 2 Monaten signifikant ( $p=0,0325$ ).

In der Analyse des Metaboloms des Cerebellums zeigte sich hingegen, dass die Tendenzen im Vergleich mit allen Mutanten, ob signifikant oder nicht, häufig vergleichbar waren. Eine detaillierte Darstellung dazu findet sich im Anhang (Anhang 9).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich im Vergleich der FC zwischen den WT-Mäusen und den Mutanten hauptsächlich signifikante Unterschiede im Plasma zeigen und nur wenige im Cerebellum. Zusätzlich sind die häufigsten signifikanten Auffälligkeiten zwischen den WT-Mäusen und den dm-YAC/PARK-Mäusen festzustellen gewesen.

### *3.1.2 Vergleich der Daten mit den Ergebnissen von Toonen et al.*

Des Weiteren sollten unsere Ergebnisse noch mit Daten vorheriger Analysen verglichen werden, um herauszuarbeiten, wie sich unsere Ergebnisse im Vergleich mit anderen Studien unterscheiden.

Hier bot sich der Vergleich mit Toonen et al. an (Toonen et al., 2018), der in vorherigen Analysen bereits SCA3 YAC-Mäuse mit WT-Mäusen verglichen hatte und somit eine der hier untersuchten Gruppen mit dem gleichen Genotyp untersucht hatte. In dessen Metabolom-Analysen sollten potenzielle Biomarker im Blut identifiziert werden, die in der Lage sind den Krankheitsverlauf der SCA3 zu verfolgen.

Um Gemeinsamkeiten und Unterschiede festzustellen, sollten im Folgenden die Ergebnisse von Toonen et al. mit unseren Daten verglichen werden. Bevor ein Vergleich der Daten erfolgen kann, sollten Unterschiede der statistischen Analyse herausgestellt werden. In den hier untersuchten Daten erfolgte die Untersuchung von Plasma- und Cerebellum-Proben mit 2 und 12 Monaten bei jeweils 10 Mäusen pro Gruppe (5 männliche, 5 weibliche). Bei Toonen et al. hingegen erfolgten Untersuchungen des Hirnstamms, Cerebellums, Striatums und des Cortexes. Zudem erfolgten die Untersuchungen mit 4, 12 und 16 Monaten bei 4 Mutanten und 4 WT-Mäusen. Die Detektion der Metabolite erfolgte

durch *Profilomics*, (*Gif-sur-Yvette, France*), welche im Jahr 2017 durch *MedDay* aufgekauft und somit heute ebenfalls zu *MedDay* gehört, welche unsere Analysen ebenfalls durchgeführt haben. Somit sollte zumindest eine einheitliche Messung der Metabolite gewährleistet sein. Eine Übersicht zur Datenerhebung zwischen unseren Daten und Toonen et al. veranschaulicht Tabelle 33.

*Tabelle 33: Vergleich Datenerhebung mit Toonen et al. (Anzahl Tiere, Entnahmezeitpunkt, Entnahmeort, Datenerhebung, Anzahl Metabolite, Anzahl der Signifikanzen)*

	Tübingen	Toonen et al
Anzahl Mäuse	10 WT, 10 SCA3 YAC	4 WT, 4 SCA3 YAC
Entnahmezeitpunkt	2 Monate 12 Monate	4 Monate 12 Monate 16 Monate
Entnahmeort	Plasma Cerebellum	Hirnstamm Cerebellum Striatum, Cortex
Datenerhebung	<i>MedDay</i> <i>Pharmaceuticals, SA,</i> Paris, Frankreich,	<i>Profilomics,</i> Gif-sur-Yvette, France
Anzahl Metabolite WT vs. SCA3 YAC	362 Plasma 305 Cerebellum	keine Plasmaproben 148 Cerebellum
Signifikanz ( $p < 0,05$ ) WT vs. SCA3 YAC	3 Plasma 0 Cerebellum	keine Plasmaproben 32 Cerebellum

Toonen et al. konnten die meisten metabolomischen Veränderungen im Hirnstamm und Striatum finden, welche in unseren Analysen nicht untersucht wurden. Das Cerebellum und der Cortex waren laut Toonen et al. wenig betroffen, wie auch in unseren Ergebnissen des Cerebellums zu erkennen war. Denn auch bei uns waren keine signifikanten Veränderungen zwischen den Metaboliten der SCA3 YAC- mit den WT-Mäusen zu erkennen.

Die einzigen erhöhten Signifikanzen, die bei Toonen et al., und auch in den in dieser Arbeit ausgewerteten Daten zu finden waren, waren bei den Metaboliten L-Citrullin und Tyrosin. Hier waren signifikante Veränderungen bei Toonen et al.

im Cerebellum zu erkennen, in unseren Daten befanden sich diese signifikanten Unterschiede jedoch im Plasma und auch nicht für den Vergleich SCA3 YAC mit den WT-Mäusen, sondern ausschließlich für die Gruppe der dm-YAC/PARK Mäuse im Vergleich mit den WT-Mäusen.

### 3.1.3 Zusammenfassung der Ergebnisse aus 3.1.

Zur Übersicht der Ergebnisse aus 3.1. stellt Tabelle 34 diese in einer kurzen Zusammenfassung der Metabolomdaten, dem Vergleich der WT-Mäuse mit den Mutanten und dem Vergleich unserer Ergebnisse mit denen von Toonen et al. dar.

Tabelle 34: Zusammenfassung der Ergebnisse aus 3.1.

3.1.1	Metabolomdaten	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Analyse von Metabolomdaten im Plasma und Cerebellum mit 2 und 12 Monaten</li> <li>- die häufigsten signifikanten Unterschiede waren im Plasma, nur wenige Signifikanzen im Cerebellum erkennbar</li> </ul>
3.1.2	Vergleich der WT-Mäuse mit den Mutanten	<ul style="list-style-type: none"> <li>- die häufigsten Signifikanzen im Vergleich zwischen WT-Mäusen und dm-YAC/PARK-Mäusen</li> <li>- die meisten Signifikanzen zeigten sich mit 2 Monaten und regulierten sich wieder angepasst an den WT mit 12 Monaten</li> <li>- <i>Malonic-acid</i>, <i>D-Glucuronicacid</i> zeigten als einzige Signifikanzen sowohl mit 2 als auch mit 12 Monaten</li> </ul>
3.1.4	Vergleich der Daten mit den Metabolom-Ergebnissen von Toonen et al.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Analyse der Metabolomdaten wurde durch die gleiche Firma durchgeführt</li> <li>- Unterschiede in den Entnahmezeitpunkten und Entnahmeorten</li> <li>- Bei Toonen et al. wurden nur die WT-Mäuse mit den SCA3-Mäusen verglichen</li> <li>- Keine vergleichbaren Ergebnisse in unseren Ergebnissen mit den Ergebnissen von Toonen et al.</li> </ul>

## **3.2 Auswertung der Verhaltensanalyse des Mausmodells**

Nachdem die Untersuchung der Metabolomdaten des Mausmodells in 3.1. durchgeführt wurden und sich keine klaren Unterschiede der WT-Mäuse gegenüber der Mutanten in ihren Metabolomen zeigten, sollte im Anschluss ein Bezug zu phänotypischen Unterschieden zwischen den vier Genotypen hergestellt werden. Dafür wurden verschiedene Verhaltensanalysen durchgeführt. Diese sollten Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen den Genotypen darstellen. Die Verhaltensanalyse wurde zu mehreren Zeitpunkten durchgeführt, um zusätzlich Veränderungen der Genotypen über diesen Zeitraum zu untersuchen.

Für alle Verhaltensanalysen wurde die Anzahl der Individuen in den Abbildungsunterschriften angegeben. Abweichende Anzahl je Gruppe sind auf fehlende Messergebnisse beispielsweise nach Abtötung einzelner Individuen aus gesundheitlichen Gründen zurückzuführen.

### *3.2.1 Körpergewichtsmessung*

Teil der Verhaltensanalysen war die regelmäßige Messung des Körpergewichts im Untersuchungszeitraum der Mäuse von 2 Wochen bis 80 Wochen und ist ein wichtiger Bestandteil der Untersuchungen, um die Entwicklung und Gesundheit der Mäuse einzuordnen und zu beurteilen.

Die Messungen des Körpergewichts wurden in einem zweiwöchentlichen Abstand über einen Zeitraum von 80 Wochen ab der zweiten Lebenswoche aufgezeichnet.

In Abbildung 10 wurde das Körpergewicht der unterschiedlichen Genotypen jeweils für die Weibchen und die Männchen getrennt dargestellt, um ebenfalls Unterschiede zwischen den Geschlechtern zu analysieren und herauszustellen. Darüber hinaus wurde ein Vergleich zwischen den in 2.1.1 bereits vorgestellten unterschiedlichen Genotypen WT, PARK2 ko, SCA3 YAC und dm-YAC/PARK geschlechtergetrennt untersucht.

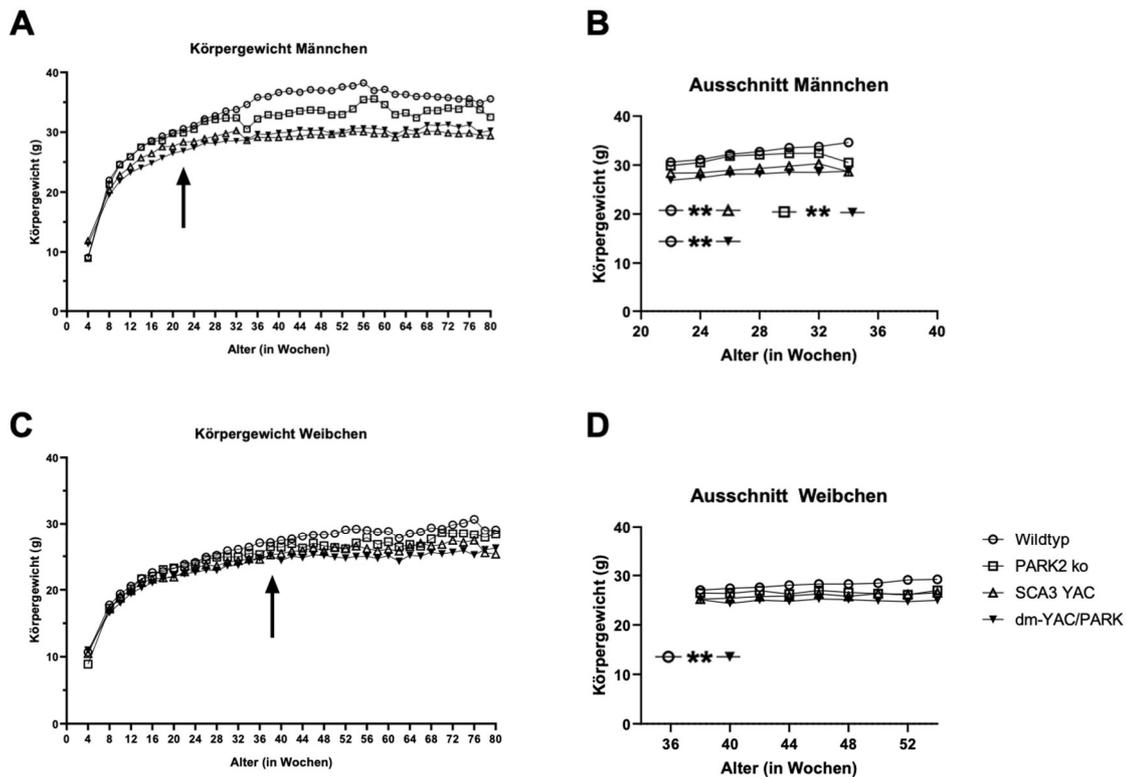
Erkennbar war, dass sowohl für die Männchen als auch die Weibchen die WT-Mäuse das höchste, die SCA3 YAC- und dm-YAC/PARK-Mäuse das geringste Körpergewicht aufwiesen. Betrachtet man vorerst die Weibchen, ist folgendes zu erkennen:

Zu Beginn der Aufzeichnung (0-8,8 Monate), lagen bei den Weibchen (Abb. 10A) alle vier Genotypen nah beieinander und es war kaum ein Unterschied im Körpergewicht feststellbar. Bei allen Gruppen war anfänglich eine stetige Gewichtszunahme erkennbar. Ab der 20. Woche konnte man erkennen, dass das Gewicht bei den WT-Mäusen auch weiterhin anstieg. Zwar geringer als in den ersten Wochen, jedoch war eine weitere Zunahme erkennbar. Ab der 40. Woche war kaum noch eine Gewichtszunahme bei den WT-Mäusen erkennbar und das Gewicht wurde mit leichten Schwankungen gehalten. Zusätzlich war ersichtlich, dass die WT-Gruppe ab der 32. Woche das höchste Gewicht innerhalb der Gruppen aufwies. Das Gewicht der PARK2 ko-Mäuse steigerte sich im Vergleich zu den WT-Mäusen in kleineren Schritten und hielt sich ab der 56. Woche ungefähr auf demselben Level. Im Gegensatz dazu hielt sich das Gewicht der SCA3 YAC- und dm-YAC/PARK-Gruppe bereits ab der 40. Woche auf dem gleichen Level und zeigte kaum eine Zunahme. Hier ließ die Zunahme des Körpergewichts bereits nach der 36. Woche nach. Dabei war das Körpergewicht der SCA3 YAC- und dm-YAC/PARK-Mäuse auf einem ähnlichen Level, leicht unterhalb des Gewichts der PARK2 ko-Mäuse. Signifikante Unterschiede zeigten sich zwischen dem Gewicht der WT- und der dm-YAC/PARK-Mäuse ab der 38. Woche mit  $p \leq 0,01$ .

Betrachtet man anschließend die Männchen, zeigte sich diese Entwicklung gleichermaßen für das Körpergewicht der Männchen (Abb. 10B). Auch hier war eine stetige Steigerung des Körpergewichts innerhalb der ersten 32 Wochen erkennbar. Jedoch waren bei den männlichen Gruppen deutlichere Gewichtsunterschiede im Vergleich der vier Genotypen erkennbar. Bereits nach der 12. Woche lagen das Körpergewicht der WT und PARK2 ko-Mäuse oberhalb derer der SCA3 YAC- und dm-YAC/PARK-Mäuse. Hierbei war die Gewichtszunahme von WT und PARK2 ko vergleichbar, sowie von SCA3 YAC zu dm-YAC/PARK. Ab der 32. Woche war kaum noch eine Gewichtszunahme

der PARK2 ko, SCA3 YAC und dm-YAC/PARK feststellbar. Hier wurde das Gewicht über den restlichen Messzeitraum gehalten. Dabei war das Gewicht der SCA3 YAC-Mäuse am geringsten, das Gewicht der dm-YAC/PARK-Mäuse lag leicht über diesem und das Gewicht der PARK2 ko-Mäuse lag ebenfalls darüber. Bei den WT-Mäusen zeigte sich eine weitere Gewichtszunahme bis zur 40. Woche und erst danach war keine deutliche Gewichtszunahme mehr erkennbar. Gegenüber der SCA3 YAC- und der dm-YAC/PARK-Gruppe war das Körpergewicht der WT-Gruppe mit  $p \leq 0,01$  ab der 22. Woche signifikant höher. Auch das Gewicht der PARK2 ko-Mäuse war ab der 22. Woche signifikant höher als das der dm-YAC/PARK-Mäuse ( $p \leq 0,01$ ).

Der Zeitpunkt der signifikanten Unterschiede wurde anhand der Ausschnitte in Abb. 10C bei den Männchen und D bei den Weibchen graphisch nochmal detaillierter dargestellt.



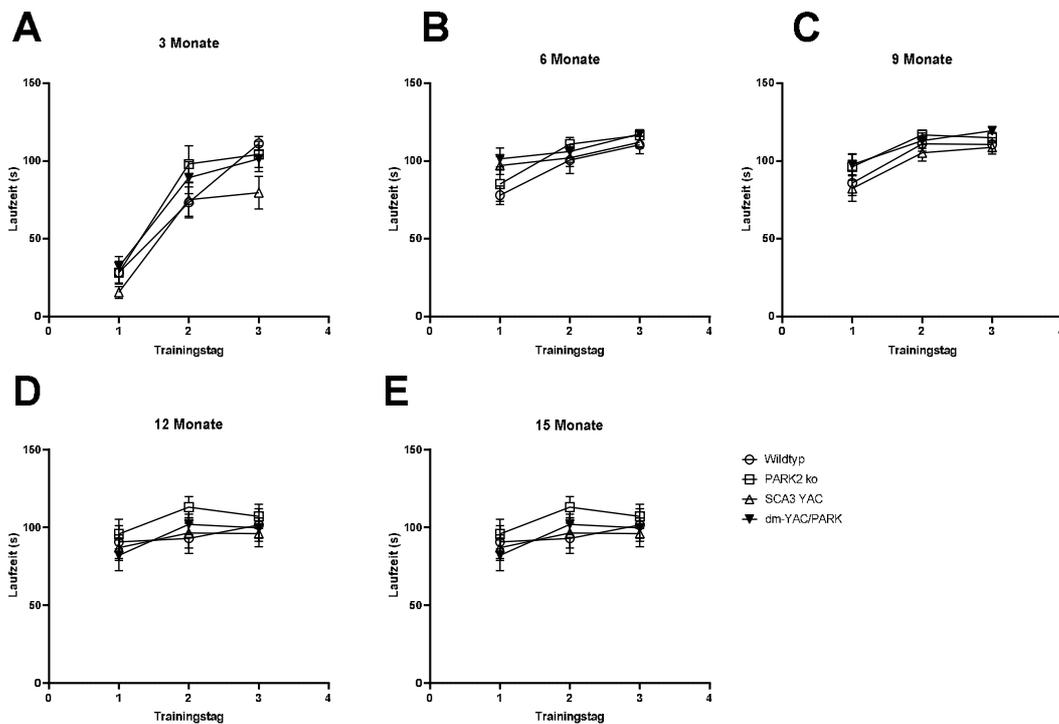
**Abbildung 10: Körpergewichtsmessung im zweiwöchentlichen Rhythmus**

Erkennbar sind jeweils die Körpergewichtsmessungen der vier Genotypen (WT, PARK2 ko, SCA3 YAC, dm-YAC/PARK) für die Männchen (A und B) (WT n=14, PARK2 ko n=10, SCA3 YAC n=24, dm-YAC/PARK n=14) und für die Weibchen (C und D) (WT n=23, PARK2 ko n=14, SCA3 YAC n=19, dm-YAC/PARK n=18) über einen Zeitraum von 2 bis 80 Wochen. Das höchste Körpergewicht (in g) wiesen sowohl bei den Weibchen als auch den Männchen die WT-Mäuse auf. Bei den Weibchen hatten beinahe über den gesamten Messzeitraum die dm-YAC/PARK Mäuse das geringste Gewicht. Wohingegen bei den Männchen ab der 36. Woche nicht mehr die dm-YAC/PARK-Mäuse, sondern die SCA3 YAC-Mäuse das geringste Gewicht aufwiesen. Der Gewichtsunterschied bei den Weibchen ist zwischen der WT und der dm-YAC/PARK-Gruppe signifikant reduziert ( $p \leq 0,01$ ). Bei den Männchen ist sowohl der Gewichtsunterschied zwischen WT und SCA3 YAC, WT und dm-YAC/PARK, als auch zwischen PARK2 ko und dm-YAC/PARK mit  $p \leq 0,01$  signifikant. Dieser Zeitpunkt ist jeweils mit einem Pfeil in der jeweiligen Abb. markiert und in (B) als vergrößerter Ausschnitt für die Männchen und in (D) als vergrößerter Ausschnitt für die Weibchen zur besseren Veranschaulichung dargestellt.

### 3.2.2 RotaRod Test zur Analyse der Balance und Koordination

Im RotaRod Test (TSE Systems, Bad Homburg, Germany) sollten die Balance und die Koordination der Tiere geprüft werden. Dadurch sollten Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den Mutanten und dem WT analysiert werden. Dieser Test erfolgte jeweils in einem Alter von 3, 6, 9, 12 und 15 Monaten. Zu jedem dieser Zeitpunkte fand vor Durchführung der Tests eine dreitägige Trainingsinstanz statt, bei der die Mäuse an die sich drehende Stange

bei einer Geschwindigkeit von 4 auf 16 rpm gewöhnt wurden. Zur Gewöhnung wurden sie dabei jeweils 2 Minuten zur Fortbewegung auf die Stange gesetzt. Am Testtag wurde dann die Laufzeit innerhalb eines Intervalls von 4 auf 40 rpm in 5 Minuten pro Individuum in Sekunden festgehalten.



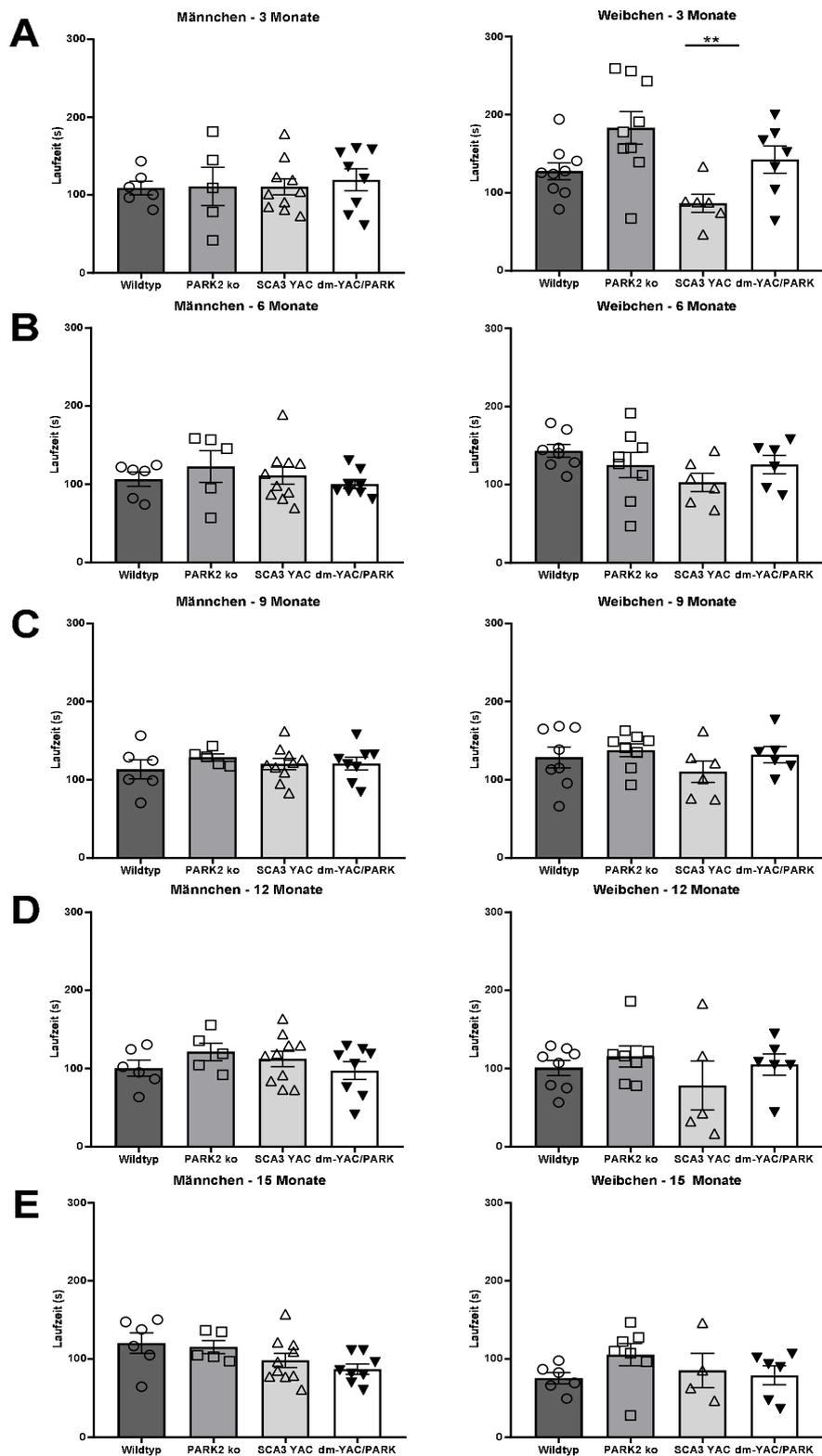
**Abbildung 11: Trainingsverlauf RotaRod an den einzelnen Trainingstagen**

Erkennbar ist der Trainingsverlauf für die jeweiligen Monate: 3, 6, 9, 12, 15, bezogen auf die Laufzeit (in s) an den einzelnen Trainingstagen für WT ( $n=15$ ), PARK2 ko ( $n=14$ ), SCA3 YAC ( $n=16$ ) und dm-YAC/PARK2 ( $n=15$ ). Durch das Training konnte man bei jedem Genotyp jeden Monat eine Verbesserung der Laufzeit vom 1. auf den 2. Tag beobachten. Vom 2. auf den 3. Trainingstag flachte die Steigung und damit der Trainingserfolg wieder ab. Beim ersten Training im Alter von 3 Monaten lag die Laufzeit (s) an Trainingstag 1 noch unter 50 s, in allen anderen Monaten startete sie an Tag 1 jedoch bei über 50s, wodurch von einem Erinnerungseffekt ausgegangen werden kann. Zwischen den Monaten 6, 9, 12 und 15 lagen keine großen Unterschiede oder Verbesserungen zwischen den einzelnen Trainingstagen mehr vor.

Zuerst wurde die Entwicklung der Laufzeit (in s) der 4 Genotypen während des Trainings an 3 aufeinanderfolgenden Trainingstagen untersucht. Abbildung 11 zeigt den Verlauf der Entwicklung zu den bereits genannten Testzeitpunkten (3, 6, 9, 12, 15 Monate). Somit konnte der Lernerfolg der Genotypen von Tag 1 zu Tag 3 dargestellt und analysiert werden.

Abb. 11A zeigt diese zum ersten Trainingszeitpunkt mit einem Alter von 3 Monaten. Zu sehen ist, dass die Laufzeit aller Gruppen am ersten Trainingstag

sehr gering ausfiel und bei einer Laufzeit von ca. 50 s lag. Zum zweiten Trainingstag war bereits eine deutliche Verbesserung aller Gruppen auf Laufzeiten zwischen 50 s und 100 s feststellbar. Eine weitere Verbesserung der Laufzeit von Trainingstag 2 auf Trainingstag 3 war nur bei den WT-Mäusen von ca. 60 s auf ca. 100 s erkennbar. Alle anderen Genotypen zeigten keine deutlichen Verbesserungen der Laufzeit. Stattdessen zeigte sich am 3. Trainingstag eine gleichbleibende Laufzeit. Abbildung 11B zeigt die Entwicklung der Laufzeit im Alter von 6 Monaten. Alle Gruppen zeigten bereits eine bessere Balance und Koordination im Vergleich zum vorherigen Testzeitpunkt von 3 Monaten und erzielten somit bereits an Trainingstag 1 deutlich längere Laufzeiten. Die längste Laufzeit zeigte hier die Gruppe der dm-YAC/PARK-Mäuse, gefolgt von den SCA3 YAC-Mäusen. Anschließend kamen die PARK2 ko-Mäuse mit einer geringfügig kürzeren Laufzeit und die kürzeste Laufzeit hatte die Gruppe der WT-Mäuse. Eine geringe Verbesserung am zweiten Tag, sowie am dritten Tag war bei allen Gruppen zu erkennen. Die größte Verbesserung hatte allerdings die PARK2 ko-Mäuse, welche auch am dritten Trainingstag die längsten Laufzeiten aufwiesen. Mit einem Alter von 9 Monaten, dargestellt in Abb. 11C, zeichnete sich ein ähnliches Bild wie zum Zeitpunkt von 6 Monaten ab. Hier hatte jedoch am dritten Trainingstag die dm-YAC/PARK-Gruppe die längste Laufzeit, gefolgt von den PARK2 ko-, WT- und SCA3 YAC-Mäusen. Auch mit 12 (Abb. 11D) und 15 Monaten (Abb. 11E) war die geringste Laufzeit am dritten Trainingstag bei der SCA3 YAC-Gruppe festzustellen. Zu beiden Zeitpunkten zeigte sich eine Verbesserung aller Gruppen ausgenommen der WT-Gruppe, welche sich vom ersten auf den zweiten Tag leicht verschlechterte. In allen Gruppen zeigte sich eine geringe Verschlechterung vom zweiten auf den dritten Tag, wohingegen die WT-Gruppe vom zweiten auf den dritten Tag eine verlängerte Laufzeit hatte und sich somit eine Verbesserung abzeichnete. Ebenfalls waren für beide Zeitpunkte die insgesamt schlechtesten Ergebnisse am ersten Trainingstag zu verzeichnen, wie auch am dritten Tag für die SCA3 YAC-Gruppe.



**Abbildung 12: RotaRod Männchen und Weibchen im Vergleich**

Darstellung der RotaRod Ergebnisse von WT ( $n=15$ ), PARK2 ko ( $n=14$ ), SCA3 YAC ( $n=16$ ), dm YAC/PARK ( $n=15$ ) für 3, 6, 9, 12 und 15 Monate aufgeteilt in Männchen (links) und Weibchen (rechts). Im Vergleich

*zwischen Männchen und Weibchen sind höhere Schwankungen der einzelnen untersuchten Genotypen bei den Weibchen erkennbar. Signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,01$ ) zeigten nur die Weibchen bei 3 Monaten zwischen SCA3 YAC und dm-YAC/PARK. Die Laufzeiten von WT und SCA3 YAC waren in nahezu jedem Monat geringer als die Laufzeiten der PARK2 ko- und der dm YAC/PARK-Mäuse.*

Nach dem beschriebenen dreitägigen Training erfolgte ein Testtag mit 2 Läufen (4 rpm auf 40 rpm in 5 Minuten) pro Maus, mit jeweils mindestens 30 Minuten Pause zwischen den beiden Läufen. Zur Analyse und zum Vergleich wurden hier die Gruppen getrennt voneinander aufgetragen und für Männchen und Weibchen einzeln betrachtet dargestellt. Um die Varianz der Individuen pro Gruppe zu veranschaulichen wurde der Mittelwert, sowie jede Maus als Einzelpunkt, aufgetragen (Abbildung 12). Wie bereits beschrieben erfolgte die Testung mit 3, 6, 9, 12 und 15 Monaten, um mögliche Veränderungen über die Zeit zu erkennen. Die statistische Auswertung im Alter von 3 Monaten (Abb. 12A) zeigte für die Männchen keine erkennbaren Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Für die Weibchen hingegen war die Laufzeit der PARK2 ko-Gruppe mit ca. 180 s im Gegensatz zu den anderen Genotypen deutlich länger. Die Laufzeit der SCA3 YAC-Gruppe (ca. 70 s) lag signifikant ( $p \leq 0,01$ ) unterhalb der Laufzeit der dm-YAC/PARK-Gruppe (ca. 130 s). Zum nächsten Testzeitpunkt, mit 6 Monaten (Abb. 12B), hatten sich die Gruppen in Bezug auf die Laufzeit einander sowohl bei den Männchen als auch den Weibchen angenähert und wiesen keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Gruppen mehr auf. Mit 6 Monaten war die Laufzeit der dm-YAC/PARK-Gruppe bei den Männchen und die der SCA3 YAC-Gruppe bei den Weibchen am geringsten. Die Männchen zeigten die längste Laufzeit mit ca. 110 s bei den PARK2 ko-Mäusen und die Weibchen bei den WT-Mäusen mit ca. 150 s. Zusätzlich ist erkennbar, dass die Laufzeit bei fast allen Gruppen bei den Weibchen einige Sekunden länger war als bei den Männchen. Dieser Sachverhalt ließ sich auch zum Testzeitpunkt von 9 Monaten (Abb. 12C) erkennen. Mit zunehmendem Alter der Mäuse war erkennbar, dass zum Testzeitpunkt 12 und 15 Monate die Ergebnisse der Laufzeit insgesamt schlechter wurden. Dieser Aspekt war besonders bei den WT-Mäusen erkennbar, jedoch war die Anzahl der Mäuse auch im Verlauf geringer geworden. Zudem konnte man bei der Körpergewichtsmessung (Abb. 10) auch erkennen, dass das Gewicht der WT-Mäuse am größten war, dementsprechend waren die WT-Mäuse deutlich schwerer als die anderen Genotypen. Durch das höhere

Gewicht kann das Laufverhalten auf der Rolle zusätzlich beeinflusst werden. Die weiterhin schlechteste Laufzeit war bei den Weibchen in der Gruppe der SCA3 YAC-Mäuse erkennbar. Diese Tendenz zeigte sich bereits ab einem Alter von 9 Monaten, mit 12 und 15 Monaten war die Laufzeit der SCA3 YAC-Mäuse vermehrt verringert im Vergleich zu den PARK2 ko-Mäusen, welche die längsten Laufzeiten zu diesem Zeitpunkt bei den Weibchen hatten. Betrachtet man in Bezug auf das Laufverhalten der SCA3 YAC-Mäuse auch das bereits in Abb. 10 beschriebene Gewicht dieser, konnte man ein deutlich reduziertes Gewicht bei den SCA3 YAC-Mäusen besonders ab 9 Monaten (ca. ab der 36. Woche) erkennen. Daher ist ein Zusammenhang des reduzierten Gewichtes mit einer schlechteren Koordination aufgrund des ataktischen Phänotyps denkbar. Die Gruppen, die die längste Laufzeit bei den Weibchen sowohl mit 12 als auch mit 15 Monaten aufwiesen, waren die PARK2 ko-Mäuse. Auch bei den Männchen konnten lange Laufzeiten für die PARK2 ko-Mäuse bei 12 (Abb. 12D) und 15 Monaten (Abb. 12E) gemessen werden. Die WT-Mäuse zeigten bei den Männchen sogar im Gegensatz zu allen anderen Gruppen eine Verbesserung der Laufzeit von 12 auf 15 Monate. Betrachtet man zusätzlich das bereits analysierte Gewicht der Mäuse war auffällig, dass die WT-Mäuse das höchste Gewicht hatten, was wiederum einen Einfluss auf das Gangbild hatte, und das Laufverhalten verschlechterte. Die SCA3 YAC-Mäuse hingegen zeigten ein verringertes Gewicht, was eventuelle Gangbildverschlechterungen verdecken kann und somit eventuell diesen Effekt verschattet. Als Hypothese könnte man sagen, dass somit die WT-Mäuse trotz hohem Gewicht keine Gangverschlechterungen zeigten, die SCA3 YAC-Mäuse wiesen einen schlechten Gang, aber ein geringes Gewicht auf. Daher äußerten sich keine Unterschiede in der Analyse des Gangverhaltens zwischen WT, SCA3 YAC- und dm-YAC/PARK-Mäusen.

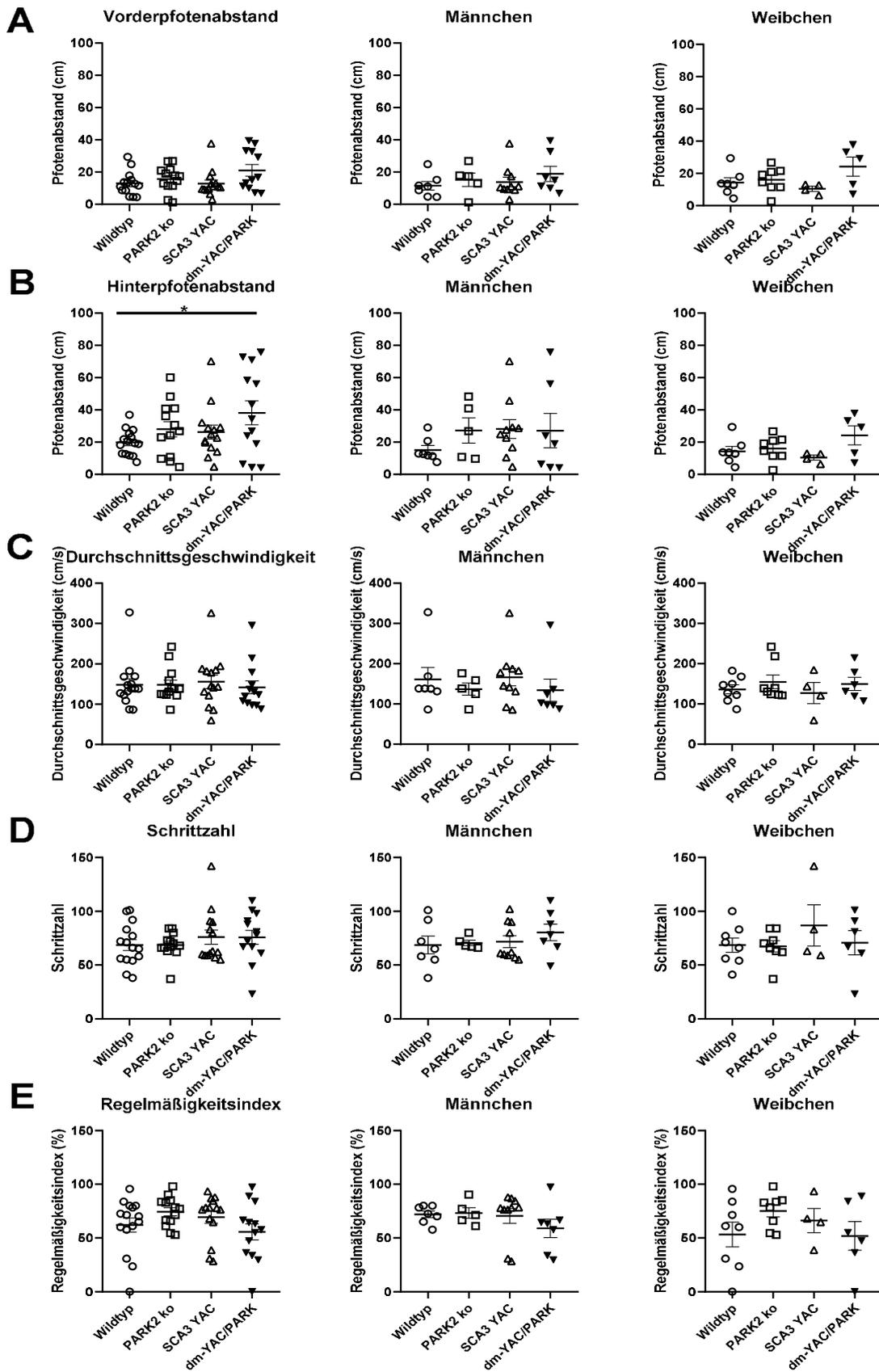
### 3.2.3 CatWalk Ganganalyse von Fußabdruck und Laufmuster

Die CatWalk Ganganalyse (Noldus, Wageningen, The Netherlands) wurde durchgeführt, um genotypisch beeinflusste Unterschiede von Fußabdruck und Gangmuster zu analysieren. Die vorliegenden Daten zeigen die Ergebnisse mit 12 und 15 Monaten. Zur Analyse wurden die Fußabdrücke der Mäuse aufgezeichnet, während sie einzeln und freiwillig durch einen Tunnel über eine Glasplatte gehen mussten. Für die Analyse wurde für diese Arbeit der Vorder- und Hinterpfotenabstand, der Schrittzklus und der Abdruckbereich der Pfoten sowie die Durchschnittsgeschwindigkeit, Schrittzahl und Regelmäßigkeitsindex des Gangbildes der Mäuse während des Tests genutzt und ausgewertet.

Auch für die Catwalk Analyse wurden die Gruppen WT, PARK2 ko, SCA3 YAC und dm-YAC/PARK erstellt und verglichen. Anschließend wurde für jede Kategorie noch eine Einteilung in Männchen und Weibchen durchgeführt, um zu untersuchen, ob sich Unterschiede zwischen den Geschlechtern darstellten.

Zur Ganganalyse sollten sowohl Vorderpfoten- (Abb. 13A) als auch Hinterpfotenabstand (Abb. 13B, in cm) der jeweiligen Gruppen vorerst im Alter von 12 Monaten gegeneinander aufgetragen werden. Hier sollten anschließend Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen herausgearbeitet werden. Der Vorderpfotenabstand aller Gruppen lag im Durchschnitt zwischen ca. 15 bis 30 cm. Erkennbar war, dass der Vorderpfotenabstand bei den dm-YAC/PARK-Mäusen größere Unterschiede unter den Individuen aufwies als bei den anderen Gruppen. Zusätzlich war der Abstand (in cm) der dm-YAC/PARK-Mäuse am größten, aber bei den SCA3 YAC-Mäusen am geringsten. Gefolgt vom Pfotenabstand der PARK ko-Mäuse. Der Vorderpfotenabstand im Vergleich zwischen Männchen und Weibchen zeigte geringe Unterschiede. Nur bei den dm-YAC/PARK-Mäusen war der Abstand bei den Weibchen sichtbar größer im Gegensatz zu den Männchen. Der Hinterpfotenabstand mit 12 Monaten zeigte eine deutlich größere Streuung der Werte im Vergleich zum Vorderpfotenabstand. Hier lagen die Werte im Bereich zwischen 5 bis 80 cm und durchschnittlich bei 20 bis 40 cm. Signifikante Unterschiede von  $p \leq 0,05$  waren

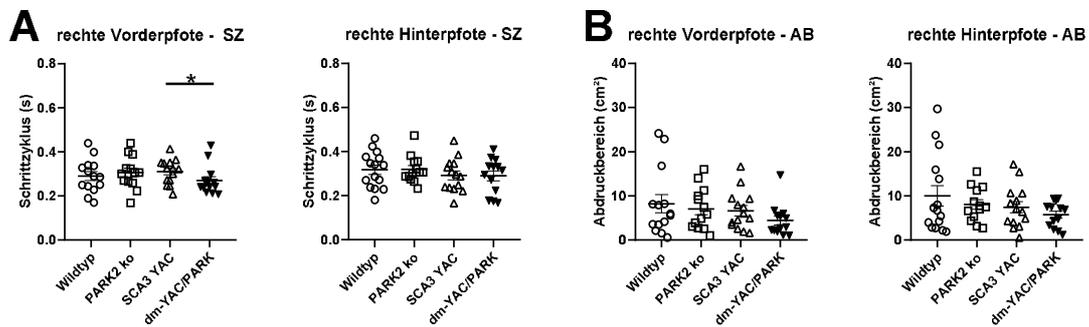
für den Hinterpfotenabstand zwischen WT und dm-YAC/PARK erkennbar, was für das Ausstellen der Hinterpfoten zur Stabilisierung des Gangbildes bei den dm-YAC/PARK-Mäusen spricht. Der Hinterpfotenabstand der WT-Mäuse lag für alle Individuen nah beieinander und war geringfügig größer (ca. 5 cm) als der Vorderpfotenabstand. Bei allen anderen Gruppen, und besonders für die dm-YAC/PARK-Mäuse, lag eine große Streuung des Pfotenabstands zwischen den Individuen vor. Bei den Männchen war der Pfotenabstand aller Gruppen im Durchschnitt 20 cm über dem Pfotenabstand der WT-Mäuse. Bei den Weibchen war erkennbar, dass der Pfotenabstand der WT-Mäuse im Vergleich zu den Männchen einen größeren Abstand aufwies. Der größte Pfotenabstand zeigte sich ebenfalls für die dm-YAC/PARK-Mäuse, dieser war signifikant größer im Vergleich der SCA3 YAC-Mäusen ( $p \leq 0,05$ ) zu den PARK ko-Mäusen ( $p \leq 0,05$ ) und zu den WT-Mäusen ( $p \leq 0,01$ ).



**Abbildung 13: CatWalk 12 Monate: Vorder- und Hinterpfotenabstand, Durchschnittsgeschwindigkeit, Schrittzahl, Regelmäßigkeitsindex**

Dargestellt sind der Vorder- und Hinterpfotenabstand (in cm), Durchschnittsgeschwindigkeit (cm/s), Schrittzahl und Regelmäßigkeitsindex (in %) jeweils im ersten Diagramm links für alle Mäuse (geschlechtsgemischt) der jeweiligen Gruppen: WT (n=15), PARK2 ko (n=13), SCA3 YAC (n=14), dm-YAC/PARK (n=13) und anschließend einmal für Männchen (mitte) (WT n=7, PARK2 ko n=5, SCA3 YAC n=10, dm-YAC/PARK n=7) und einmal für die Weibchen (rechts) (WT n=8, PARK2 ko n=8, SCA3 YAC n=4, dm-YAC/PARK n=6). Der Vorderpfotenabstand (Abb. 13A) war im Vergleich zum Hinterpfotenabstand (Abb. 13B) geringer und weniger gestreut zwischen den Individuen. Den größten Pfotenabstand hatten die dm-YAC/PARK-Mäuse. Signifikant ( $p \leq 0,05$ ) größere Abstände zeigen die dm-YAC/PARK-Mäuse beim Hinterpfotenabstand im Vergleich zu den WT-Mäusen. Bei den weiblichen Mäusen war diese Signifikanz des vergrößerten Hinterpfotenabstands im Vergleich der SCA3 YAC-Mäusen ( $p \leq 0,05$ ), zu den PARK2 ko-Mäusen ( $p \leq 0,05$ ) und zu den WT-Mäusen ( $p \leq 0,01$ ). Die Durchschnittsgeschwindigkeit (Abb. 13C) zeigte eine durchschnittliche Geschwindigkeit von ca. 150 cm/s für alle Gruppen. Bei den Männchen zeigte die Gruppe der SCA3 YAC-Mäuse die höchste Geschwindigkeit, bei den Weibchen jedoch hatten sie die geringste. Die Schrittzahl (Abb. 13D) zeigte ebenfalls keine signifikanten Abweichungen der Gruppen voneinander und lag somit bei allen Tieren im Mittelwert bei 70 – 80 Schritten. Der Regelmäßigkeitsindex (Abb. 13E) lag, ebenfalls ohne Signifikanzen, zwischen 50 und 100 %. Hierbei war erkennbar, dass die dm-YAC/PARK-Mäuse das unregelmäßigste Gangmuster aufwiesen und die einzelnen Individuen pro Genotyp große Abweichungen zeigten, im Vergleich zu den anderen Genotypen. Die Weibchen zeigten die größten Unterschiede unter den Individuen im Vergleich aller Genotypen.

Weiterhin wurden Durchschnittsgeschwindigkeit (in cm/s), Schrittzahl und Regelmäßigkeitsindex der Schritte (in %) von WT, PARK2 ko, SCA3 YAC und dm-YAC/PARK verglichen. Die Durchschnittsgeschwindigkeit für den CatWalk Test zum Zeitpunkt 12 Monate lag bei allen Tieren um die 150 cm/s. Abweichungen einzelner Individuen bis zu 300 cm/s waren vorhanden, wurden jedoch ausschließlich für die Männchen aufgezeichnet. Dementsprechend waren für die Weibchen keine Abweichungen einzelner Individuen vorhanden. Diese Auffälligkeit zeigte jedoch keinerlei Signifikanz. Bei der Analyse der Schrittzahl hatten alle Genotypen eine durchschnittliche Anzahl von 70 bis 80 Schritten. Wobei hier die meisten Schritte durch die SCA3 YAC-Mäuse getätigt wurden. Der Ausschlag für die meisten Schritte bei den SCA3 YAC-Mäusen zeigte sich bei den Weibchen deutlicher als bei den Männchen. Jedoch sind auch hierfür keine signifikanten Unterschiede feststellbar ( $p=0,9$ ) gewesen. Die Beurteilung nach dem Regelmäßigkeitsindex (%) zeigte, dass zwar für alle Tiere eine Regelmäßigkeit zwischen 50 und 100 % vorlag, jedoch lag eine verminderte Regelmäßigkeit bei den dm-YAC/PARK-Mäusen vor, sowohl für die Weibchen als auch die Männchen. Dennoch waren auch diese Unterschiede ebenfalls nicht signifikant ( $p=0,5$ ). Als nächstes war erkennbar, dass die einzelnen Individuen pro Gruppe stärkere Unregelmäßigkeiten aufwiesen. Die Weibchen aller Gruppen zeigten größere Streuungen in der Gangunregelmäßigkeit in Bezug auf die Männchen aller Gruppen.



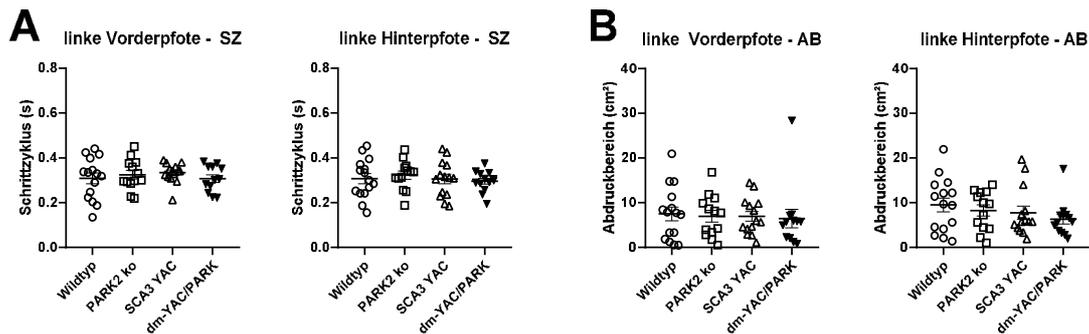
**Abbildung 14: CatWalk 12 Monate: Geschlechtsgemischte Betrachtung des Schrittzklus und des Abdruckbereiches der rechten Vorder- und Hinterpfote**

Abb. 14A zeigt den SZ (s) der rechten Vorder- und Hinterpfoten und B den AB (cm<sup>2</sup>) der rechten Vorder- und Hinterpfoten für die vier Genotypen: WT (n=15), PARK2 ko (n=13), SCA3 YAC (n=14), dm-YAC/PARK (n=13). Der Schrittzklus der rechten Vorderpfote der dm-YAC/PARK-Mäuse zeigte signifikant ( $p \leq 0,05$ ) geringere SZ als die SCA3 YAC-Mäuse. In der Analyse zeigten sich ansonsten keine größeren Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen.

Wichtig zur Ganganalyse war die Untersuchung von Schrittzklus (SZ, in s) (Abb. 14A), der Vorder- und Hinterpfotenabstand der rechten Pfoten und des Abdruckbereichs (AB) (Abb. 14B, in cm<sup>2</sup>) der rechten Pfoten. Hierbei sollte untersucht werden, ob die Mäuse bei der Fortbewegung ihre gesamte Pfote auf den Untergrund legen oder vielmehr nur die Zehenspitzen. Dies ist eher üblich bei SCA3 Mäusen, die eher eine tippelnde Fortbewegung zeigen. Auch der Schrittzklus gibt Aufschluss über bekannte SCA3 Anomalien.

Abbildung 14 zeigt den SZ (in s) (Abb. 14A) der Vorder- und Hinterpfotenabstand der rechten Pfoten und in Abb. 14B den AB (in cm<sup>2</sup>) im Alter von 12 Monaten. Der Schrittzklus für die dm-YAC/PARK-Mäuse dauerte deutlich kürzer als der der anderen Gruppen. Für die rechte Hinterpfote war zu erkennen, dass der Schrittzklus von den SCA3 YAC- zu PARK ko-, WT- und schlussendlich zu den dm-YAC/PARK-Mäusen abnahm. Dabei war ein signifikanter Unterschied mit  $p \leq 0,05$  in der Dauer des Schrittzklus zwischen den SCA3 YAC-Mäusen mit einem deutlich länger dauernden SZ und den dm-YAC/PARK-Mäusen zu erkennen. Der Abdruckbereich (Abb. 14B) zeigte, dass er für den WT sowohl für die rechte Vorder- als auch die Hinterpfote am größten war und von den WT- zu den PARK ko, SCA3 YAC und den dm-YAC/PARK-Mäusen abnahm. Somit war

der Abdruckbereich der dm-YAC/PARK-Mäuse am kleinsten. Innerhalb der WT-Mäuse gab es große Individuelle Unterschiede des Abdruckbereichs. Somit hatten die dm-YAC/PARK-Mäuse nicht nur den kürzesten Schrittzklus, sondern auch den geringsten Abdruckbereich der Pfoten, was einer eher tippelnden Fortbewegung entspricht.



**Abbildung 15: CatWalk 12 Monate: Geschlechtsgemischte Betrachtung des Schrittzklus und des Abdruckbereiches der linken Vorder- und Hinterpfoten**

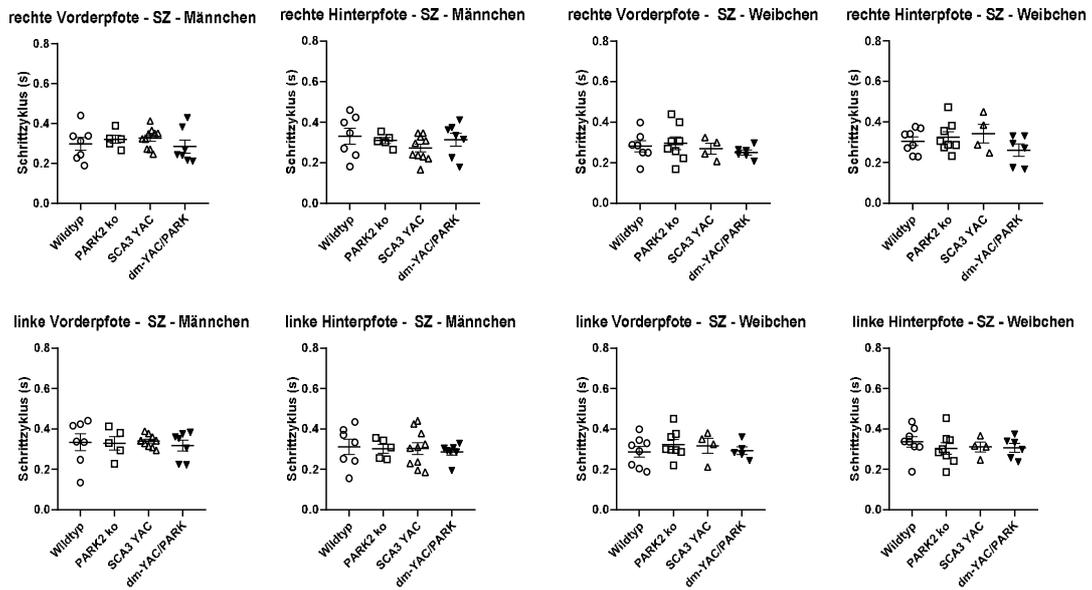
A zeigt den Schrittzklus (SZ) (s) der linken Vorder- und Hinterpfoten und B den Abdruckbereich (AB) (cm<sup>2</sup>) der linken Vorder- und Hinterpfoten für die Gruppen: WT (n=15), PARK2 ko (n=13), SCA3 YAC (n=14), dm-YAC/PARK (n=13) zum Testzeitpunkt 12 Monate. Es lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen vor.

Nachdem das Gangbild für die rechten Pfoten analysiert wurden, sollten dementsprechend die linken Pfoten ebenfalls analysiert werden. Zuerst wurde eine gemischtgeschlechtliche Untersuchung von SZ und AB mit 12 Monaten durchgeführt. Erkennbar war, dass sich der Schrittzklus zwischen den Genotypen (WT, PARK2 ko, SCA3 YAC, dm-YAC/PARK) wenig unterschied, sowohl für die Vorder-, als auch für die Hinterpfoten. Für die linke Vorderpfote war der Schrittzklus der SCA3 YAC-Mäuse am längsten, der der dm-YAC/PARK-Mäuse am geringsten. Bei den Hinterpfoten war der Schrittzklus der PARK2 ko-Mäuse am längsten, und ebenfalls der der dm-YAC/PARK-Mäuse am geringsten. Der Abdruckbereich (Abb. 15B) zeigte erneut größere Abweichungen zwischen den einzelnen Individuen. Die Unterschiede zwischen den Genotypen waren bei den linken Hinterpfoten deutlich größer als bei den linken Vorderpfoten, bei der dieser bei allen Genotypen im Mittel ähnlich war. Bei der linken Hinterpfote war der Abdruckbereich der WT-Mäuse am größten, gefolgt

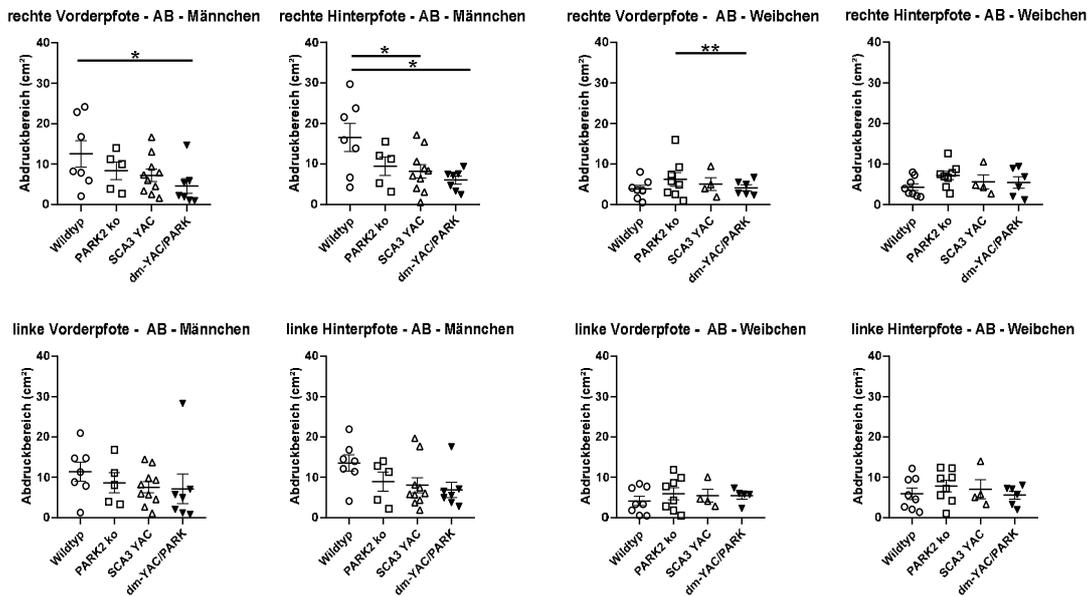
von dem der PARK2 ko-Mäuse, gefolgt von den SCA3 YAC-Mäusen und den dm-YAC/PARK-Mäusen, bei welchen er am geringsten war.

Anschließend sollten nun die Schrittzyklen (in s) und der Abdruckbereich (in cm<sup>2</sup>) für die Pfoten einzeln und nach Geschlechtern getrennt betrachtet und analysiert werden. Da sich bereits signifikante Unterschiede zwischen dem Vorder- und Hinterpfotenabstand zwischen Männchen und Weibchen abgezeichnet hatten, sollten auch für folgende Analysen des SZ und AB in die Geschlechter männlich und weiblich aufgeteilt werden.

**A**



**B**



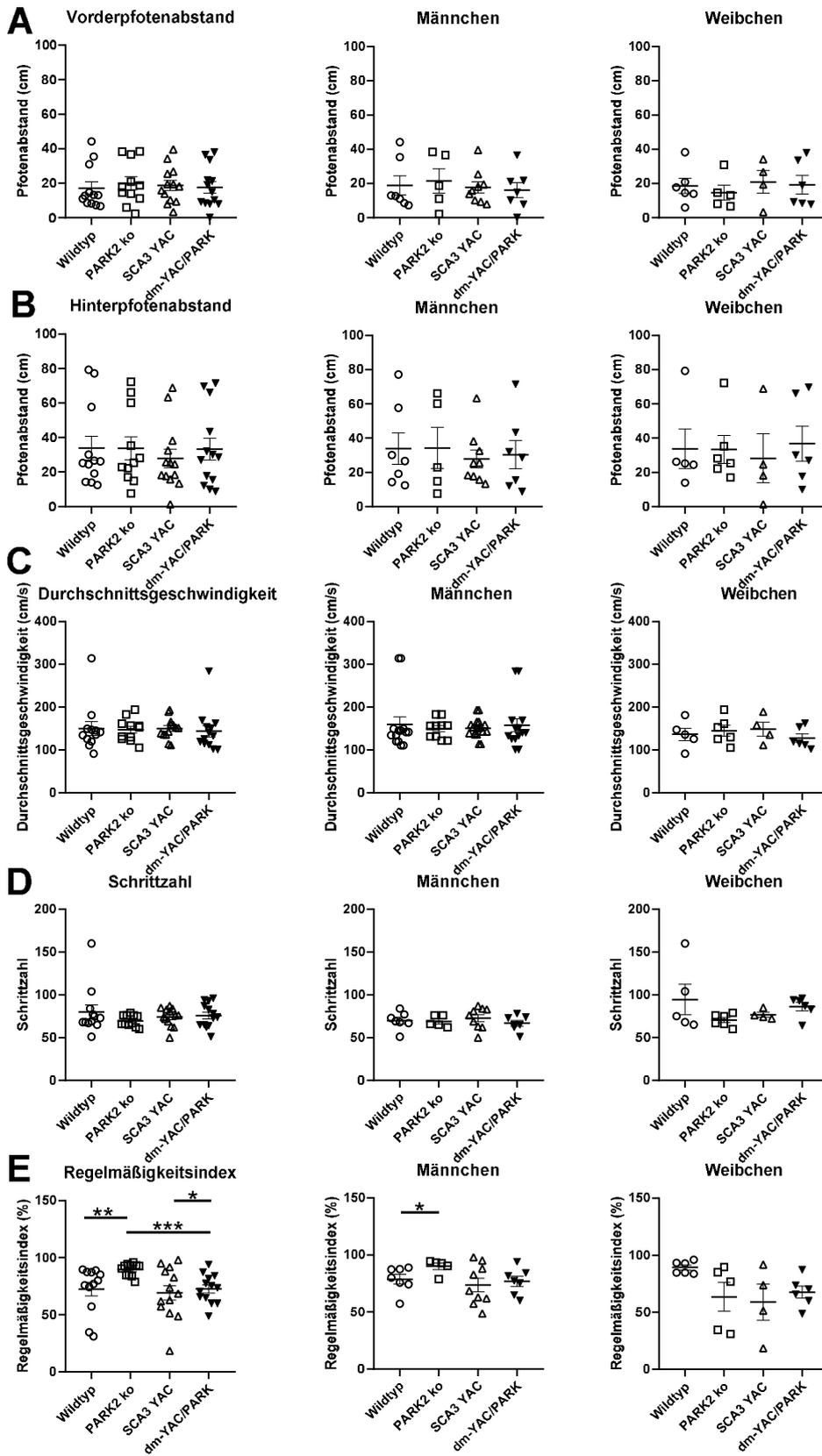
**Abbildung 16: Catwalk 12 Monate: Schrittzklus und Abdruckbereich rechte und linke Vorder- und Hinterpfote getrennt nach Männchen und Weibchen**

*Erkennbar ist der SZ (A) und der AB (B) der rechten und linken Vorder- und Hinterpfote für die Gruppen WT (n=15), PARK2 ko (n=13), SCA3 YAC (n=14), dm-YAC/PARK (n=13) aufgeteilt in Männchen (links) (WT n=7, PARK2 ko n=5, SCA3 YAC n=10, dm YAC/PARK n=7) und Weibchen (rechts) (WT n=8, PARK2 ko n=8, SCA3 YAC n=4, dm. YAC/PARK n=6) zum Testzeitpunkt 12 Monate. Beim SZ waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar, dafür zeigten sich im Abdruckbereich für die rechte Vorder- und Hinterpfote der Männchen sowie für die rechte Vorderpfote der Weibchen signifikante Unterschiede. Der AB der dm-YAC/PARK-Mäuse (rechte Vorderpfote und rechte Hinterpfote) war bei den Männchen signifikant geringer als bei den WT-Mäusen ( $p \leq 0,05$ ). Bei der rechten Hinterpfote war der AB der SCA3 YAC-Mäuse ebenfalls mit  $p \leq 0,05$  geringer als der der WT-Mäuse. Zwischen den dm-YAC/PARK-Mäusen und den PARK2 ko-Mäusen zeigte sich mit  $p \leq 0,01$  ein signifikant verringerter AB der rechten Vorderpfote der dm-YAC/PARK-Weibchen.*

Abbildung 16 zeigt den SZ (Abb. 16A) und den AB (Abb. 16B) sowohl der rechten als auch der linken Vorder- und Hinterpfote für alle vier Genotypen jeweils im Vergleich zwischen den Männchen und Weibchen zum Zeitpunkt 12 Monate. Bei dem Schrittzklus der rechten Vorderpfote (Abb. 16A) war erkennbar, dass die dm-YAC/PARK-Mäuse einen geringfügig kleineren Schrittzklus als die anderen Gruppen aufwiesen, den längsten Schrittzklus hatten bei den Weibchen die PARK2 ko-Mäuse und bei den Männchen die SCA3 YAC-Mäuse. Bei der rechten Hinterpfote war der Schrittzklus bei allen Genotypen in Relation zur rechten Vorderpfote vergleichbar lang. Der Abdruckbereich (Abb. 16B) zeigte hingegen große Unterschiede zwischen den Weibchen und den Männchen. Bei den Weibchen war der Abdruckbereich der Vorderpfote der PARK2 ko-Mäuse am größten im Vergleich zu den dm-YAC/PARK-Mäusen mit einer Signifikanz von  $p \leq 0,01$ . Die Werte der Individuen lagen mit einem Abstand von ca. 10 cm<sup>2</sup> auseinander. Bei den Männchen hingegen waren die Werte der Individuen über eine Spanne von bis zu 25 cm<sup>2</sup> weit gestreut. Die Gruppe der WT-Mäuse zeigte den größten Abdruckbereich mit ca. 12 cm<sup>2</sup>. Den kleinsten Abdruckbereich hatten die dm-YAC/PARK-Mäuse, der im Vergleich zu den WT-Mäusen sogar signifikant ( $p \leq 0,01$ ) geringer war. Das gleiche Bild zeichnete sich ebenfalls für die rechte Hinterpfote ab. Auch hier waren die Werte bei den Weibchen bei allen Genotypen nah beieinander. Die WT-Mäuse hatten den kleinsten Abdruckbereiche bei den Hinterpfoten. Die Männchen hingegen zeigten weit gestreute Werte der einzelnen Individuen mit signifikant hohen Werten der WT-Mäuse im Vergleich zu den SCA3 YAC-Mäusen und den dm-YAC/PARK-Mäusen (jeweils  $p \leq 0,01$ ).

Bei den linken Pfoten war festzustellen, dass es bzgl. des Geschlechts keine Unterschiede im Schrittzklus der linken Vorderpfote gab. Der Schrittzklus befand sich bei allen Genotypen zwischen 0,1 und 0,5 Sekunden. Die Streuung der einzelnen Werte für die Individuen bei der linken Hinterpfote sowohl bei den Männchen als auch den Weibchen war im Vergleich zur Vorderpfote größer. Beim Abdruckbereich (Abb. 16B) zeigte sich jedoch gegenüber den Weibchen und Männchen eine deutlichere Streuung sowohl der linken Vorder- als auch der Hinterpfote. Zusätzlich war bei den Männchen erkennbar, dass der Abdruckbereich der WT-Mäuse am größten war und der der dm-YAC/PARK-Mäuse am geringsten.

Nachdem das Gangbild der verschiedenen Genotypen im Alter von 12 Monaten untersucht wurde, sollte im nächsten Schritt ein eventuelles Voranschreiten der Symptomatik analysiert werden. Aus diesem Grund wurden die Analysen bei 15 Monate alten Tieren erneut durchgeführt. Hier sollte speziell darauf untersucht werden, ob sich eine Veränderung oder Entwicklung zeigte, die bereits bei 12 Monaten erkennbar war und sich 3 Monate später weiter ausgeprägt hatte, in welche Richtung die Entwicklung geführt hatte und welche Unterschiede und Gemeinsamkeiten es zwischen den beiden Messzeiträumen gab.



**Abbildung 17: CatWalk 15 Monate: Vorderpfoten-, Hinterpfotenabstand, Durchschnittsgeschwindigkeit, Schrittzahl, Regelmäßigkeitsindex**

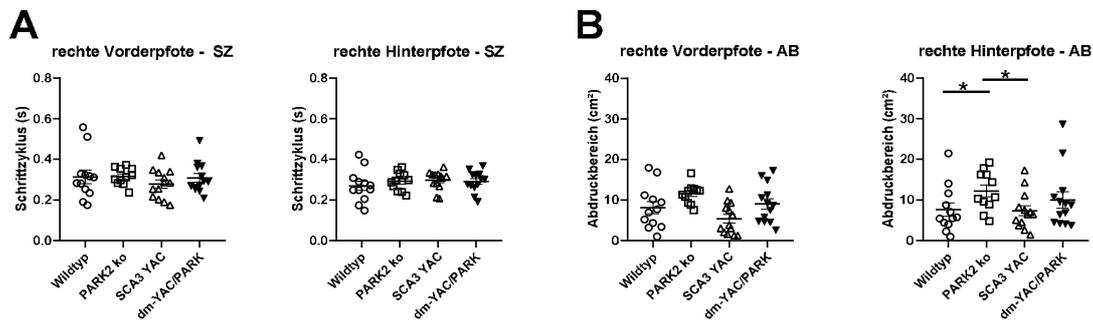
Dargestellt sind der Vorder- und Hinterpfotenabstand (in cm) jeweils im ersten Diagramm (links) für beide Geschlechter (Männchen und Weibchen) der jeweiligen Genotypen: WT (n=12), PARK2 ko (n=11), SCA3 YAC (n=13), dm-YAC/PARK (n=13) im Vergleich. Jeweils einmal für alle Tiere einer Gruppe und anschließend einmal für die Männchen (mitte) WT (n=7), PARK2 ko (n=5), SCA3 YAC (n=9), dm-YAC/PARK (n=7) und einmal für die Weibchen (rechts) WT (n=5), PARK2 ko (n=6), SCA3 YAC (n=4), dm-YAC/PARK (n=6) zum Zeitpunkt von 15 Monaten. Der Vorderpfotenabstand war im Vergleich zum Hinterpfotenabstand geringer und weniger gestreut zwischen den Individuen. Alle Gruppen zeigten einen ähnlichen Vorder- und Hinterpfotenabstand. Die einzelnen Individuen zeigten eine deutliche Streuung der Werte des Hinterpfotenabstands im Vergleich zum Vorderpfotenabstand. Dargestellt sind zudem Durchschnittsgeschwindigkeit (cm/s) in C, Schrittzahl in D und Regelmäßigkeitsindex (%) in E für die vier Genotypen. Signifikante Unterschiede zeigten sich nur beim Regelmäßigkeitsindex mit signifikant geringerer Regelmäßigkeit der dm-YAC/PARK-Mäuse im Vergleich zu den PARK2 ko-Mäusen ( $p \leq 0,001$ ) und den SCA3 YAC-Mäusen ( $p \leq 0,05$ ), sowie einer verringerten Regelmäßigkeit der WT-Mäuse gegenüber den PARK2 ko-Mäusen ( $p \leq 0,01$ ). Mit  $p \leq 0,05$  war diese Signifikanz bei den Männchen ebenfalls noch zu finden.

Daher wurden dieselben Parameter nun auch für 15 Monate untersucht (Abbildung 17), beginnend mit Vorder- und Hinterpfotenabstand. Vorerst wurden diese jeweils gesamtgeschlechtlich analysiert (links) und anschließend erfolgte eine Aufteilung in Männchen (mitte) und Weibchen (rechts), um mögliche Unterschiede der Geschlechter herauszuarbeiten. In Abbildung 17 wurden der Vorderpfoten- und Hinterpfotenabstand (in cm) der jeweiligen Genotypen im Alter von 15 Monaten gegeneinander aufgetragen. Der Vorderpfotenabstand (Abb. 17A) aller Genotypen lag im Durchschnitt zwischen ca. 10 bis 40 cm. Im Gegensatz zum Vorderpfotenabstand im Alter von 12 Monaten (Abb. 13B) waren keine deutlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen feststellbar und der durchschnittliche Pfotenabstand aller Genotypen war vergleichbar bei ca. 20 cm. Der Pfotenabstand bei den WT- und dm-YAC/PARK-Mäusen war geringfügig kleiner als bei den PARK2 ko- und SCA3 YAC-Mäusen. Unterschiede zwischen den Männchen und Weibchen waren nicht feststellbar (vgl. Abb. 17A-B).

Ähnlich dem Testzeitpunkt mit 12 Monaten zeigte sich auch bei einem Alter von 15 Monaten, dass der Hinterpfotenabstand (Abb. 17B) deutlich größer war als der Vorderpfotenabstand. Jedoch ist der Pfotenabstand der WT-Mäuse nicht kleiner als der der anderen Gruppen. Auch der signifikant größere Pfotenabstand der dm-YAC/PARK-Mäuse, der bei 12 Monaten noch feststellbar war, war 3 Monate später nicht mehr ausgeprägt. Der durchschnittliche Hinterpfotenabstand

betrug ca. 30 bis 40 cm für alle Genotypen. Eine Streuung der Werte war bei allen Genotypen für die Individuen ähnlich bei Werten zwischen 0 und 80 cm.

Anschließend sollten Durchschnittsgeschwindigkeit, Schrittzahl und der Regelmäßigkeitsindex analysiert werden. Anhand von Abbildung 17 wurden Durchschnittsgeschwindigkeit (in cm/s) (C), Schrittzahl (D) und Regelmäßigkeitsindex (E) der Schritte (in %) von WT, PARK2 ko, SCA3 YAC und dm-YAC/PARK verglichen. Die Durchschnittsgeschwindigkeit im CatWalk Test zum Messzeitpunkt 15 Monate lag für alle Tiere um die 150 cm/s. Abweichungen einzelner Individuen von bis zu 300 cm/s waren vorhanden, wurden jedoch ausschließlich bei den Männchen aufgezeichnet. Dementsprechend waren bei den Weibchen solche Abweichungen einzelner Individuen nicht vorhanden. Für die Schrittzahl zeigte sich eine durchschnittliche Schrittzahl bei allen Genotypen von 70 bis 80 Schritten. Diese Ergebnisse waren bereits zum Zeitpunkt von 12 Monaten (Abb. 13) zu erkennen. Die Beurteilung nach dem Regelmäßigkeitsindex (in %) zeigte, dass eine große Varianz in der Regelmäßigkeit vorlag. Insbesondere in der Analyse zwischen den vier Genotypen. Die größte Regelmäßigkeit zeigten die PARK2 ko-Mäuse gegenüber den anderen Genotypen. Im Vergleich zu den WT-Mäusen hatten die PARK2 ko-Mäuse eine signifikant höhere Regelmäßigkeit mit  $p \leq 0,01$ . Die PARK2 ko-Mäuse zeigten mit einer Signifikanz von  $p \leq 0,001$  eine deutlich größere Regelmäßigkeit gegenüber den dm-YAC/PARK. Die geringste Regelmäßigkeit hatten aber die SCA3 YAC-Mäuse, welche auch eine signifikant geringere Regelmäßigkeit im Vergleich zu den dm-YAC/PARK-Mäusen mit einer Signifikanz von  $p \leq 0,05$  aufwiesen. Betrachtet man anschließend die Geschlechter getrennt, zeigte die Analyse des Regelmäßigkeitsindex der Männchen ebenfalls eine verringerte Regelmäßigkeit der WT-Mäuse im Vergleich zu den PARK2 ko-Mäusen. Bei den Männchen ist die geringste Regelmäßigkeit auch bei den SCA3 YAC-Mäuse festzustellen, sowie schon vorher in der Analyse beider Geschlechter gemeinsam festzustellen war. Anders war es bei den Weibchen, denn bei diesen verhielt es sich ausgeglichen. Aber auch hier war der Regelmäßigkeitsindex der SCA3 YAC-Mäuse am geringsten (Abb. 17E).

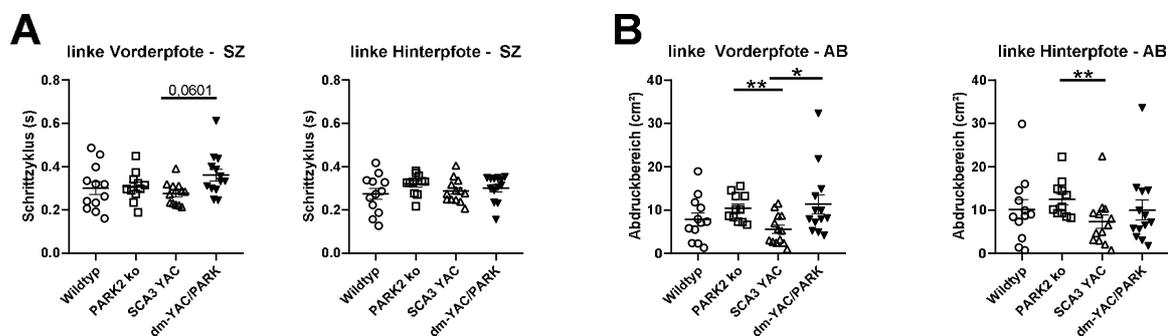


**Abbildung 18: CatWalk 15 Monate: Geschlechtsgemischt, Schrittzklus und Abdruckbereich rechte Vorder- und Hinterpfote**

In A ist der Schrittzklus (in s) und in B der Abdruckbereich (in  $\text{cm}^2$ ) der rechten Vorder- und Hinterpfote zum Zeitpunkt 15 Monate bei den vier Genotypen (WT ( $n=12$ ), PARK2 ko ( $n=11$ ), SCA3 YAC ( $n=13$ ), dm-YAC/PARK ( $n=13$ )) dargestellt. Der Schrittzklus der rechten Vorder- und Hinterpfote zeigte im Vergleich der vier Genotypen keine deutlichen Unterschiede. In B wurde der Abdruckbereich dargestellt. Hier war der Abdruckbereich für die rechte Vorderpfote der SCA3 YAC-Mäuse am geringsten und der der PARK2 ko-Mäuse am höchsten. Die rechte Hinterpfote zeigte eine größere Streuung des Abdruckbereichs mit signifikanten Unterschieden der WT- zu den PARK2 ko-Mäusen ( $p \leq 0,05$ ), sowie die PARK2 ko-Mäuse zu den SCA3 YAC-Mäusen ( $p \leq 0,05$ ) aufgrund des erhöhten Abdruckbereichs für die Gruppe der PARK2 ko-Mäuse.

Anschließend erfolgte auch für den 3 Monate später liegenden Messzeitraum eine Aufteilung der linken und rechten Pfoten, um sowohl den Schrittzklus als auch den Abdruckbereich der Vorder- und Hinterpfoten der vier Genotypen mit 15 Monaten zu bestimmen (Abbildung 18). Der Schrittzklus (Abb. 18A) zeigte weder bei der rechten Vorder- noch bei der rechten Hinterpfote zwischen den Genotypen signifikante Unterschiede. Der SZ dauerte bei allen Genotypen zwischen 0,1 und 0,6 Sekunden. Die Analyse des Abdruckbereichs veranschaulichte jedoch größere Unterschiede im Vergleich der Genotypen, denn dieser zeigte bei den SCA3 YAC-Mäusen für die rechte Vorderpfote den kleinsten Abdruckbereich (ca.  $5 \text{ cm}^2$ ). Der größte Abdruckbereich (Abb. 18B) war für die Gruppe der PARK2 ko-Mäuse mit ca.  $12 \text{ cm}^2$  am festzustellen. Auch in der Analyse der rechten Hinterpfote konnten dieselben Unterschiede des Abdruckbereichs festgestellt werden. Hier zeigte sich im Vergleich der PARK2 ko-Mäuse zu den SCA3 YAC-Mäusen ein signifikant geringerer Abdruckbereich für die SCA3 YAC-Mäuse mit  $p \leq 0,05$ , der allgemein auch der geringste von allen Gruppen war. Im Vergleich zwischen den PARK2 ko- und den WT-Mäusen war ebenfalls der vergrößerte Abdruckbereich der PARK2 ko-Mäuse mit einer

Signifikanz von  $p \leq 0,05$  auffällig. Die Werte der dm-YAC/PARK-Mäuse lagen leicht oberhalb der Werte der WT-Mäuse.



**Abbildung 19: CatWalk 15 Monate: Geschlechtsgemischt linke Vorder- und Hinterpfote**

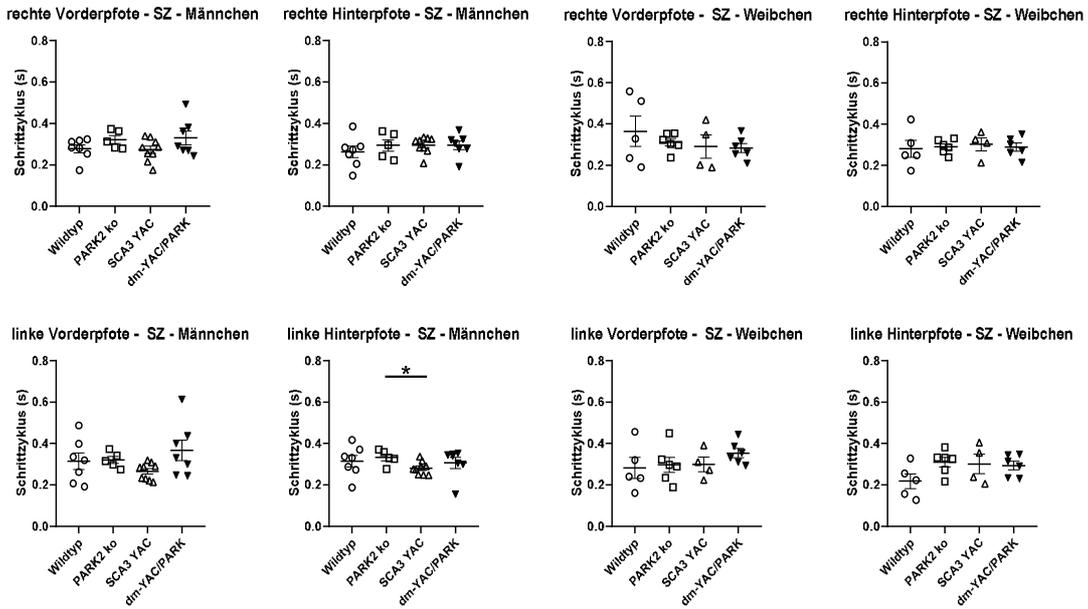
In A ist der Schrittzklus (in s) und in B der Abdruckbereich (in  $\text{cm}^2$ ) der linken Vorder- und Hinterpfote zum Zeitpunkt 15 Monate für die vier Gruppen (WT ( $n=12$ ), PARK2 ko ( $n=11$ ), SCA3 YAC ( $n=13$ ), dm-YAC/PARK ( $n=13$ )) zu sehen. Der Schrittzklus der linken Vorderpfote zeigte den längsten Zyklus bei den dm-YAC/PARK-Mäusen. Für die Hinterpfoten war die Länge des Schrittzklus in allen Gruppen ähnlich. Für die linke Vorderpfote war der Abdruckbereich (B) bei den dm-YAC/PARK-Mäusen am größten und den SCA3 YAC-Mäusen am geringsten. Die SCA3 YAC-Mäuse zeigten signifikante Unterschiede zu den PARK2 ko-Mäusen ( $p \leq 0,01$ ) und zu den dm-YAC/PARK-Mäusen ( $p \leq 0,05$ ). Am geringsten war der Abdruckbereich der linken Hinterpfote bei den SCA3 YAC-Mäusen gegenüber den PARK2 ko-Mäusen mit einer Signifikanz von  $p \leq 0,01$ .

Nachdem die Analysen für die rechten Pfoten durchgeführt wurden, sollten diese ebenfalls für die linken Pfoten erfolgen. Erst gesamtgeschlechtlich (Abb. 19) und anschließend einmal für die Männchen und Weibchen getrennt (Abb. 20).

Die Analyse des Schrittzklus (Abb. 19A) der Mäuse zeigte eine Spanne von 0,1 bis 0,6 Sekunden. Im Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen war der Schrittzklus der dm-YAC/PARK-Mäuse mit  $p=0,0601$  nahe am signifikanten Bereich und somit auffällig länger als der Schrittzklus der SCA3 YAC-Mäuse. Alle übrigen Gruppen hatten bei den linken Pfoten ähnliche Ergebnisse für den Schrittzklus. Der Abdruckbereich (Abb. 19B) zeigte jedoch sowohl für die Vorder- als auch die Hinterpfoten in seiner Ausdehnung Unterschiede zwischen den Gruppen. Der geringste Abdruckbereich war bei den SCA3 YAC-Mäusen zu erkennen. Im Vergleich mit den PARK2 ko-Mäusen war dieser mit einer Signifikanz von  $p \leq 0,01$  geringer und im Vergleich mit den dm-YAC/PARK-Mäusen war der AB mit einer Signifikanz von  $p \leq 0,05$  geringer. Auch bei den Hinterpfoten waren geringere Werte bei den SCA3 YAC-Mäusen im Vergleich zu

den anderen Genotypen feststellbar. Dies äußerte sich mit einer Signifikanz zwischen den SCA3 YAC-Mäusen und den PARK2 ko-Mäusen von  $p \leq 0,01$ . Den größten Abdruckbereich mit ca.  $12 \text{ cm}^2$  für die linke Vorderpfote hatten die dm-YAC/PARK-Mäuse und für die linke Hinterpfote die PARK2 ko-Mäuse.

# A



# B

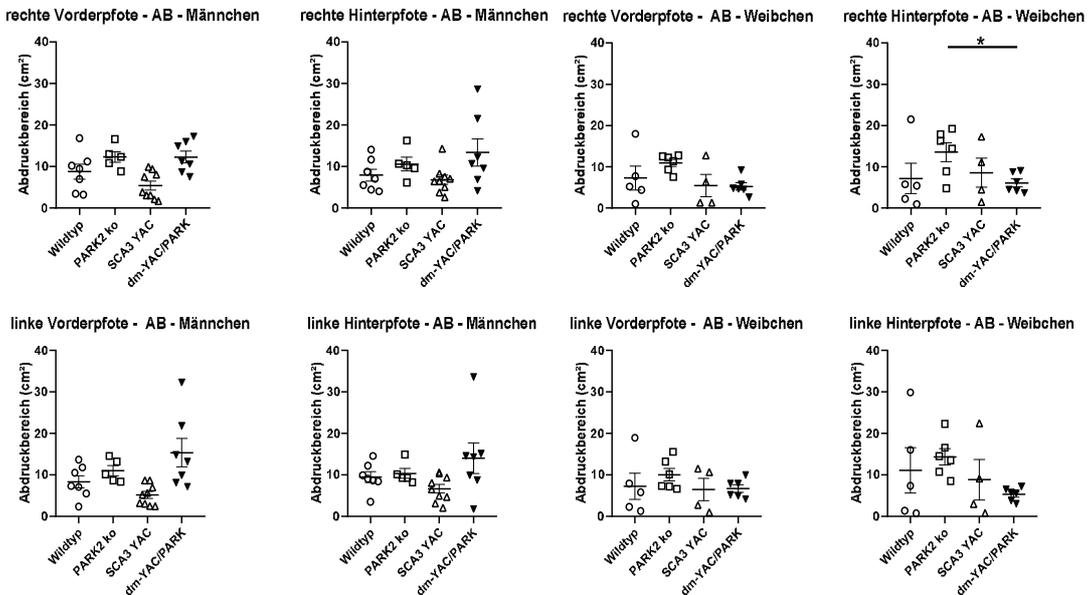


Abbildung 20: CatWalk 15 Monate: Schrittzklus und Abdruckbereich der rechten und linken Pfoten

*Erkennbar ist der Schrittzklus (A) und der Abdruckbereich (B) der rechten und linken Vorder- und Hinterpfote für die vier Genotypen: WT (n=12), PARK2 ko (n=11), SCA3 YAC (n=13), dm-YAC/PARK (n=13) im Vergleich, jeweils einmal für die Männchen (links) WT (n=7), PARK2 ko (n=5), SCA3 YAC (n=9), dm-YAC/PARK (n=7) und einmal für die Weibchen (rechts) WT (n=5), PARK2 ko (n=6), SCA3 YAC (n=4), dm-YAC/PARK (n=6) zum Testzeitpunkt 15 Monate. Mit einer Signifikanz von  $p \leq 0,05$  war bei den Männchen der SZ der linken Hinterpfote der SCA3 YAC-Mäuse geringer als der SZ der PARK2 ko-Mäuse. Sowie der AB bei den Weibchen bei der rechten Hinterpfote für die dm-YAC/PARK-Mäuse mit einer Signifikanz von  $p \leq 0,05$  deutlich geringer war als der der PARK2 ko-Mäuse.*

Nachdem bereits viele signifikante Unterschiede bei SZ und AB für die rechten und linken Pfoten festgestellt wurden, sollte zudem erneut eine Auftrennung in Männchen und Weibchen erfolgen, um potenzielle Unterschiede auch in Bezug auf die Geschlechter zu untersuchen.

Abbildung 20 zeigt folgend eine Aufteilung in Männchen und Weibchen für den Schrittzklus (A) und den Abdruckbereich (B) der rechten Vorder- und Hinterpfote für alle vier Genotypen zum Zeitpunkt von 15 Monaten.

Die Werte der rechten und linken Vorderpfote zeigten die gleichen durchschnittlichen Werte. Bei den Männchen war der längste Schrittzklus der rechten Vorderpfote bei den dm-YAC/PARK-Mäusen, bei den Weibchen bei den WT-Mäusen zu erkennen. Für die rechte Hinterpfote zeigte sich im Gegensatz zum Zeitpunkt von 12 Monaten keine weite Fächerung der Werte für die Individuen. Bei der rechten Hinterpfote waren die Werte der Männchen und Weibchen ähnlich. Der geringste Schrittzklus war bei beiden Geschlechtern bei den WT-Mäusen erkennbar und der größte bei den SCA3 YAC-Mäusen. Der Abdruckbereich zeigte ebenfalls eine weniger große Fächerung der Werte für die einzelnen Individuen der jeweiligen Genotypen. Hier hatten die Männchen der dm-YAC/PARK-Mäuse den größten Abdruckbereich der rechten Vorderpfote und bei den Weibchen die PARK2 ko-Mäuse. Auffällig war, dass bei den Männchen die dm-YAC/PARK-Mäuse einen großen Abdruckbereich (ca. 12 cm<sup>2</sup>) hatten, bei den Weibchen jedoch einen vergleichbar kleinen (ca. 5 cm<sup>2</sup>). Zwischen den Männchen war im Gegensatz zu den 12 Monaten kein deutlicher Unterschied zwischen Vorder- und Hinterpfoten zu erkennen. Hier war der Abdruckbereich der dm-YAC/PARK-Mäuse am größten und weiterhin der der SCA3 YAC-Mäuse am geringsten. Dahingegen war der Abdruckbereich bei den Weibchen breiter gefächert, die Reihenfolge der Größe des Abdruckbereichs war jedoch genauso, wie der der rechten Vorderpfote. Bei der rechten Hinterpfote war der

Abdruckbereich der PARK2 ko-Mäuse signifikant hoch ( $p \leq 0,05$ ) im Vergleich zum kleinsten Abdruckbereich der dm-YAC/PARK-Mäusen bei den Weibchen.

Der Schrittzzyklus lag bei den linken Pfoten für alle Gruppen zwischen 0,1 und 0,5 s. Erkennbar war, dass für die linke Vorderpfote sowohl bei den Weibchen als auch bei den Männchen der größte Schrittzzyklus bei den dm-YAC/PARK-Mäusen vorzufinden war. Bei den linken Hinterpfoten war, im Gegensatz zum vorherigen Testzeitpunkt von 12 Monaten, festzustellen, dass die Werte der einzelnen Individuen innerhalb der Gruppe weniger weit gefächert waren. Für die linke Hinterpfote bei den Männchen waren die Werte der PARK2 ko-Mäuse signifikant ( $p \leq 0,05$ ) höher als die der SCA3 YAC-Mäuse. Bei den Männchen hatten die SCA3 YAC-Mäuse für die linke Hinterpfote den geringsten Schrittzzyklus, bei den Weibchen die WT-Mäuse. Die restlichen Gruppen zeigten ähnliche durchschnittliche Werte von ca. 0,3 s. Auch beim Abdruckbereich waren Unterschiede gegenüber der 12 Monate zu erkennen. Hier zeigten auch die Weibchen für die linke Vorder- und Hinterpfote eine ähnlich große Fächerung der Werte wie die Männchen, besonders war dies bei den WT- und SCA3 YAC-Mäusen zu erkennen. Der Abdruckbereich der dm-YAC/PARK-Mäuse hingegen war bei den Männchen, im Gegensatz zu den anderen Gruppen und zum Testzeitpunkt von 12 Monaten, deutlich vergrößert. Sehr kleine Abdruckbereiche, vor allem bei den Männchen, zeigten die SCA3 YAC-Mäuse, die größten Werte für die Weibchen, sowohl für die linke Vorder- als auch Hinterpfote, die Gruppe der PARK2 ko-Mäuse.

Nachdem alle Bereiche des CatWalks (Vorderpfoten-, Hinterpfotenabstand, Durchschnittsgeschwindigkeit, Schrittzahl, Regelmäßigkeitsindex, Schrittzzyklus, Abdruckbereich) analysiert wurden, soll Tabelle 35 einen Vergleich der Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den Testzeitpunkten (12 und 15 Monate) für die einzelnen Bereiche darstellen.

Stellt man die Untersuchungszeitpunkte 12 und 15 Monate in direkten Vergleich zueinander, kann man feststellen, dass sich einige Parameter nicht veränderten. Sowohl mit 12 als auch 15 Monaten lag ein größerer Hinterpfoten- als Vorderpfotenabstand bei allen Gruppen vor. Zudem zeigten sich größere

Unterschiede zwischen den Werten der einzelnen Individuen beim Hinterpfotenabstand. Der Vorderpfotenabstand war bei den Individuen jedoch ähnlich, sowohl mit 12 als auch mit 15 Monaten.

Ebenso wie die Durchschnittsgeschwindigkeit mit 150 cm/s änderte sich auch die Schrittzahl mit einem Durchschnitt von 70 bis 80 Schritten für alle vier Genotypen im Vergleich von 12 zu 15 Monaten nicht.

Der Schrittzklus lag bei allen Genotypen zu beiden Testzeitpunkten bei ungefähr 0,3 s und veränderte sich im Verlauf nicht.

Dennoch konnte festgestellt werden, dass sich der Vorderpfotenabstand von 12 auf 15 Monate im Durchschnitt vergrößerte. Dabei lag der Abstand dessen bei den WT-Mäusen mit 15 Monaten, wie auch schon mit 12 Monaten, bei deutlich geringeren Werten im Vergleich zu den anderen Genotypen. Der Hinterpfotenabstand hatte ebenfalls mit 12 Monaten die geringsten Werte bei den WT-Mäusen, mit 15 Monaten hingegen war dieser bei den vier Genotypen ähnlich groß.

Mit 12 Monaten waren die SCA3 YAC-Mäuse im Durchschnitt noch die schnellsten, mit 15 Monaten waren die PARK2 ko-Mäuse geringfügig schneller. Die größte Schrittzahl hatten die SCA3 YAC-Mäuse mit 12 Monaten, mit 15 Monaten war die Schrittzahl der WT- und dm-YAC/PARK-Mäuse größer als die der SCA3 YAC-Mäuse. Mit 12 Monaten hatten die dm-YAC/PARK-Mäuse den unregelmäßigsten Schrittzklus mit einem Regelmäßigkeitsindex von 70 %, 3 Monate später zeigten sich signifikant unregelmäßigere Schritte bei den SCA3 YAC-Mäusen ( $p \leq 0,05$ ). Die regelmäßigsten Schritte hatten die PARK2 ko-Mäuse mit einer Signifikanz von  $p \leq 0,001$  gegenüber den dm-YAC/PARK-, mit einer Signifikanz von  $p \leq 0,01$  gegenüber den WT-Mäusen.

Der Abdruckbereich der Vorder- und Hinterpfoten war bei den Männchen mit 12 Monaten signifikant geringer. Zudem war der Abdruckbereich bei den dm-YAC/PARK-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen geringer. Bei den rechten Vorderpfoten der Weibchen zeigte sich ein verringerter Abdruckbereich bei den dm-YAC/PARK-Mäusen gegenüber den PARK2 ko-Mäusen. Mit 15 Monaten waren jedoch keine signifikanten Unterschiede im Abdruckbereich der rechten und linken Vorder- und Hinterpfoten mehr zu erkennen. Dennoch waren die

geringsten Abdruckbereiche bei den SCA3 YAC-Mäusen festzustellen, die größten bei den PARK2 ko-Mäusen. Mit einer Signifikanz von  $p \leq 0,05$  war der Abdruckbereich der rechten Hinterpfote der weiblichen PARK2 ko-Mäuse größer als der der dm-YAC/PARK-Mäuse.

Tabelle 35: Gemeinsamkeiten und Unterschiede CatWalk zwischen 12 und 15 Monate alten Tieren

	Gemeinsamkeiten	Unterschiede
<b>Vorderpfotenabstand</b>	- Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen	<b>12 Monate</b> - keine deutlichen Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen - durchschnittlicher Pfotenabstand aller Gruppen war vergleichbar bei ca. 20 cm <b>15 Monate</b> - Vorderpfotenabstand aller Gruppen lag im Durchschnitt zwischen 10 bis 40 cm
<b>Hinterpfotenabstand</b>	- Hinterpfotenabstand war deutlich größer als der Vorderpfotenabstand - größere Unterschiede zwischen den Individuen der jeweiligen Gruppen des Hinterpfotenabstands im Vergleich zum Vorderpfotenabstand	<b>12 Monate</b> - signifikant größerer Pfotenabstand der dm-YAC/PARK-Mäuse gegenüber den WT-Mäusen mit 12 Monaten - die Männchen zeigten größere Fächerung der Werte als die Weibchen mit 12 Monaten <b>15 Monate</b> - bei den dm-YAC/PARK-Mäuse kein vergrößerter

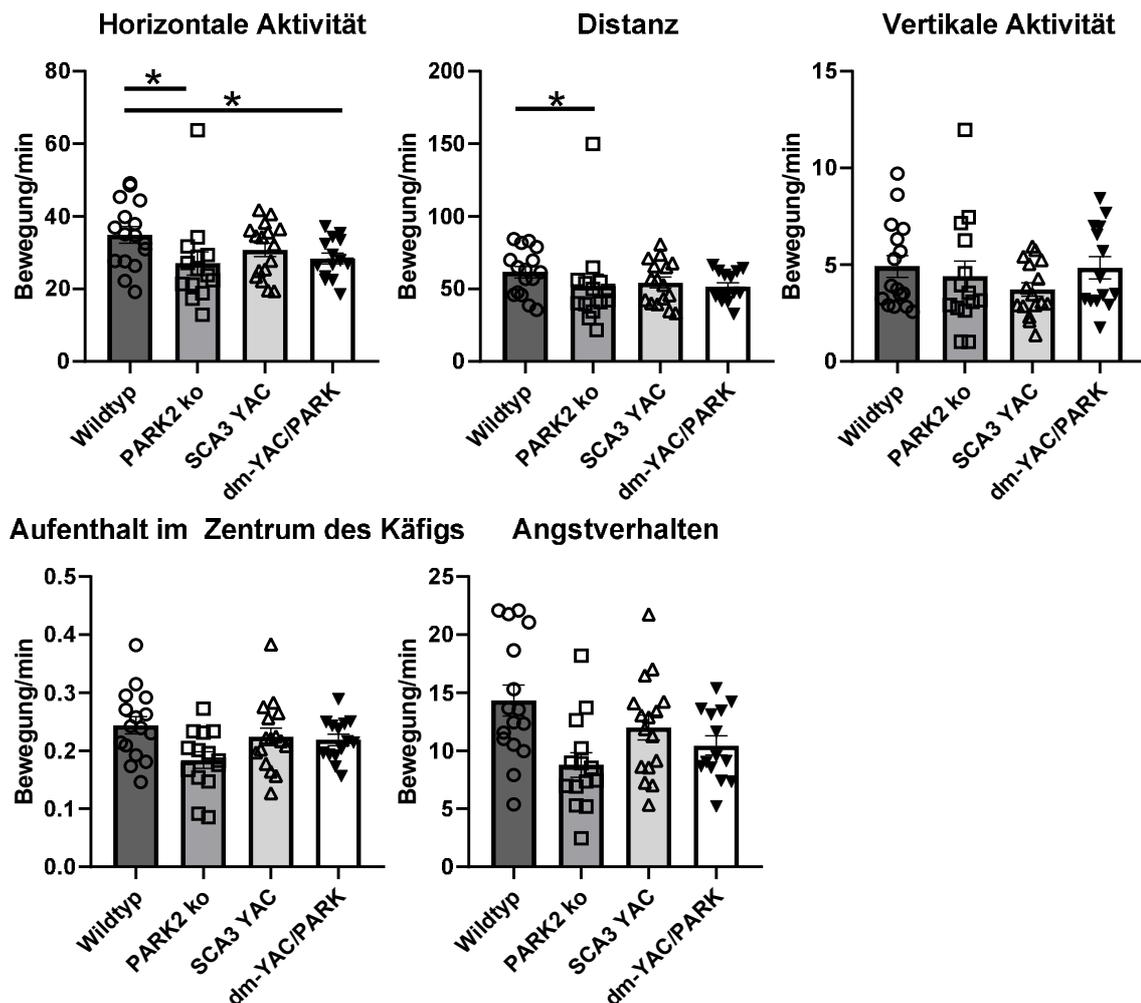
		Hinterpfotenabstand mit 15 Monaten mehr im Vergleich zu den anderen Genotypen - ähnlich große Fächerung der Abstände bei Männchen und Weibchen
<b>Durchschnittsgeschwindigkeit</b>	- Durchschnittsgeschwindigkeit 150 cm/s	
<b>Schrittzahl</b>	- Schrittzahl von 70 bis 80 Schritten	
<b>Regelmäßigkeitsindex</b>		<p><b>12 Monate:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- keine Signifikanzen</li> <li>- zwischen 50 und 100 %</li> <li>- dm-YAC/PARK-Mäuse: unregelmäßigstes Gangmuster</li> <li>- einzelne Individuen bei dm-YAC/PARK zeigten große Abweichungen im Gegensatz zu den anderen Genotypen</li> <li>- Weibchen hatten bei allen 4 Genotypen größere Unterschiede unter den Individuen</li> </ul> <p><b>15 Monate:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- signifikant geringere Regelmäßigkeit der dm-YAC/PARK-Mäuse im Vergleich zu den PARK2 ko-Mäusen (<math>p \leq 0,001</math>) und den</li> </ul>

		SCA3 YAC-Mäusen ( $p \leq 0,05$ ) - verringerte Regelmäßigkeit der WT-Mäuse gegenüber den PARK2 ko-Mäusen ( $p \leq 0,01$ ) - Signifikanz von $p \leq 0,05$ zwischen WT-Mäusen gegenüber den PARK2 ko-Mäusen bei den Männchen
<b>Schrittzklus</b>	- für alle Genotypen durchschnittlich bei 0,3 s	
<b>Abdruckbereich</b>		<b>12 Monaten</b> - großer Unterschied zwischen Vorder- und Hinterpfoten rechts bei den Männchen <b>15 Monate</b> - kein deutlicher Unterschied zwischen den Genotypen

### 3.2.4 LabMaster System zur longitudinalen Analyse von Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme, Aktivität und Angstverhalten

Zusätzlich zu den Ganganalysen erfolgten noch Verhaltensanalysen durch den LabMaster Test. Für diese longitudinale Verhaltensanalyse mittels LabMaster (TSE Systems, Bad Homburg, Germany) wurden die Mäuse über einen Zeitraum von 70 Stunden in einen neuen und größeren Käfig gebracht. Diese Käfige waren mit Infrarotlichtquellen und -sensoren ausgestattet, um die Aktivität und den Aufenthaltsort der Mäuse aufzuzeichnen. Diese wurden so ausgerichtet, dass sie die horizontale und vertikale Aktivität aufzeichneten. Zusätzlich wurde die

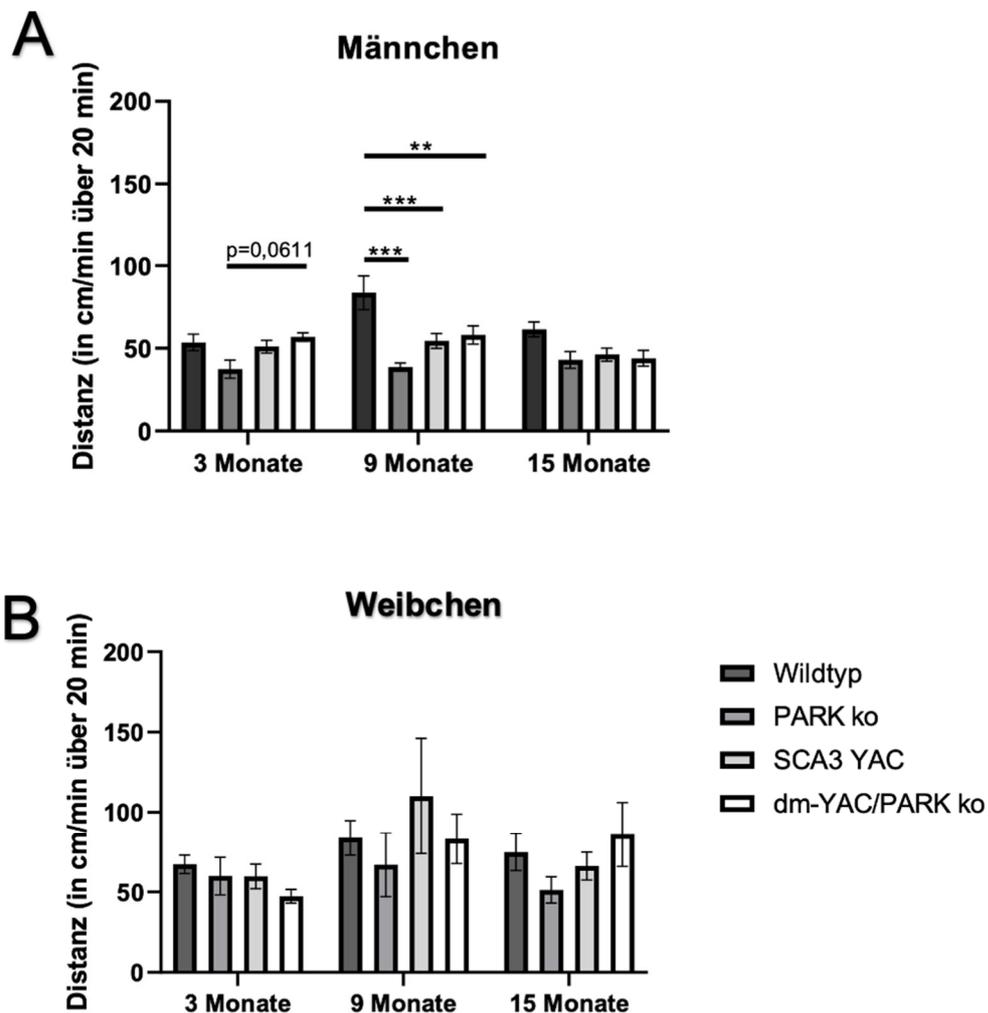
Nahrungsaufnahme, sowie die Flüssigkeitsaufnahme dokumentiert. Zu den analysierten Parametern zählen somit die horizontale und vertikale Aktivität, das heißt das Aufrichten der Mäuse im Käfig, die totale zurückgelegte Distanz innerhalb des Käfigs, die im Zentrum des Käfigs verbrachte Zeit und das Angstverhalten, bemessen in Relation von Aufenthalt im Zentrum des Käfigs zu ihrem Aufenthalt am Rand des Käfigs.



**Abbildung 21: LabMaster zum Zeitpunkt von 3 Monaten**

Dargestellt sind horizontale Aktivität (Bewegung/min), Distanz (Bewegung/min), vertikale Aktivität (Bewegung/min), Aufenthalt im Zentrum des Käfigs (Bewegung/min) und Angstverhalten (Bewegung/min) der vier Genotypen (WT n=16, PARK2 ko n=14, SCA3 YAC n=16, dm-YAC/PARK n=14) zum Zeitpunkt 3 Monate. Deutliche Unterschiede mit einer Signifikanz von  $p \leq 0,05$  zwischen den WT- und PARK2 ko-Mäusen lagen sowohl in der horizontalen Aktivität als auch in der Distanz mit weniger Bewegung/min der PARK2 ko-Mäuse. Bei allen Tests schnitten die WT-Mäuse mit der meisten Bewegung/min und die PARK2 ko-Mäuse mit den geringsten Bewegungen/min ab. Ausgenommen von der vertikalen Aktivität, hier war die Bewegung/min der SCA3 YAC-Mäuse am geringsten.

Abbildung 21 zeigt die horizontale Aktivität, die zurückgelegte Distanz, die vertikale Aktivität, sowie den Aufenthalt im Zentrum des Käfigs und das Angstverhalten der verschiedenen Gruppen zum Zeitpunkt 3 Monate. Erkennbar ist, dass die WT-Mäuse die meisten Bewegungen/min machten, da sie besonders viele Lichtsignale auslösten. Signifikant mehr als die PARK2 ko- und SCA3 YAC-Mäuse ( $p \leq 0,05$ ). Die PARK2 ko und SCA3 YAC-Mäuse lösten die wenigsten Lichtsignale aus und zeigten somit die geringste Bewegung im Käfig. Weiterhin wurde die zurückgelegte Distanz in Bewegung pro Minute analysiert. Auch im Vergleich der Distanz (Bewegung/min) lösten die WT-Mäuse signifikant mehr Lichtquellen als die PARK2 ko-Mäuse ( $p \leq 0,05$ ) aus. Die Unterschiede innerhalb der Mutanten (PARK2 ko-, SCA3 YAC- und dm-YAC/PARK) war hingegen gering (Abb. 21). Bei der vertikalen Aktivität zeigten die Individuen innerhalb der Gruppen eine hohe Varianz. Hier waren die Bewegungen/min bei den WT-Mäusen und den dm-YAC/PARK-Mäusen am höchsten. Auch für den Aufenthalt im Zentrum des Käfigs und das Angstverhalten zeigten die WT-Mäuse die größte Aktivität und dementsprechend das häufigste Auslösen von Infrarotlichtquellen und -sensoren, die PARK2 ko-Mäuse hingegen die geringste Aktivität. Beim Aufenthalt im Zentrum des Käfigs lagen die SCA3 YAC und dm-YAC/PARK-Mäuse nah beieinander. Bei der Untersuchung des Angstverhaltens waren die Bewegung/min bei den SCA3 YAC-Mäusen höher als die der dm-YAC/PARK-Mäuse (Abb. 21).



**Abbildung 22: LabMaster Distanz in cm/m in den ersten 20 min, Anpassung an eine neue Umgebung**

Dargestellt ist die Distanz (in cm/min über 20 min) der Gruppen jeweils zum Zeitpunkt 3, 9 und 15 Monate, aufgeteilt in Männchen (A) und Weibchen (B). A zeigt die Distanz für die Männchen und alle vier Genotypen (WT  $n=7$ , PARK2 ko  $n=5$ , SCA3 YAC  $n=10$ , dm-YAC/PARK  $n=7$ ). Mit 3 Monaten waren bei den Männchen bereits signifikante Unterschiede in der Distanz zwischen den PARK2 ko- und den dm-YAC/PARK-Mäusen zu erkennen. Die zurückgelegte Distanz war mit  $p=0,0611$  geringer als bei den dm-YAC/PARK-Mäusen. Mit 9 Monaten waren mehrere signifikante Unterschiede zu erkennen. Mit  $p \leq 0,001$  hatten die WT-Mäuse eine größere Distanz zurückgelegt als die PARK2 ko-Mäuse und die SCA3 YAC-Mäuse mit  $p \leq 0,01$  größer als die der dm-YAC/PARK. Mit 15 Monaten zeigten sich zwischen den Genotypen bei den Männchen jedoch keine signifikanten Unterschiede. B) Bei den Weibchen (WT  $n=8$ , PARK2 ko  $n=8$ , SCA3 YAC  $n=6$ , dm-YAC/PARK  $n=7$ ) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede, weder mit 3, noch mit 9 oder 15 Monaten.

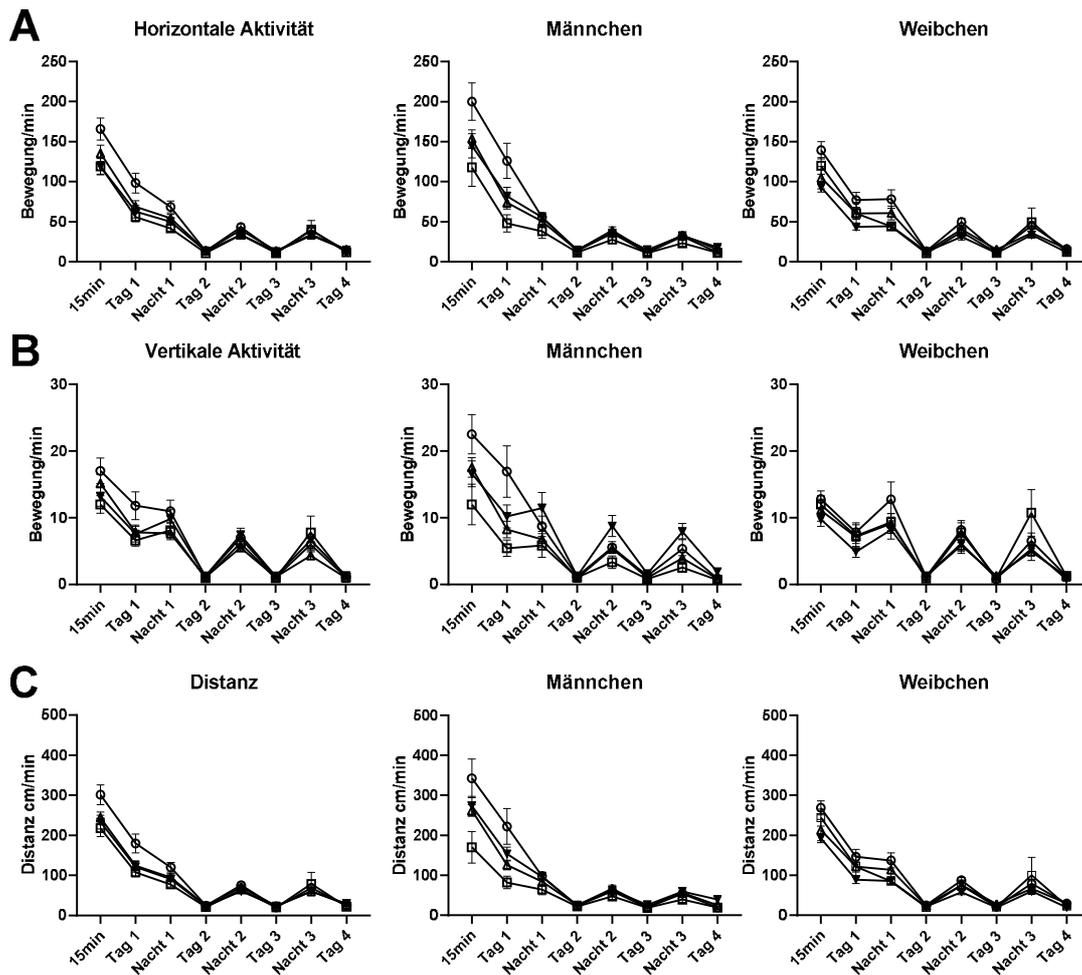
Um den Verlauf der Anpassung an eine neue Umgebung der Genotypen zu untersuchen und gleichzeitig miteinander zu vergleichen und die damit

zusammenhängenden möglichen Veränderungen zu analysieren, wurden die einzelnen Ergebnisse zu den verschiedenen Messzeitpunkten in Abbildung 22 gegenübergestellt. Abbildung 22 zeigt somit die Distanz (in cm/min über 20 min) der verschiedenen Genotypen (WT, PARK2 ko, SCA3 YAC, dm-YAC/PARK) im Vergleich zu den einzelnen Messzeitpunkten (3, 9, 15 Monate) einmal für die Männchen (Abb. 22A) und einmal für die Weibchen (Abb. 22B). Dabei bilden die ersten 20 min die Anpassung an eine neue Umgebung ab.

Betrachtet man vorerst die Männchen (A), ist erkennbar, dass bei diesen die WT-Mäuse die größte Distanz zurücklegten, sowohl mit 3, 9 als auch mit 15 Monaten und die PARK2 ko-Mäuse hingegen jeweils die geringste Distanz zurücklegten. Der Unterschied der Männchen bei 3 Monaten zwischen den PARK2 ko- und den dm-YAC/PARK-Mäusen mit einer deutlich größeren zurückgelegten Distanz war mit  $p=0,0611$  beinahe signifikant. Deutlich signifikante Unterschiede waren erneut mit 9 Monaten für die Männchen festzustellen. Hier zeigten die WT-Mäuse zu allen anderen Gruppen deutliche Unterschiede und eine somit höhere zurückgelegte Distanz in den ersten 20 Minuten. Die WT-Mäuse in Gegenüberstellung zu den PARK2 ko-Mäusen mit  $p\leq 0,001$ , sowie die WT- zu den SCA3 YAC-Mäusen ebenfalls mit  $p\leq 0,001$ . Weiterhin signifikant mehr Distanz legten die WT- im Vergleich zu den dm-YAC/PARK-Mäusen mit  $p\leq 0,01$  zurück. Im Verlauf zum nächsten Messzeitpunkt mit 15 Monaten waren die Unterschiede zwischen den Gruppen nicht mehr signifikant, jedoch war weiterhin zu erkennen, dass die WT-Mäuse die größte und die PARK2 ko-Mäuse die geringste Distanz zurücklegten.

Schaut man sich hingegen die Weibchen (B) an, zeichnete sich ein anderes Bild ab. Hier legten die WT-Mäuse mit 3 Monaten die größte Distanz zurück und die dm-YAC/PARK-Mäuse die kleinste. Die PARK2 ko-Mäuse und die SCA3 YAC-Mäuse zeigten hingegen eine ähnlich zurückgelegte Distanz in den ersten 20 Minuten mit 60 cm/min, also knapp weniger als die WT-Mäuse, aber mehr als die dm-YAC/PARK-Mäuse mit ca. 50 cm/min zurückgelegter Distanz. Mit 9 Monaten war bei allen Genotypen eine Zunahme der Distanz festzustellen. Hier legten dann jedoch die SCA3 YAC-Mäuse die größte Distanz zurück mit ca. 120 cm/min, gefolgt von den WT- und dm-YAC/PARK-Mäusen. Die PARK2 ko-Mäuse legten

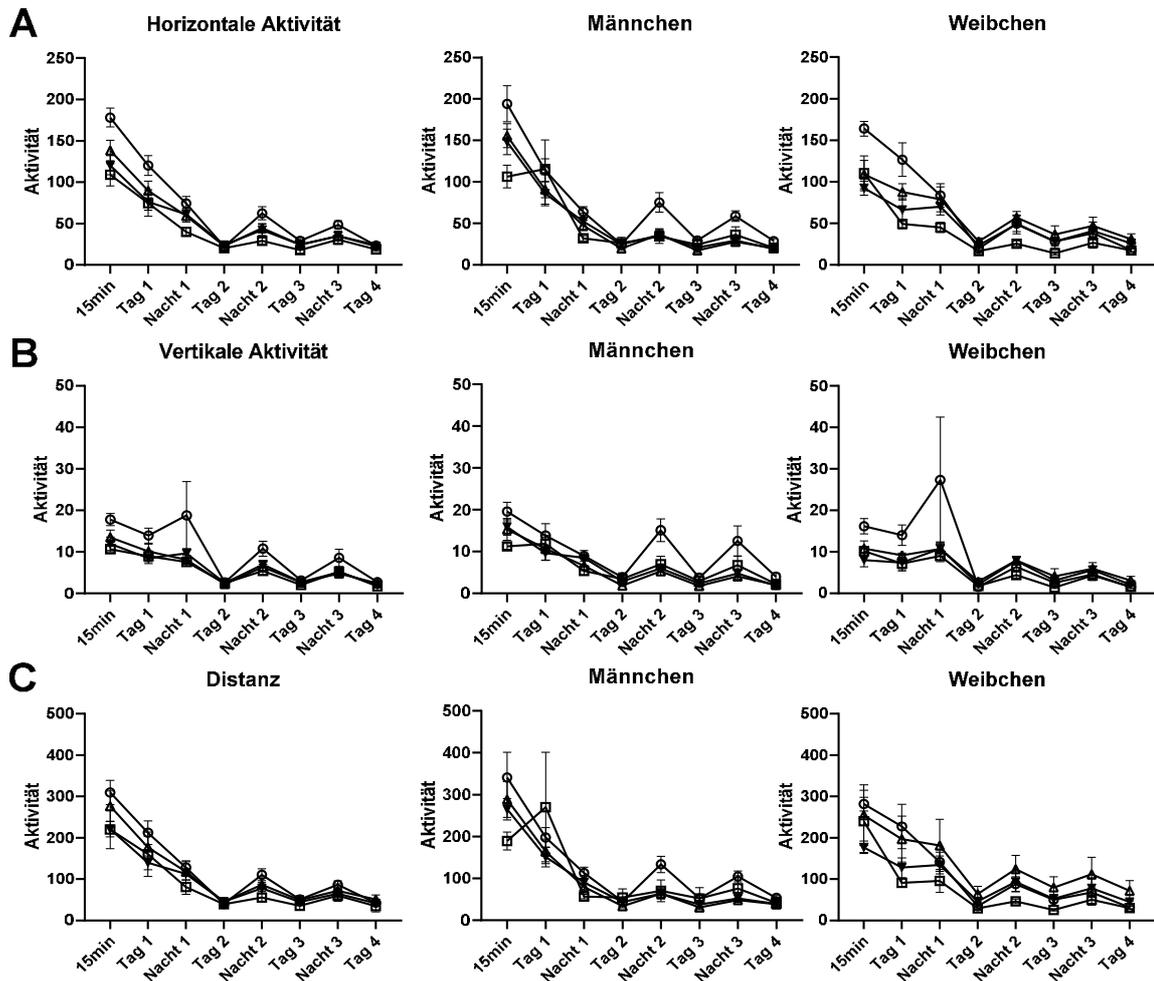
zu diesem Messzeitpunkt die geringste Distanz mit nur knapp mehr als 60 cm/min zurück. Auch mit 15 Monaten waren wieder Unterschiede zu erkennen: Die dm-YAC/PARK-Mäuse hatten hier die größte Distanz zurückgelegt, gefolgt von den WT-, SCA3 YAC- und schlussendlich den PARK2 ko-Mäusen, die lediglich eine Distanz von 50 cm/min zurücklegten.



**Abbildung 23: Verlauf horizontale, vertikale Aktivität und Distanz über 70 Stunden**

Veranschaulicht ist der Verlauf für die vier Genotypen (WT  $n=15$ , PARK2 ko  $n=13$ , SCA3 YAC  $n=16$ , dm-YAC/PARK  $n=14$ ), zum Zeitpunkt 3 Monate, jeweils einmal für die gesamte Gruppe (links) und anschließend aufgeteilt in Männchen (mitte) (WT  $n=7$ , PARK ko  $n=5$ , SCA3 YAC  $n=10$ , dm-YAC/PARK  $n=7$ ) und Weibchen (rechts) (WT  $n=8$ , PARK ko  $n=8$ , SCA3 YAC  $n=6$ , dm-YAC/PARK  $n=7$ ). Erkennbar war, dass die Aktivität und somit die zurückgelegte Distanz bis zur ersten Nacht bei allen Genotypen erhöht war, aber sich ab dem 2. Tag auf einen Nacht-Tag-Rhythmus, mit ähnlicher Aktivität der Genotypen in der Nacht und Ruhe am Tag, einpendelte. Zudem war erkennbar, dass die Aktivität der WT-Mäuse im Vergleich zu den Mutanten zu Beginn immer am höchsten war.

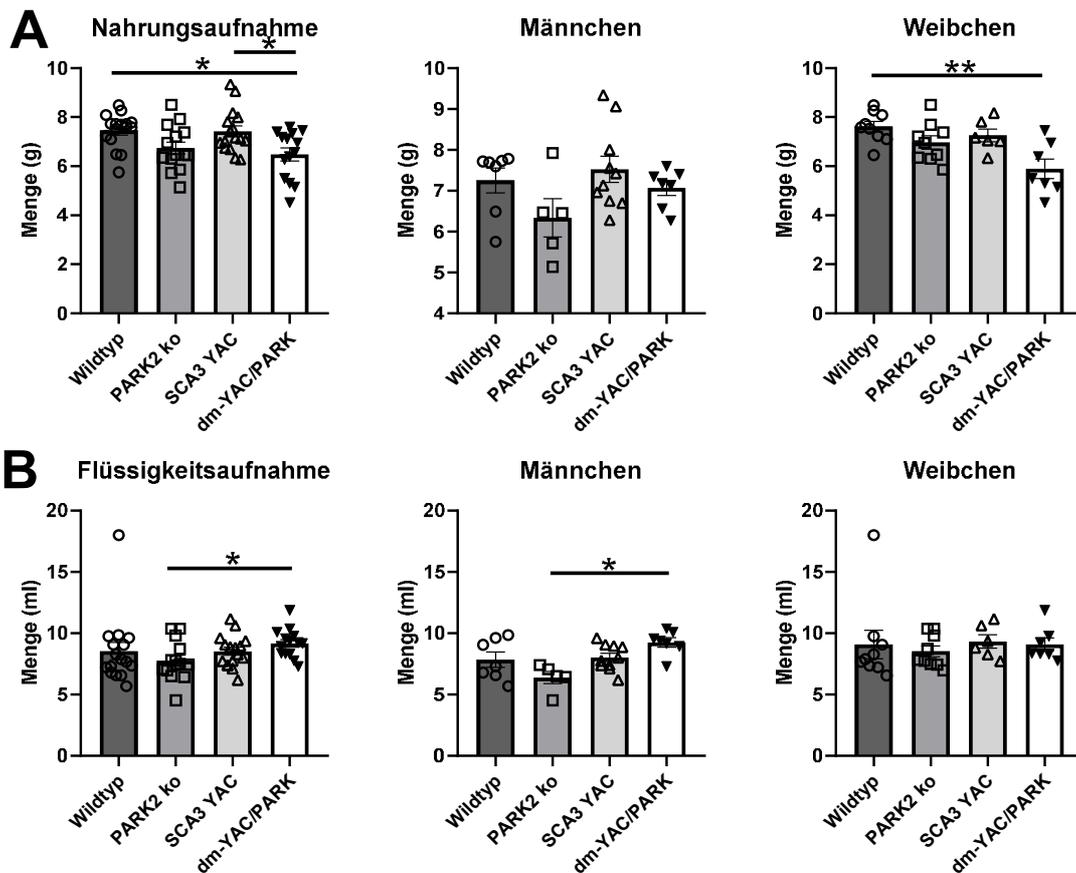
Zur Darstellung der Entwicklung, während der 70 Stunden des LabMaster Tests, wurde in Abbildung 23 der Testzeitpunkt 3 Monate unterteilt in 8 Zeitpunkten dargestellt. Als erster Zeitpunkt wurden die ersten 15 Minuten nach Einbringen der Maus in den neuen Käfig analysiert, in denen sich die Tiere an die neue Situation gewöhnten. Danach bestanden die Zeitpunkte aus jeweils zusammengefassten Datenpunkten vom entsprechenden Tag bzw. der entsprechenden Nacht (Tag 1, Nacht 1, Tag 2, Nacht 2, Tag 3, Nacht 3, Tag 4). Abbildung 23 zeigt die horizontale (A), vertikale (B) Aktivität und die Distanz (C) für die vier Gruppen (WT, PARK2 ko, SCA3 YAC, dm-YAC/PARK). Erkennbar ist, dass die Aktivität sowohl horizontal als auch vertikal und in der Distanz in den ersten 15 Minuten am höchsten war, zu Tag 1 und Nacht 1 auf ein ähnliches Level abnahm und sich dann in einen Tag/Nacht-Rhythmus einspielte. Hier ist zu sehen, dass die Aktivität ab Tag 2 sehr gering war und sich ein gleichmäßiger Rhythmus zwischen ca. 50 Bewegungseinheiten pro Sensor/min in der Nacht und sehr geringer Aktivität am Tag einspielte. Man kann zudem erkennen, dass bei Beginn die Aktivität der WT-Mäuse am höchsten war. Somit zeigten die Mäuse der verschiedenen Genotypen alle nach der ersten Gewöhnungsphase eine normale Aktivität in der Nacht und einen Schlafrythmus am Tag, wie von Mäusen bereits bekannt.



**Abbildung 24: Verlauf Horizontale, Vertikale Aktivität und Distanz über 70 Stunden, Zeitpunkt 9 Monate**

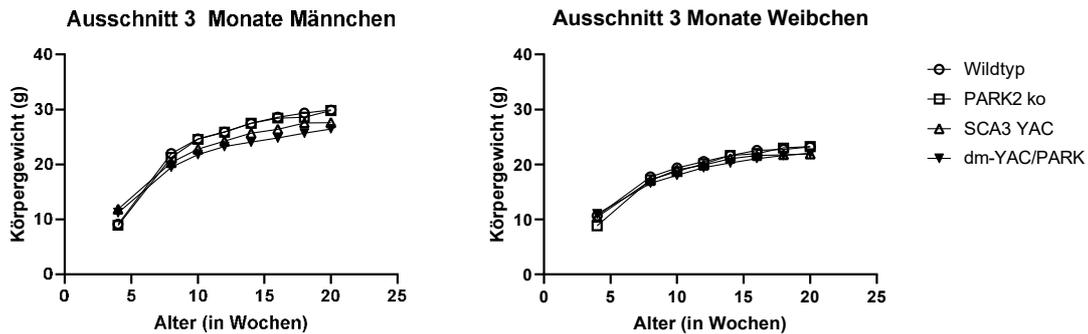
Abb. 24 zeigt den Verlauf der vier Genotypen (WT  $n=15$ , PARK2 ko  $n=13$ , SCA3 YAC  $n=16$ , dm-YAC/PARK  $n=14$ ), Zeitpunkt 9 Monate, jeweils einmal für die gesamte Gruppe (links) und anschließend aufgeteilt in Männchen (mitte) (WT  $n=7$ , PARK2 ko  $n=5$ , SCA3 YAC  $n=10$ , dm-YAC/PARK  $n=7$ ) und Weibchen (rechts) (WT  $n=8$ , PARK2 ko  $n=8$ , SCA3 YAC  $n=6$ , dm-YAC/PARK  $n=7$ ). Erkennbar ist, dass die Aktivität und somit die zurückgelegte Distanz bis zur ersten Nacht bei allen Genotypen erhöht war, sich aber ab dem 2. Tag auf einen Nacht-Tag-Rhythmus einpendelte. Hierbei zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Genotypen mit deutlich höherer Aktivität der WT-Mäuse im Vergleich zu den anderen Gruppen. Lediglich die SCA3 YAC-Weibchen zeigten bei der zurückgelegten Distanz höhere Werte als die restlichen Gruppen. Zudem war erkennbar, dass die Aktivität der WT-Mäuse im Vergleich zu den Mutanten zu Beginn immer am höchsten war.

Zum Vergleich der Entwicklung wurde dies erneut zu einem späteren Zeitpunkt mit 9 Monaten durchgeführt. Abbildung 24 zeigt die horizontale (A) und vertikale (B) Aktivität und die Distanz (C) für alle Genotypen im Zeitraum von 70 Stunden (15 min, Tag 1, Nacht 1, Tag 2, Nacht 2, Tag 3, Nacht 3, Tag 4) zum Messzeitpunkt 9 Monate. Erkennbar ist, dass die Aktivität sowohl horizontal als auch vertikal und in der Distanz auch zu diesem Testzeitpunkt in den ersten 15 Minuten am höchsten war, zu Tag 1 und Nacht 1 auf ein ähnliches Level abnahm und sich dann in einen Tag/Nacht-Rhythmus einspielte. Hier ist erkennbar, dass die Aktivität ab Tag 2 sehr gering war und sich ein gleichmäßiger Rhythmus zwischen ca. 50 Lichtschrankendurchbrechungen pro Minute in der Nacht und einer sehr geringen Aktivität am Tag einspielte. Man kann sehen, dass bei Beginn die Aktivität der WT-Mäuse am höchsten war (Abb. 24A-C).



**Abbildung 25: Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme im Alter von 3 Monaten**

Dargestellt ist die Nahrungsaufnahme (in g) jeweils in (A) für beide Geschlechter (links) der Genotypen WT ( $n=15$ ), PARK2 ko ( $n=14$ ), SCA3 YAC ( $n=16$ ), dm-YAC/PARK ( $n=15$ ), für die Männchen (mitte) WT ( $n=6$ ), PARK2 ko ( $n=5$ ), SCA3 YAC ( $n=10$ ), dm-YAC/PARK ( $n=8$ ) und für die Weibchen (rechts) WT ( $n=9$ ), PARK2 ko ( $n=9$ ), SCA3 YAC ( $n=6$ ), dm-YAC/PARK ( $n=7$ ). In B) wurde die Flüssigkeitsaufnahme (in ml) zusammen für beide Geschlechter (links) dargestellt und ebenfalls getrennt für die Männchen (mitte) und für die Weibchen (rechts). Hierbei handelt es sich um absolute Mengen und deren Mittelwerte. Deutlich signifikante Unterschiede zeigten sich mit einer Signifikanz von  $p \leq 0,05$  zwischen den WT- und dm-YAC/PARK-Mäusen, sowie zwischen den SCA3 YAC- und dm-YAC/PARK-Mäusen in der Nahrungsaufnahme. Bei den Weibchen sogar mit einer Signifikanz von  $p \leq 0,01$  zwischen den WT- und dm-YAC/PARK-Mäusen. Die geringste Nahrungsaufnahme war dabei für die doppelt mutierten Tiere zu erkennen. Bei der Flüssigkeitsaufnahme war ein gegensätzlicher Trend zu erkennen, denn die dm-YAC/PARK-Mäuse nahmen mit einer Signifikanz von  $p \leq 0,01$  deutlich mehr Flüssigkeit auf als die PARK2 ko-Mäuse (gesamtes Geschlecht und Männchen).



**Abbildung 26: Ausschnitt Körpergewicht Männchen und Weibchen von 0-20 Wochen**

In Abbildung 26 ist der Ausschnitt des Körpergewichts für WT, PARK2 ko, SCA3 YAC und dm-YAC/PARK im Alter von 0-20 Wochen (Zeitpunkt 3 Monate) für die Männchen (links) (WT n=14, PARK2 ko n=10, SCA3 YAC n=24, dm-YAC/PARK n=14) und für die Weibchen (rechts) (WT n=23, PARK2 ko n=14, SCA3 YAC n=19, dm-YAC/PARK n=18) dargestellt. Bei den Männchen hatten zwar die PARK2 ko-Mäuse zu Beginn der Messungen das geringste Gewicht, ab 10 Wochen jedoch das höchste. Gegenläufig dazu entwickelte sich das Gewicht der dm-YAC/PARK-Mäuse vom höchsten zum geringsten Gewicht im Vergleich der Gruppen. Bei den Weibchen zeigte sich der gleiche Trend jedoch bei geringerem Durchschnittsgewicht.

Zusätzlich zu den Verhaltensanalysen wurde die Nahrungsaufnahme und die Flüssigkeitsaufnahme der Tiere über 70 Stunden festgehalten, um das Aufnahmeverhalten während des Tests zu beobachten. Der erste Zeitpunkt war mit 3 Monaten (A). Hier bietet es sich an zu diesem Zeitpunkt auch die Körpergewichtsveränderung zu betrachten und einen Bezug zwischen Nahrungsaufnahme und Körpergewicht herzustellen (Abb. 26).

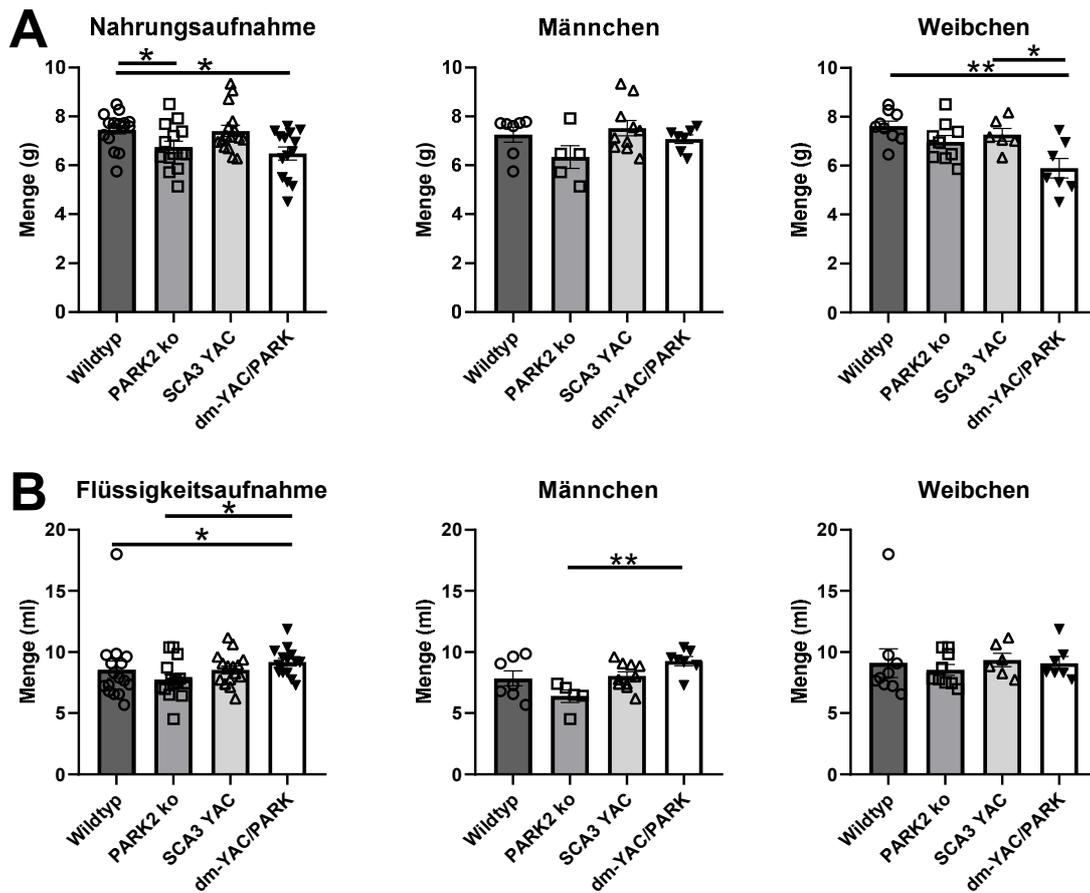
In Abbildung 25A wurde die Nahrungsaufnahme (in g) und in Abbildung 25B die Flüssigkeitsaufnahme der verschiedenen Gruppen jeweils für beide Geschlechter zusammen und jeweils einmal für die Männchen und einmal für die Weibchen im Alter von 3 Monaten dargestellt. Erkennbar ist, dass die Nahrungsaufnahme bei den PARK2 ko- und die dm-YAC/PARK-Mäuse am geringsten war und im Vergleich zu den WT-Mäusen jeweils mit  $p \leq 0,05$  signifikant geringer ausfiel.

Auch bei den Männchen ist erkennbar, dass die Nahrungsaufnahme bei den PARK2 ko-Mäusen und den dm-YAC/PARK-Mäusen geringer war als bei den WT- und SCA3 YAC-Mäusen, jedoch zeichnete sich keine Signifikanz ab.

Bei den Weibchen hingegen war eine signifikant geringere Nahrungsaufnahme der dm-YAC/PARK-Mäuse mit  $p \leq 0,01$  zwischen den WT- und den dm-YAC/PARK-Mäusen ersichtlich. Die geringste Nahrungsaufnahme bei den

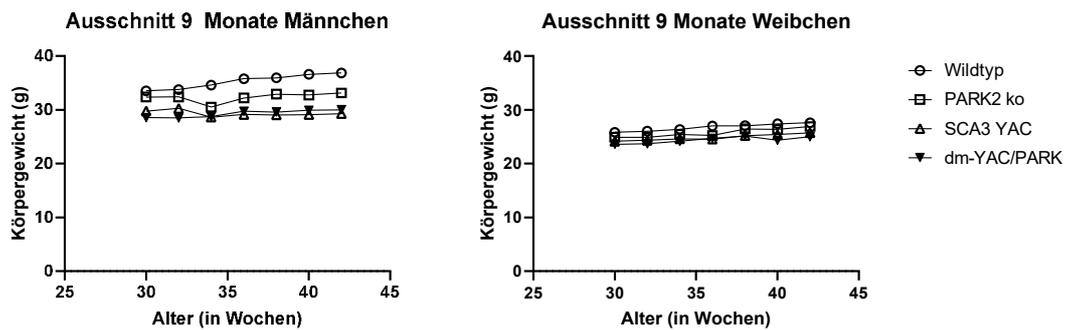
Weibchen zeigte somit die dm-YAC/PARK-Gruppe. Die dementsprechend höchste Nahrungsaufnahme war bei den WT- und SCA3 YAC-Mäusen feststellbar. Die Weibchen nahmen im Vergleich zu den Männchen durchschnittlich mehr Nahrung zu sich.

Hierzu sind in Abbildung 26 Ausschnitte des Körpergewichts jeweils für die Männchen und die Weibchen dargestellt. Erkennbar war, dass das Körpergewicht für die Männchen der WT- und PARK2 ko-Mäuse nahezu gleich war, trotz deutlich höherer Nahrungsaufnahme der WT-Gruppe, welche jedoch auch die höchste Aktivität, besonders in den ersten 15 Minuten, zeigten (Abb. 23). Das Körpergewicht der dm-YAC/PARK-Mäuse hingegen war am geringsten, was sich wie bereits beschrieben auch in der Nahrungsaufnahme widerspiegelte. Bei den Weibchen spiegelte sich die Nahrungsaufnahme der Gruppen ebenfalls im Körpergewicht wider, hier hatten die WT-Mäuse das höchste und die dm-YAC/PARK-Mäuse das geringste Körpergewicht. Bei der Flüssigkeitsaufnahme (Abb. 25B) war hingegen zu erkennen, dass die dm-YAC/PARK-Mäuse deutlich mehr Flüssigkeit aufnahmen als die anderen Gruppen. Eine signifikant höhere Flüssigkeitsaufnahme war mit  $p \leq 0,05$  zwischen den PARK2 ko- und dm-YAC/PARK-Mäusen zu erkennen. Bei den Männchen war diese Signifikanz ebenfalls vorhanden, bei den Weibchen war die Flüssigkeitsaufnahme für alle vier Genotypen jedoch ähnlich.



**Abbildung 27: Nahrungsaufnahme und Flüssigkeitsaufnahme mit 9 Monaten**

Dargestellt ist die Nahrungsaufnahme (in g) jeweils in A für beide Geschlechter (links) der Genotypen WT ( $n=16$ ), PARK2 ko ( $n=14$ ), SCA3 YAC ( $n=16$ ), dm-YAC/PARK ( $n=14$ ), für die Männchen (mitte) WT ( $n=7$ ), PARK2 ko ( $n=5$ ), SCA3 YAC ( $n=10$ ), dm-YAC/PARK ( $n=7$ ) und für die Weibchen (rechts) WT ( $n=9$ ), PARK ko ( $n=9$ ), SCA3 YAC ( $n=6$ ), dm-YAC/PARK ( $n=7$ ), sowie die Flüssigkeitsaufnahme (B, in ml) zum Testzeitpunkt 9 Monate. Signifikant geringer mit  $p \leq 0,05$  war die Nahrungsaufnahme der PARK2 ko- und dm-YAC/PARK-Mäuse im Vergleich zu den WT-Mäusen. Bei den Weibchen zeigte sich zwischen den WT- und dm-YAC/PARK-Mäusen sogar eine Signifikanz von  $p \leq 0,01$ . Und ebenfalls eine geringere Nahrungsaufnahme der dm-YAC/PARK-Mäuse im Vergleich zu den SCA3 YAC-Mäusen von  $p \leq 0,05$ . Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der Flüssigkeitsaufnahme (B) eine signifikant ( $p \leq 0,05$ ) höhere Flüssigkeitsaufnahme der PARK2 ko- und der dm-YAC/PARK-Mäuse zu den WT-Mäusen. Bei den Männchen war die Flüssigkeitsaufnahme der dm-YAC/PARK-Mäuse mit  $p \leq 0,01$  höher als die der PARK2 ko-Mäuse. Die geringste Flüssigkeitsaufnahme hatten sowohl bei den Weibchen als auch bei den Männchen die PARK2 ko-Mäuse.



**Abbildung 28: Ausschnitt Körpergewicht Männchen und Weibchen 30-42 Wochen**

Abb 28 zeigt jeweils Ausschnitte des Körpergewichts für WT, PARK2 ko, SCA3 YAC und dm-YAC/PARK im Alter von 30-42 Wochen (Zeitpunkt 9 Monate) für die Männchen (links) (WT n=14, PARK ko n=10, SCA3 YAC n=24, dm-YAC/PARK n=14) und für die Weibchen (rechts) (WT n=23, PARK ko n=14, SCA3 YAC n=19, dm-YAC/PARK n=18). Zum Testzeitpunkt von 9 Monaten gab es für beide Geschlechter keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Das Körpergewicht der WT-Mäuse war am höchsten und das Gewicht aller Weibchen war generell niedriger als das Gewicht der Männchen.

Der zweite Messzeitpunkt und somit die Kontrolle der Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme war mit 9 Monaten (Abbildung 27). Auch zu diesem Zeitpunkt wurde ein Vergleich mit dem Körpergewicht gezogen und ein dementsprechender Ausschnitt (Abbildung 28) erstellt. Abbildung 27 zeigt die Nahrungsaufnahme (in g) und die Flüssigkeitsaufnahme (in ml) der jeweiligen Genotypen (WT, PARK2 ko, SCA3 YAC, dm-YAC/PARK) während des LabMaster Tests. Innerhalb der 70 Stunden war, wie in A dargestellt, zu erkennen, dass die WT-Mäuse die höchste Nahrungsaufnahme hatten, gefolgt von den SCA3 YAC-, anschließend den PARK2 ko-Mäusen und schlussendlich den dm-YAC/PARK-Mäusen. Die PARK2 ko- und die dm-YAC/PARK-Mäuse hatten signifikant weniger Nahrung zu sich genommen im Vergleich zu den WT-Mäusen ( $p \leq 0,05$ ).

Betrachtete man ausschließlich die Weibchen war die Menge der Nahrungsaufnahme vergleichbar mit den gesamtgeschlechtlichen Ergebnissen. Für die Weibchen steigerte sich die signifikant geringere Nahrungsaufnahme der dm-YAC/PARK-Mäuse in Gegenüberstellung mit den WT-Mäusen auf  $p \leq 0,01$ , und ist außerdem signifikant mit  $p \leq 0,05$  zwischen den SCA3 YAC-Mäusen, die deutlich mehr Nahrung aufnahmen als die dm-YAC/PARK-Mäuse.

Bei den Männchen war erkennbar, dass sich die Reihenfolge hier änderte. Und zwar war die Nahrungsaufnahme zwar weiterhin am größten bei den WT-

Mäusen, danach kamen jedoch die SCA3 YAC, dm-YAC/PARK- und anschließend die PARK2 ko-Mäuse. Hier lagen jedoch keine signifikanten Unterschiede vor.

In Abbildung 28 kann man anhand des Körpergewichts ebenfalls erkennen, dass durch die verringerte Nahrungsaufnahme der männlichen PARK2 ko- und SCA3 YAC-Mäuse ein geringeres Körpergewicht vorlag (34 Wochen).

Auch bei den Weibchen war ein Einbruch des Körpergewichts der PARK2 ko-Mäuse bei 38 Wochen und ein Einbruch der dm-YAC/PARK-Mäuse bei 40 Wochen erkennbar.

Die in Abbildung 27 ebenfalls dargestellte Flüssigkeitsaufnahme (in ml) zeigte für beide Geschlechter geringe Unterschiede zwischen den Gruppen. Hier war die größte Aufnahme in der Gruppe der dm-YAC/PARK-Mäuse zu erkennen, anschließend kamen die SCA3 YAC-, die WT und letztendlich die PARK2 ko-Mäuse. Hierbei zeigten sich die dm-YAC/PARK-Mäuse signifikant ( $p \leq 0,05$ ) mit einer deutlich erhöhten Flüssigkeitsaufnahme gegenüber den WT- und den PARK2 ko-Mäusen. Auch für die Männchen war dieselbe Reihenfolge wie für beide Geschlechter festzustellen. Hier lagen jedoch größere Differenzen vor und die Signifikanz zwischen den dm-YAC/PARK- und den PARK2 ko-Mäusen nahm auf  $p \leq 0,01$  zu. Zwischen den WT und dm-YAC/PARK-Mäusen war hingegen keine Signifikanz mehr feststellbar. Bei den Weibchen glich sich die Flüssigkeitsaufnahme für alle Gruppen an und es waren keine signifikanten Unterschiede mehr feststellbar.

### 3.2.5 Zusammenfassung der Ergebnisse aus 3.2.

Tabelle 36: Zusammenfassung der Ergebnisse der Verhaltensanalyse

Durchgeführte Experimente	Ergebnisse/Zusammenfassung
3.2.1 Körpergewichtsmessung	<ul style="list-style-type: none"> <li>- anfängliche stetige Gewichtszunahme bei allen vier Genotypen</li> <li>- sowohl bei Männchen als auch Weibchen hatten die WT-Mäuse das höchste Gewicht</li> <li>- SCA3 YAC und dm-YAC/PARK-Mäuse hatten das geringste Gewicht</li> </ul> <p><b>(I) Weibchen</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- signifikante Unterschiede zeigten sich zwischen dem Gewicht der WT- und der dm-YAC/PARK-Mäuse ab der 38. Woche mit <math>p \leq 0,01</math></li> </ul> <p><b>(II) Männchen</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- ab der 22. Woche war das Körpergewicht der SCA3 YAC- und der dm YAC/PARK-Gruppe im Vergleich mit der WT-Gruppe mit <math>p \leq 0,01</math> signifikant höher</li> <li>- das Gewicht der PARK2 ko-Mäuse war ab der 22. Woche signifikant höher als das der dm-YAC/PARK-Mäuse (<math>p \leq 0,01</math>)</li> </ul>
3.2.2 RotaRod	<p><b>(I) Training</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Verbesserung der Laufzeit von Trainingstag 1 auf 2, von 2 auf 3 nur bei den WT-Mäusen bei 3 Monaten</li> <li>- bessere Laufzeit am 1. Tag mit 6 Monaten im Vergleich zu 3 Monaten</li> <li>- schlechteste Laufzeit bei SCA3 YAC-Mäusen in jedem Alter</li> </ul> <p><b>(II) Test</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- keine deutlich signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Männchen zeigten keine großen Unterschiede der Laufzeit zwischen den vier Genotypen</li> <li>- größere Schwankungen zwischen den Genotypen bei den Weibchen</li> <li>- mit 3 Monaten bei den Weibchen signifikante kürzere Laufzeit (<math>p \leq 0,01</math>) der SCA3 YAC gegenüber den dm-YAC/PARK-Mäusen</li> <li>- bei den Weibchen zu jedem Testzeitpunkt geringste Laufzeit bei SCA3 YAC-Mäusen</li> <li>- längste Laufzeit sowohl bei Männchen als auch Weibchen meistens bei PARK2 ko-Mäusen</li> </ul>
<p>3.2.3 CatWalk</p>	<p><b>A: 12 Monate</b></p> <p><b>(I) Durchschnittsgeschwindigkeit</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- für alle Genotypen um die 150 cm/s</li> <li>- Abweichungen bei den Männchen von bis zu 300 cm/s</li> </ul> <p><b>(II) Schrittzahl</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Alle Genotypen 70 bis 80 Schritte</li> <li>- SCA3 YAC-Mäuse machten die meisten Schritte</li> </ul> <p><b>(III) Regelmäßigkeitsindex</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Regelmäßigkeit zwischen 50 und 100 %</li> <li>- verminderte Regelmäßigkeit bei dm-YAC/PARK-Mäusen (beide Geschlechter)</li> </ul> <p><b>(IV) Vorderpfotenabstand</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- alle Genotypen lagen im Durchschnitt zwischen ca. 15 bis 30 cm</li> <li>- dm-YAC/PARK-Mäuse größere Unterschiede unter den Individuen und größter Abstand</li> <li>- SCA3 YAC-Mäuse kleinster Abstand</li> <li>- Männchen und Weibchen geringe Unterschiede</li> </ul> <p><b>(V) Hinterpfotenabstand</b></p>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- größere Streuung im Vergleich zu Vorderpfotenabstand (zwischen 5 bis 80 cm): durchschnittlich bei 20 bis 40 cm</li> <li>- Signifikanz von <math>p \leq 0,05</math> im Hinterpfotenabstand zwischen WT und dm-YAC/PARK</li> <li>- Pfotenabstand der dm-YAC/PARK-Mäuse war signifikant größer im Vergleich zwischen SCA3 YAC-Mäusen (<math>p \leq 0,05</math>) und PARK2 ko-Mäusen (<math>p \leq 0,05</math>) und zu den WT-Mäusen (<math>p \leq 0,01</math>)</li> </ul> <p><b>(VI) Schrittzyklus</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- zwischen 0,1 und 0,5 Sekunden</li> <li>- Geringfügige Unterschiede zwischen den Genotypen</li> <li>- bei dm-YAC/PARK-Mäusen am geringsten links und rechts</li> <li>- keine Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen links</li> <li>- signifikanter Unterschied mit <math>p \leq 0,05</math> der Dauer des Schrittzyklus rechts zwischen den SCA3 YAC-Mäusen und den dm-YAC/PARK-Mäusen</li> <li>- längsten Schrittzyklus hatten bei den Weibchen die PARK2 ko-Mäuse und bei den Männchen die SCA3 YAC-Mäuse</li> </ul> <p><b>(VII) Abdruckbereich</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- größere Unterschiede der Hinterpfoten im Vergleich zu den Vorderpfoten bei allen vier Genotypen</li> <li>- WT-Mäuse bei Hinterpfoten am größten, dm-YAC/PARK-Mäuse am geringsten</li> <li>- keine Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen links</li> <li>- große Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen rechts</li> </ul>
--	---

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- bei den Weibchen war der Abdruckbereich der Vorderpfote rechts bei den PARK2 ko-Mäusen am größten, im Vergleich zur dm-YAC/PARK-Gruppe mit einer Signifikanz von <math>p \leq 0,01</math> größer</li> <li>- kleinster Abdruckbereich zeigte sich bei den dm-YAC/PARK-Mäusen, der im Vergleich zu den WT-Mäusen signifikant (<math>p \leq 0,01</math>) war</li> <li>- signifikant hohe Werte der WT-Mäuse im Vergleich zu den SCA3 YAC-Mäusen und den dm-YAC/PARK-Mäusen (jeweils <math>p \leq 0,01</math>)</li> </ul> <p><b>B: 15 Monate</b></p> <p><b>(I) Durchschnittsgeschwindigkeit</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- bei allen Genotypen ca. 150 cm/s</li> </ul> <p><b>(II) Schrittzahl</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- durchschnittlich 70 bis 80 Schritte</li> </ul> <p><b>(III) Regelmäßigkeitsindex</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- große Varianz in der Regelmäßigkeit</li> <li>- größte Regelmäßigkeit zeigen die PARK2 ko-Mäuse zu den WT-Mäusen mit einer Signifikanz von <math>p \leq 0,01</math></li> <li>- deutlich geringere Regelmäßigkeit im Vergleich PARK2 ko zu dm-YAC/PARK zeigten die dm-YAC/PARK-Mäuse mit einer Signifikanz von <math>p \leq 0,001</math> gegenüber den PARK2 ko-Mäusen</li> <li>- geringste Regelmäßigkeit hatten die SCA3 YAC-Mäuse im Vergleich der SCA3 YAC-Mäusen zu den dm-YAC/PARK-Mäusen mit einer Signifikanz von <math>p \leq 0,05</math></li> <li>- geringste Regelmäßigkeit sowohl bei Männchen als auch Weibchen bei SCA3 YAC-Mäusen</li> </ul> <p><b>(IV) Vorderpfotenabstand</b></p>
--	---

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- bei allen Genotypen ca. 10 bis 40 cm, keine großen Unterschiede zwischen den vier Genotypen</li> <li>- Pfotenabstand war bei den WT- und dm-YAC/PARK-Mäusen geringfügig kleiner als bei den PARK2 ko- und SCA3 YAC-Mäusen</li> <li>- keine Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen feststellbar</li> </ul> <p><b>(V) Hinterpfotenabstand</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Hinterpfotenabstand deutlich größer als der Vorderpfotenabstand</li> </ul> <p><b>(VI) Schrittzklus</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Spanne von 0,1 bis 0,6 Sekunden</li> <li>- Schrittzklus der dm-YAC/PARK-Mäuse mit <math>p=0,0601</math> nahe am signifikanten Bereich und somit auffällig länger als der Schrittzklus der SCA3 YAC-Mäuse</li> <li>- bei der linken Hinterpfote bei den Männchen waren die Werte der PARK2 ko-Mäuse signifikant (<math>p \leq 0,05</math>) höher als die der SCA3 YAC-Mäuse</li> <li>- Bei der rechten Hinterpfote waren die Werte der Männchen und Weibchen ähnlich</li> <li>- rechts geringster Schrittzklus war bei den WT-Mäusen erkennbar und der größte bei den SCA3 YAC-Mäusen</li> </ul> <p><b>(VII) Abdruckbereich</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- den geringsten Abdruckbereich zeigten die SCA3 YAC-Mäuse</li> <li>- AB der SCA3 YAC-Mäuse im Vergleich zu PARK2 ko-Mäusen mit einer Signifikanz von <math>p \leq 0,01</math> geringer und im Vergleich mit den dm-YAC/PARK-Mäusen mit einer Signifikanz von <math>p \leq 0,05</math> geringer</li> </ul>
--	---

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- bei der Hinterpfote waren geringere Werte bei den SCA3 YAC-Mäusen im Vergleich zu den anderen Gruppen feststellbar</li> <li>- Signifikanz zwischen den SCA3 YAC-Mäusen und den PARK2 ko-Mäusen von <math>p \leq 0,01</math></li> <li>- größter Abdruckbereich mit ca. 12 cm<sup>2</sup> bei der linken Vorderpfote hatten die dm-YAC/PARK-Mäuse und bei der linken Hinterpfote die PARK2 ko-Mäuse</li> <li>- linke Vorder- und Hinterpfote ähnlich große Fächerung der Werte wie die Männchen (besonders WT- und SCA3 YAC)</li> <li>- Abdruckbereich der dm-YAC/PARK-Mäuse ist bei den Männchen deutlich vergrößert</li> <li>- Sehr kleine Abdruckbereiche vor allem bei den Männchen zeigten die SCA3 YAC-Mäuse</li> <li>- die größten Werte für die Weibchen sowohl für die linke Vorder- als auch Hinterpfote bei den PARK2 ko-Mäusen</li> <li>- SCA3 YAC-Mäuse bei der rechten Vorderpfote den kleinsten Abdruckbereich (ca. 5 cm<sup>2</sup>)</li> <li>- größter Abdruckbereich bei den PARK2 ko-Mäusen mit ca. 12 cm<sup>2</sup></li> <li>- rechte Hinterpfote im Vergleich der PARK2 ko-Mäuse zu den SCA3 YAC-Mäusen signifikant geringerer Abdruckbereich mit <math>p \leq 0,05</math> bei den SCA3 YAC-Mäusen und allgemein auch der geringste von allen Gruppen</li> <li>- PARK2 ko- zu den WT-Mäusen war ebenfalls ein vergrößerter Abdruckbereich der PARK2 ko-Mäuse mit einer Signifikanz von <math>p \leq 0,05</math></li> </ul>
--	---

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- bei den Männchen war der längste Schrittzklus der rechten Vorderpfote bei den dm-YAC/PARK-Mäusen, bei den Weibchen bei den WT-Mäusen</li> <li>- bei den Männchen: dm-YAC/PARK-Mäuse größter Abdruckbereich der rechten Vorderpfote</li> <li>- bei den Weibchen: PARK2 ko-Mäuse</li> <li>- bei den Männchen dm-YAC/PARK-Mäuse großer Abdruckbereich (ca. 12 cm<sup>2</sup>), bei den Weibchen jedoch ein vergleichbar kleiner AB (ca. 5 cm<sup>2</sup>)</li> </ul>
<p>3.2.4 LabMaster</p>	<p><b>(I) Horizontale Aktivität</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- WT-Mäuse die meisten Bewegungen/min</li> <li>- signifikant mehr als die PARK2 ko- und SCA3 YAC-Mäuse (<math>p \leq 0,05</math>).</li> <li>- PARK2 ko und SCA3 YAC-Mäuse lösten die wenigsten Lichtsignale aus und zeigten somit die geringste Bewegung im Käfig</li> </ul> <p><b>(II) Vertikale Aktivität</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- hohe Varianz der Individuen</li> <li>- Bewegungen/min der WT-Mäuse und der dm-YAC/PARK-Mäuse am höchsten</li> </ul> <p><b>(III) Totale zurückgelegte Distanz im Käfig</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Distanz (Bewegung/min) lösten die WT-Mäuse signifikant mehr Lichtquellen als die PARK2 ko-Mäuse (<math>p \leq 0,05</math>) aus</li> <li>- Unterschied zwischen den PARK2 ko-, SCA3 YAC- und dm-YAC/PARK-Mäusen war hingegen gering</li> </ul> <p><b>(IV) Angstverhalten</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- WT-Mäuse zeigten größte Aktivität</li> <li>- PARK2 ko-Mäuse zeigten geringste Aktivität</li> <li>- SCA3 YAC und dm-YAC/PARK-Mäuse lagen nah beieinander</li> </ul> <p><b>(V) Nahrungsaufnahme</b></p>

	<ul style="list-style-type: none"><li>- weniger Nahrungsaufnahme durch die PARK2 ko und dm-YAC/PARK Mäuse im Vergleich zu den WT-Mäusen</li></ul> <p><b>(VI) Flüssigkeitsaufnahme</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- mehr Flüssigkeitsaufnahme der dm-YAC/PARK-Mäuse im Vergleich zu den WT- und PARK2 ko-Mäusen</li></ul>
--	---

## **TEIL B:**

### **Untersuchung des Einflusses des Proteins Parkin auf die Protein-Level und den Phänotyp in SCA3-Patienten**

#### **3.3 Analyse des Proteins Parkin in ESMI-Probanden**

Nachdem durch Kreuzungsexperimente der Einfluss eines Parkin *knockouts* auf eine SCA3-Maus untersucht wurde, soll im nächsten Schritt der Einfluss von Parkin in der ESMI-Kohorte untersucht werden, um besonders den Einfluss von Parkin in SCA3-Patienten herauszuarbeiten.

Für alle Analysen wurde die Anzahl der Individuen in den Abbildungsunterschriften angegeben. Bei abweichender Anzahl je Gruppe ist diese auf fehlende Messergebnisse oder fehlende klinische Daten zurückzuführen.

Die Einteilung der Probanden erfolgte in folgende Gruppen: Kontrollen, ataktische Mutationsträger (MT), im Folgenden abgekürzt mit atakt. MT, und nicht ataktische MT, abgekürzt mit nicht atakt. MT. Die Einteilung erfolgte nach dem klinischen SARA-Score: (I) nicht ataktische MT mit einem SARA von 0 bis  $\leq 2,5$ , (II) ataktische MT mit einem SARA ab 3. Die Gruppe der MT setzt sich zusammen aus den nicht ataktischen und den ataktischen MT. Bei den nicht ataktischen Mutationsträgern wurden für diese Arbeit alle Probanden, die genetisch bestimmt einen verlängerten CAG-Repeat von  $\geq 55$  haben, zusammengefasst, welche jedoch zusätzlich keine klinischen Symptome im Sinne von erhöhten SARA Werten  $> 2,5$  zeigten. Dementsprechend erschienen diese Patienten ohne ataktischen Phänotyp, sind aber genotypische Mutationsträger.

In Tabelle 37 ist eine demografische und klinische Zusammenfassung der hier zugrunde liegenden Probanden der ESMI-Kohorte (Kontrollen, nicht atakt. MT, atakt. MT), für die eine Datenerhebung in dem erforderlichen Ausmaß möglich war.

Diese demografischen Informationen beziehen sich auf die Anzahl der Probanden die der jeweiligen Gruppe zugehörig waren sowie eine Aufteilung in

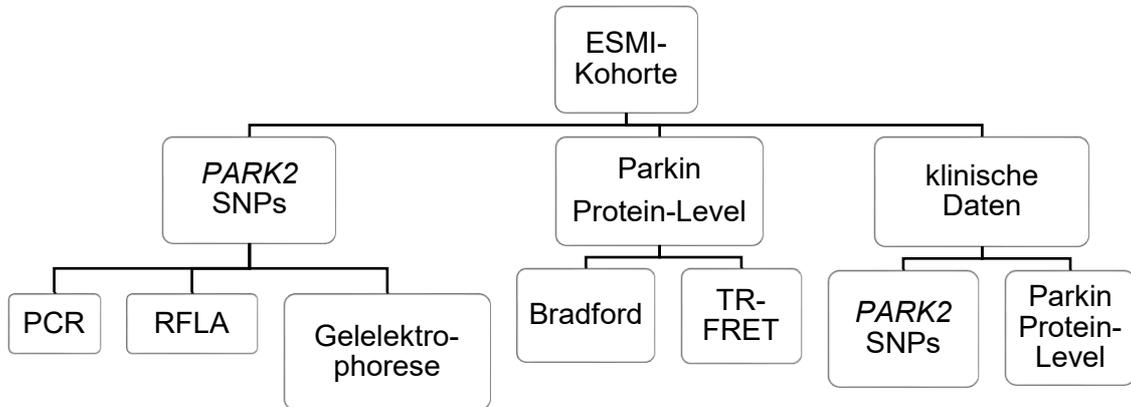
männliches und weibliches Geschlecht. Bei einigen Probanden waren keine Angaben zum Geschlecht vorhanden, diese wurden unter unbekannt zusammengefasst.

Weiterhin wurden das durchschnittliche Alter bei Probenentnahme und des Erkrankungsbeginns, also des *Age at Onset* (AAO), dargestellt. Auch die durchschnittliche CAG-Wiederholung und die Höhe des SARA- und INAS-Score wurden in der Tabelle erfasst.

Mit einer Signifikanz von  $p=0,0448$  unterscheiden sich die Kontrollen in allen Punkten (Alter bei Probenentnahme, AAO, CAG-Wiederholungsanzahl, SARA, INAS) zu den atakt. MT.

*Tabelle 37: Demografische und klinische Eigenschaften der Probanden (Kontrollen, nicht atakt. MT, atakt. MT) in der analysierten ESMI-Kohorte*

Demografische Informationen	Kontrollen	nicht atakt. MT	atakt. MT
Anzahl	115	54	235
männlich	41 % (47)	37 % (20)	49 % (114)
weiblich	49,5 % (57)	63 % (34)	45 % (106)
unbekannt	9,5 % (11)	-	6 % (15)
Alter bei Probenentnahme	46	38	51
Age at Onset (AAO)	-	-	39
CAG-Wiederholung	24,5	66	69
SARA	0,6	3	14
INAS	0,7	1,7	5

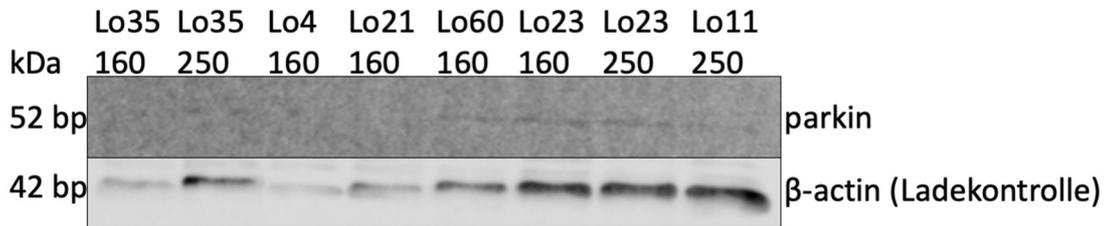


**Abbildung 29: Übersicht über die in ESMI-Probanden durchgeführten Analysen**

Das Diagramm zeigt eine kurze Übersicht der diesen Ergebnissen zugrundeliegenden durchgeführten Analysen. Zur Erhebung der Ergebnisse wurden die *PARK2* SNPs, Parkin Protein-Level und klinischen Daten in Bezug zueinander gebracht und analysiert.

In Abbildung 29 ist eine Übersicht der in den ESMI-Probanden durchgeführten molekularbiologischen und proteinbiochemischen Analysen dargestellt, welchen die Ergebnisse für die folgenden Analysen zugrunde liegen. Für diese Arbeit erfolgte die Auswertung der *PARK2* SNPs aus DNA-Proben und der Parkin Protein-Level aus PBMC-Proben in Bezug auf verschiedene Parameter (Einteilung in Kontrollen, nicht ataktische Mutationsträger (MT), ataktische MT, Geschlecht, Entnahmezentrums, *PARK2* SNP). Dabei wurde ein besonderes Augenmerk auf die Parkin Protein-Level und deren Verteilung gelegt, sowie anschließend der Zusammenhang zu klinischen Daten herausgearbeitet.

### 3.3.1 Untersuchung der Parkin Protein-Level



**Abbildung 30: Analyse der Parkin Protein-Expression in PBMCs mittels Western Blot Analyse**

In Abbildung 30 sind die Ergebnisse des Western Blots für 8 verschiedene PBMC-Proben (Lo35 160, Lo35 250, Lo4 160, Lo21 160, Lo60 160, Lo23 160, Lo23 250, Lo11 250) für Parkin und unterhalb dieser, die Ladekontrolle ( $\beta$ -actin), dargestellt. Die ersten vier Proben (Lo35 160, Lo35 250, Lo4 160, Lo21 160) zeigen Ergebnisse für niedrige Parkin Protein-Level, die letzten vier Proben (Lo60 160, Lo23 160, Lo23 250, Lo11 250) für hohe Parkin Protein-Level. Die Menge der Parkin Protein-Level wurde vorher mittels TR-FRET ermittelt. Erkennbar ist, dass sowohl für geringe als auch für hohe Parkin Proteinlevel, nur schwache Banden bei ca. 50 kDa zu sehen waren. Die Banden der hohen Parkin Protein-Level erscheinen etwas deutlicher, jedoch wurde für diese Proben auch deutlich mehr Gesamtprotein geladen, wie in der Ladekontrolle mit  $\beta$ -actin erkennbar.

Beginnend sollte die Untersuchung der Parkin Protein-Level erfolgen. Da für die Untersuchung der Parkin Protein-Level jeweils unterschiedliche Gruppen eingeteilt wurden, ändert sich die Anzahl der analysierten Proben für jeden Teil. Die Bestimmung der Parkin Proteinmenge erfolgte mittels TR-FRET (vgl. 2.2.18.). Wie bereits in 2.2.16 und 2.2.18 herausgearbeitet, musste für diese Bestimmung ein sensitiveres Verfahren gefunden werden. Zum Nachweis, dass das Verfahren des Western Blots (vgl. 2.2.16) nicht ausreichend für die Analyse des Parkin-Proteins in PBMCs ist, ist in Abbildung 30 ein exemplarisches Western Blot-Ergebnis für 8 PBMC-Proben dargestellt. Hierbei ist der Western Blot wie in 2.2.16 beschrieben durchgeführt worden. Für den Vergleich der Ergebnisse wurden die ersten vier Proben mit niedrigem Ergebnis im TR-FRET für die Menge an Parkin aufgetragen und die letzten vier Proben mit vergleichbar hoher Menge an Parkin, gemessen anhand des TR-FRETS. Erkennbar war die geringe Darstellung der Parkin-spezifischen Banden bei ca. 50 kDa, besonders für die ersten vier Proben (Lo35 160, Lo35 250, Lo4 160, Lo21 160). Dennoch war zusätzlich erkennbar, dass die Ladekontrolle für die letzten vier Proben ebenfalls deutlichere Banden zeigte und somit das Ergebnis der Bandendicke durch die eingesetzte Probenmenge verfälscht sein kann. Ungeachtet dessen ist

zu erkennen, dass selbst bei hoher Proteinmenge und gleichmäßiger Ladekontrolle, wenn man nur die Proben Lo60 160, Lo 23 160, Lo23 250 und Lo11 250 vergleicht, keine ausreichend starken Banden zur Beurteilung der jeweiligen Menge des Proteins Parkin für diese Proben durch den Western Blot darstellt. Somit sind alle weiteren aufgeführten Ergebnisse anhand des TR-FRETS gemessen und die Proben anschließend miteinander verglichen worden.

### *3.3.2 Vergleich der Parkin Protein-Level zwischen Kontrollen und Mutationsträgern*

Da nun gezeigt werden konnte, dass die Western Blot Analyse nicht ausreichend sensitiv war, um die Parkin Protein-Level in PBMCs zu bestimmen wurden im Folgenden die sensitiveren Analysen mittels TR-FRET ausgewertet.

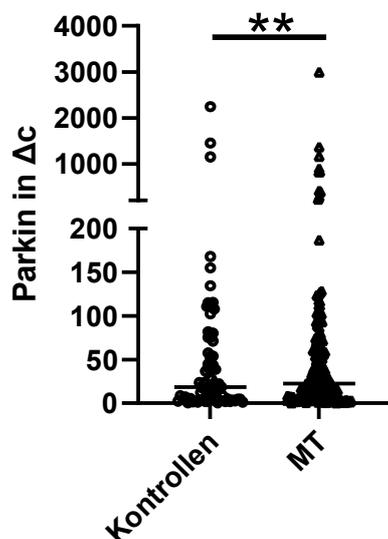
Dafür erfolgte vorerst ein Vergleich der Gruppen, in die die Probanden eingeteilt wurden (Kontrollen, nicht atakt. MT, atakt. MT), um grundlegende Unterschiede der Parkin Protein-Level zwischen diesen Gruppen zu untersuchen.

Tabelle 37 zeigt eine demografische Übersicht der Probanden und die Anzahl der Kontrollen, nicht atakt. MT und atakt. MT, für welche diese TR-FRET-Messungen durchgeführt wurden. Nicht für alle Vergleiche waren ausreichend Daten der einzelnen Probanden vorhanden, daher ist die Anzahl der Probanden jeweils der Abbildungsbeschriftungen zu entnehmen und kann im Vergleich in der Anzahl variieren. Beispielsweise waren insgesamt 79 Kontrollprobanden vorhanden, es waren jedoch nur von 72 Probanden Informationen über das Geschlecht vorhanden, daher konnten nur 38 weibliche und 34 männliche Probanden gruppiert werden. Dieser Umstand ist auf teilweise unvollständige klinische Daten zurückzuführen, weshalb in einigen Vergleichen nicht alle Probanden den jeweiligen Gruppen zugeordnet werden konnten.

Vorerst sollten die Protein-Level nur zwischen den MT und den Kontrollen verglichen werden, zur Untersuchung, ob sich bereits hier Unterschiede in der Höhe der Parkin Proteinmenge zeigten. Aufgrund der Ausreißer in den Parkin

Protein-Leveln von  $\Delta c=800$  bis  $\Delta c=4000$  wurde in den Abbildungen der Median anstatt des Mittelwerts dargestellt.

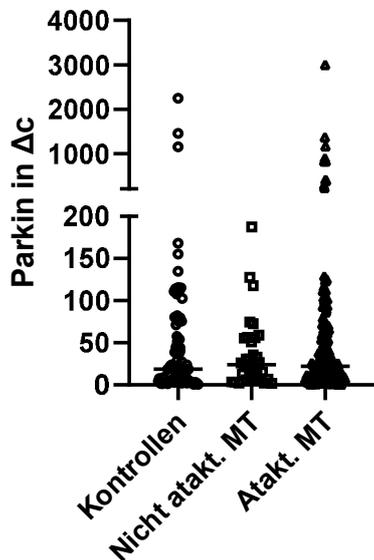
Abbildung 31 zeigt somit graphisch den Vergleich aller analysierten MT in Bezug auf die Höhe der Parkin Proteinmenge (in  $\Delta c$ ) zu den Kontrollprobanden. Hierbei war zu erkennen, dass die Protein-Level der MT mit einer Signifikanz von  $p \leq 0,01$  höhere Parkin Protein-Level aufwiesen als die der Kontrollen. Jedoch ist aufgrund der Gruppeneinteilung auch eine fast dreifach höhere Menge an Probanden bei den MT im Gegensatz zu den Kontrollen. Der Median der Kontrollen lag unterhalb von 20 mit  $\Delta c=18$  und der Median der MT oberhalb eines Parkin Protein-Levels von 20 bei  $\Delta c=22$ .



**Abbildung 31: Parkin Protein-Level im Vergleich zwischen Kontrollen und MT**

Vergleich von Parkin Proteinmenge (in  $\Delta c$ ) zwischen Kontrollen ( $n=79$ ) und MT ( $n=197$ ). Zu erkennen ist, dass die Höhe des Parkin Protein-Levels mit einer Signifikanz von  $p \leq 0,01$  für die MT leicht über der Menge Parkin im Vergleich zu den Kontrollen lag.

### 3.3.3 Vergleich der Parkin Protein-Level in Kontrollen, nicht atakt. MT und atakt. MT



**Abbildung 32: Parkin Protein-Level im Vergleich zwischen Kontrollen und nicht atakt. MT und atakt. MT**

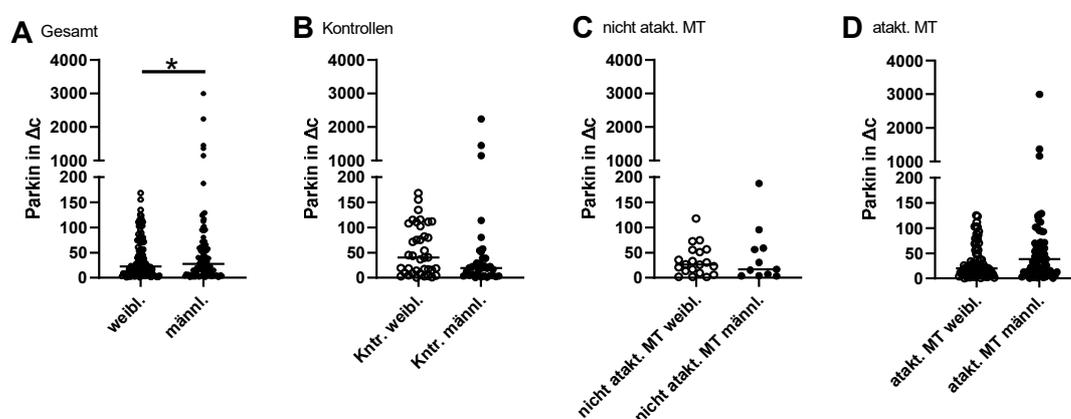
Erkennbar ist, dass die Menge an Parkin (in  $\Delta c$ ) für die nicht atakt. MT ( $n=33$ ) am niedrigsten, also unter  $\Delta c=50$  lag, für die atakt. MT ( $n=164$ ) höher, jedoch noch unter der durchschnittlichen Menge an Parkin der Kontrollen ( $n=79$ ).

Daher sollte im Anschluss untersucht werden, ob dieser signifikante Unterschied zwischen den Kontrollen und den MT auch noch besteht, sofern die nicht atakt. MT und die atakt. MT getrennt voneinander analysiert werden. Diese Unterscheidung war notwendig, da die nicht atakt. MT zwar eine genotypische Veränderung aufwies, jedoch noch keine phänotypische Ausprägung in der klinischen Analyse zeigten. Jedoch sollte eine Unterscheidung der zwei Gruppen stattfinden, um herauszufinden, ob die Parkin Proteinmenge einen möglichen Aufschluss darüber geben kann zu welchem Zeitpunkt eine klinische Ausprägung bei bisher nicht atakt. MT stattfinden wird.

Der Vergleich zwischen Kontrollen, nicht ataktischen MT und ataktischen MT (Abb. 32) zeigte keine Signifikanzen im Vergleich zu der Gegenüberstellung zwischen Kontrollen und allen MT, wie in Abb. 31 dargestellt. Abbildung 32 zeigt, dass die Protein-Level für die Kontrollen (Median  $\Delta c=18$ ) ebenfalls unterhalb der nicht atakt. (Median  $\Delta c=23$ ) und atakt. MT (Median  $\Delta c=21$ ) lagen.

Übereinstimmend mit den signifikant geringeren Werten der Kontrollen im Vergleich zu den MT konnte nun zusätzlich gezeigt werden, dass die Parkin Protein-Level der nicht atakt. MT im Median geringfügig höher waren als die Parkin Protein-Level der atakt.MT., signifikant war dieser Unterschied jedoch nicht. Zu beachten ist jedoch, dass es sowohl bei den Kontrollen als auch den atakt. MT einige Ausreißer mit Werten  $\Delta c > 800$  gab.

### 3.3.4 Vergleich der Parkin Protein-Level zwischen Männern und Frauen



**Abbildung 33: Parkin Protein-Level im Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Probanden**

Das Diagramm zeigt die Höhe der Parkin Proteinlevel im Vergleich zwischen Männern zu Frauen. Hierbei zeigt A die Parkin Proteinmenge aller Männer ( $n=120$ ) und Frauen ( $n=138$ ). B den Vergleich zwischen den männlichen ( $n=34$ ) und weiblichen ( $n=38$ ) Kontrollen. C zwischen den männlichen ( $n=11$ ) und weiblichen ( $n=20$ ) nicht ataktischen MT und D zwischen den männlichen ( $n=75$ ) und weiblichen ( $n=80$ ) atakt. MT. Abb. A zeigt signifikant höhere Parkin Protein-Level und eine größere Streuung der Proteinmenge für die Männer im Vergleich zu den Frauen ( $p \leq 0,05$ ). Für die Kontrollen war  $\Delta c$  jedoch bei den weiblichen Kontrollen größer als bei den männlichen Kontrollen (Abb. B). Ebenso stellte es sich für die weiblichen nicht ataktischen MT gegenüber den männlichen nicht ataktischen MT dar (Abbildung 33C). In Abb. D zeigte sich ein niedriger  $\Delta c$  Wert für die weiblichen atakt. MT im Gegensatz zu den männlichen atakt. MT.

Um auszuschließen, dass es sich lediglich um geschlechterspezifische Unterschiede handle, die nicht in Zusammenhang mit der Glutamin-Repeat-Länge in ATXN3 stehen, wurde eine Einteilung in männliche und weibliche Probanden erstellt (Abbildung 33). Diese Einteilung erfolgte einmal für alle Probanden (A) und wurde danach auch jeweils für männliche und weibliche Kontrollen (B), männliche und weibliche nicht atakt. Probanden (C) und männliche und weibliche atakt. MT (D) durchgeführt.

Hierbei war erkennbar, dass im Vergleich zwischen allen Probanden die weiblichen Probanden signifikant ( $p \leq 0,05$ ) niedrigere Werte aufwiesen, im Gegensatz zu den männlichen (A). Dieser Zusammenhang war bereits in früheren Analysen (vgl. Dissertation von Dr. Patrik Pelz) mit einer geringeren Anzahl an Probanden in unseren Daten erkennbar gewesen. Im Gegensatz dazu lagen die Werte der Parkin Protein-Level für die weiblichen Kontrollen und die weiblichen nicht atakt. MT jedoch oberhalb derer für die männlichen Kontrollen und die männlichen nicht atakt. MT. Lediglich für die atakt. MT waren die Werte der weiblichen unterhalb derer der männlichen. Für alle getrennt betrachteten Gruppen wiesen die Werte jedoch keine signifikanten Unterschiede mehr auf.

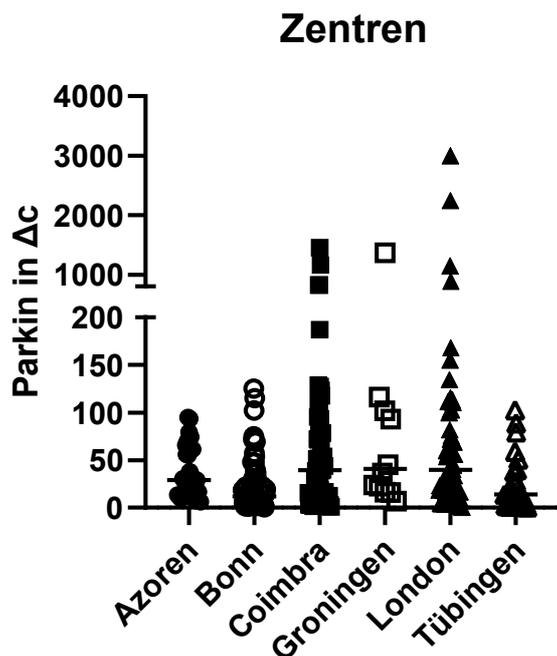
### *3.3.5 Vergleich der Parkin Protein-Level zwischen und innerhalb der Entnahmezentren (Azoren, Bonn, Coimbra, Groningen/Nijmegen, London, Tübingen)*

Nachdem die Parkin Protein-Level bezüglich der Einteilung nach dem SARA-Score und dem Geschlecht erfolgte, sollte ein zusätzlicher Rückschluss auf das jeweilige Entnahmezentrum (Azoren, Bonn, Coimbra, Groningen/Nijmegen, London, Tübingen) und demzufolge spezifische Unterschiede in den Protein-Leveln untersucht werden.

Tabelle 38 ist die jeweilige Anzahl der Probanden der einzelnen Zentren zu entnehmen, sowie die Probenanzahl nach Aufteilung in Kontrollen, nicht ataktische MT, ataktische MT und die Geschlechter (männlich, weiblich).

Tabelle 38: Anzahl Probanden für einzelne Zentren, aufgeteilt in Kontrollen, nicht atakt. MT und atakt. MT

Zentrum	Anzahl PBMC- Proben Gesamt	Probanden	Gesamt	Weiblich	Männlich
Azoren	25	Kontrolle	0	0	0
		Nicht atakt. MT	7	5	2
		Atakt. MT	18	10	8
Bonn	59	Kontrolle	23	9	14
		Nicht atakt. MT	9	6	3
		Atakt. MT	27	11	16
Coimbra	56	Kontrolle	11	8	3
		Nicht atakt. MT	40	17	23
		Atakt. MT	5	2	3
Groningen/ Nijmegen	12	Kontrolle	0	0	0
		Nicht atakt. MT	12	4	8
		Atakt. MT	0	0	0
London	68	Kontrolle	27	15	12
		Nicht atakt. MT	39	25	14
		Atakt. MT	2	2	0
Tübingen	33	Kontrolle	11	6	5
		Nicht atakt. MT	17	12	5
		Atakt. MT	5	2	3



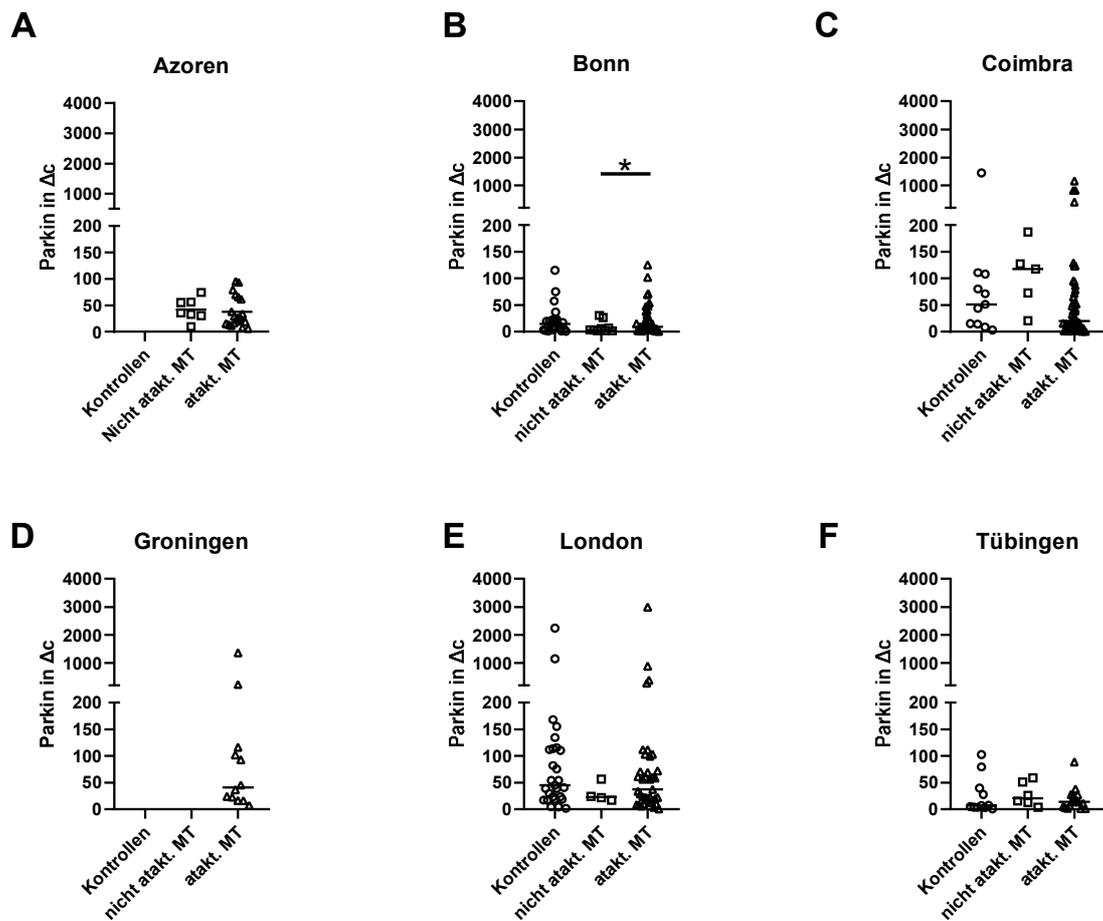
**Abbildung 34: Vergleich der Parkin Protein-Level der Probanden aller Entnahmezentren**

Zur Übersicht der Parkin Protein-Level sind alle Zentren mit der Gesamtanzahl der Proben dargestellt worden, wie in Tabelle 38 aufgeführt. Dementsprechend wurden für die Azoren (n=25), Bonn (n=59), Coimbra (n=56), Groningen/Nijmegen (n=12), London (n=68), Tübingen (n=33) PBMC-Proben eingeschlossen. Alle Zentren im Vergleich zeigten ein ähnliches Bild mit wenigen Ausreißern zwischen  $\Delta c=800-4000$  in Coimbra, London und Groningen/Nijmegen. Der Median von Coimbra, Groningen/Nijmegen und London zeigte mit  $\Delta c=40$  die höchsten Parkin Protein-Level. Geringfügig geringere Parkin Protein-Level wurden auf den Azoren mit einem Median von  $\Delta c=30$  gemessen. Die niedrigsten Protein-Level konnten in Bonn mit einem Median von  $\Delta c=12$  und Tübingen ( $\Delta c=15$ ) gemessen werden.

Da nicht auszuschließen ist, dass trotz der standardisierten Verfahren der ESMI-Kohorte Unterschiede in den Zentren auftreten, war es wichtig zu wissen, ob sich die Ergebnisse für die Zentren unterscheiden.

Vergleicht man jedoch, wie in Abbildung 35 dargestellt, alle Zentren der ESMI-Kohorte nebeneinander mit allen Probanden (Kontrollen, nicht atakt. MT und atakt. MT) konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Zentren festgestellt werden. Der Median aller Zentren belief sich auf Werte unterhalb von  $\Delta c=50$ . Dabei hatten Coimbra, Groningen/Nijmegen und London einen Median von  $\Delta c=40$ , auf den Azoren war der Median geringfügig kleiner mit  $\Delta c=30$ . In Tübingen und Bonn war der Median am geringsten, in Bonn mit  $\Delta c=12$  und Tübingen mit  $\Delta c=15$ . Für die Zentren Coimbra, London und

Groningen/Nijmegen konnten Ausreißer mit Werten von  $\Delta c=800$  bis  $\Delta c=4000$  festgestellt werden. Teilt man die Probanden innerhalb der Zentren in Kontrollen, nicht atakt. MT und atakt. MT wie in Abbildung 35 auf, ist erkennbar, dass diese Ausreißer lediglich bei den Kontrollen oder ataktischen MT zu finden waren. Hierbei überwog die Anzahl der Ausreißer für die atakt. MT gegenüber den Kontrollen. Weiterhin zeigten die Parkin Protein-Level für Bonn signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ) zwischen den nicht atakt. MT und den atakt. MT. Für Coimbra (C) lagen die Werte der nicht ataktischen MT bei einem Median von  $\Delta c=115$ , am höchsten, gefolgt von den Kontrollen bei  $\Delta c=50$  und den atakt. MT mit  $\Delta c=20$ . Bei den in London (E) entnommenen Proben war die Parkin Proteinmenge für die Kontrollen am höchsten ( $\Delta c=45$ ), gefolgt von den nicht atakt. MT ( $\Delta c=39$ ) und den atakt. MT ( $\Delta c=22$ ). Die in Coimbra und London entnommenen Proben zeigten eine weitere Streuung der Parkin Proteinwerte im Vergleich zu den anderen Zentren. In Tübingen (F), wie in Bonn (B), waren die Werte der Kontrollen mit einem Median von  $\Delta c=15$  in Bonn und  $\Delta c=7$  in Tübingen sehr niedrig. Die der ataktischen MT aus Tübingen lagen bei  $\Delta c=15$  und die der nicht ataktischen MT am höchsten bei einem Median von  $\Delta c=21$ . Für die Azoren (A) konnten keine Kontrollen mit einbezogen werden, da dort das Einverständnis zur Untersuchung der gesunden Kontrollen durch die zuständige Ethikkommission nicht vorlag. Die Werte der nicht ataktischen MT ( $\Delta c=26$ ) lagen geringfügig oberhalb der Werte der atakt. MT ( $\Delta c=29$ ). In Groningen/Nijmegen (D) konnten weder für Kontrollen noch für nicht atakt. MT, Probanden gefunden werden. Die Werte für die atakt. MT lagen bei  $\Delta c=40$ .



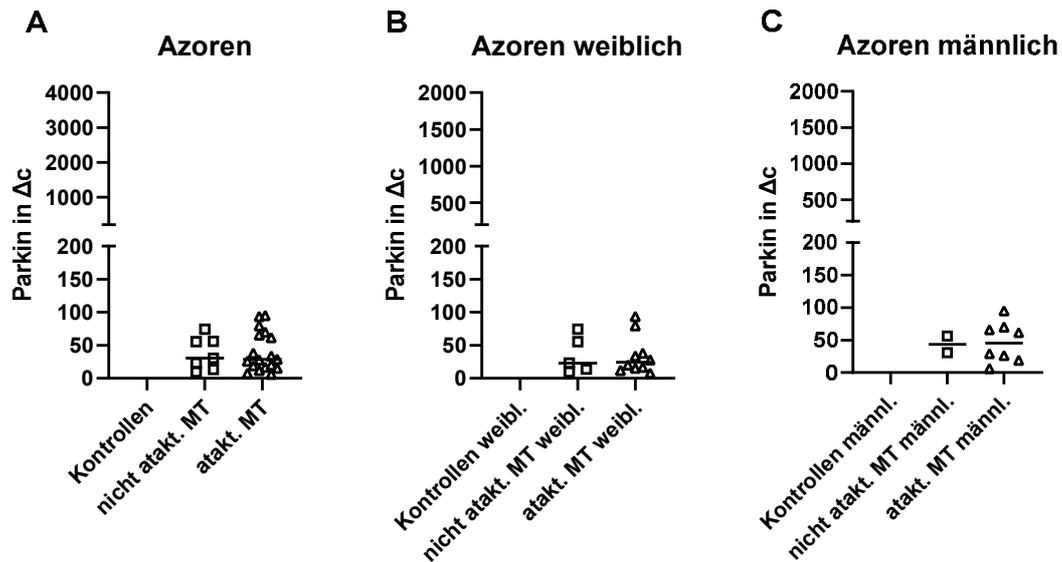
**Abbildung 35: Übersicht Parkin Protein-Level der einzelnen Zentren mit Kontrollen, nicht atakt. MT und atakt. MT**

Dargestellt wurden für alle Zentren einzeln jeweils die Parkinwerte in  $\Delta c$  für die Kontrollen, nicht atakt. MT und atakt. MT. Hierbei war in (B) ein signifikant höherer Parkinwert der atakt. MT ( $n=9$ ) ( $p \leq 0,05$ ) aus Bonn gegenüber den nicht atakt. MT ( $n=27$ ) aus Bonn erkennbar. In (C) lagen die Werte der nicht atakt. MT ( $n=5$ ) für Coimbra am höchsten, vor den Kontrollen ( $n=11$ ) und den atakt. MT ( $n=40$ ). In (E) waren ebenfalls die Werte der in London gemessenen Kontrollen ( $n=27$ ) die höchsten, folgend der Werte der nicht atakt. MT ( $n=4$ ) und der atakt. MT ( $n=39$ ). Tübingen (F) hatte die höchsten Werte bei den nicht atakt. MT ( $n=5$ ), die geringsten Werte für die Kontrollen ( $n=11$ ) und dazwischen lagen die atakt. MT ( $n=17$ ). Für die Azoren (A) konnten keine Kontrollen mit in die Auswertung aufgenommen werden ( $n=0$ ). Somit lagen die Werte der nicht atakt. MT ( $n=7$ ) höher als die der atakt. MT ( $n=18$ ). In Groningen (D) konnten ausschließlich atakt. MT ( $n=12$ ) in die Auswertung aufgenommen werden, Proben von Kontrollen ( $n=0$ ) und nicht atakt. MT ( $n=0$ ) lagen nicht vor. Die Ausreißer mit Werten von  $\Delta c=800$  bis  $4000$  waren ausschließlich für die Kontrollen oder ataktischen MT festzustellen. Hierbei überwog die Anzahl der Ausreißer für die ataktischen MT.

Zudem sollte für jedes Zentrum weiterhin untersucht werden, ob sich Unterschiede zwischen den Kontrollen, nicht atakt. MT und atakt. MT sowie zwischen den männlichen und weiblichen Probanden darstellten, die in den vorherigen Analysen nicht aufgefallen waren.

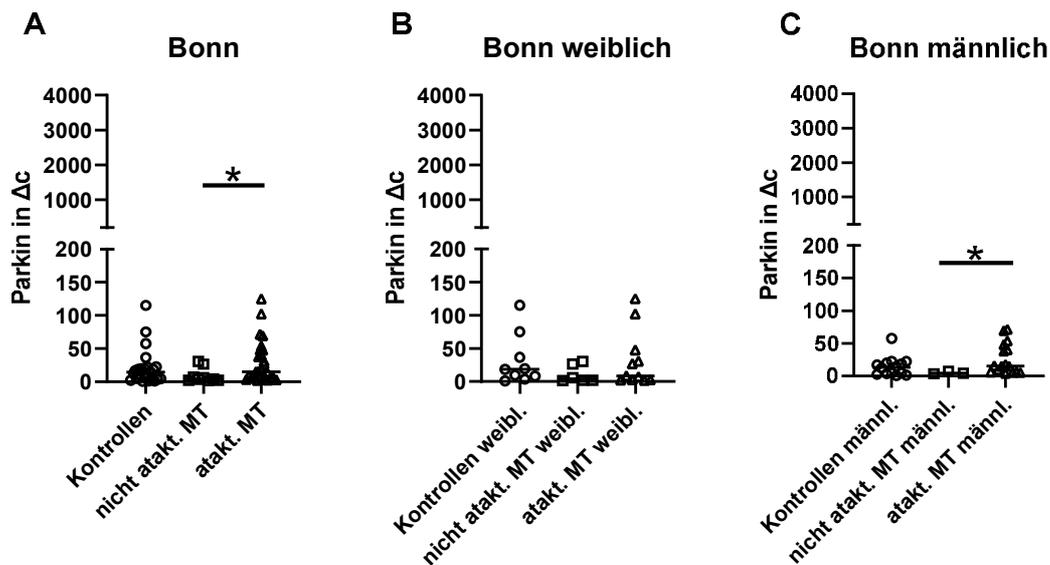
Wie in Abbildung 36 zu erkennen ist, gab es für die Azoren keine Kontrollprobanden. Die Parkin Proteinwerte in  $\Delta c$  zeigten durchschnittlich höhere

Werte für die nicht ataktischen MT als für die ataktischen MT. Der Median zeigte vergleichbar hohe Werte und bezogen auf die weiblichen nicht ataktischen MT ( $\Delta c=55$ ) und ataktischen MT ( $\Delta c=20$ ) und bei den männlichen nicht ataktischen MT ( $\Delta c=43$ ) und ataktischen MT ( $\Delta c=45$ ) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in ihrer Parkin Proteinmenge.



**Abbildung 36: Vergleich der Parkin Protein-Level Azoren: Kontrollen, nicht ataktische MT und ataktische MT**

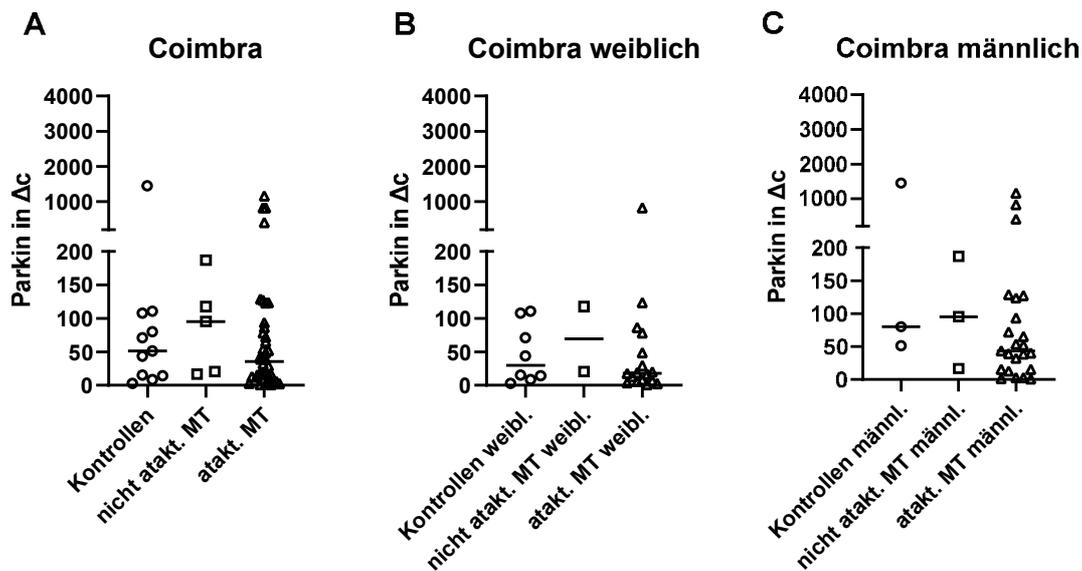
(A) zeigt die Menge Parkin in  $\Delta c$  für die Kontrollen ( $n=0$ ), nicht ataktischen MT ( $n=7$ ) und ataktischen MT ( $n=20$ ). In (B) wurde die Parkinmenge nur für die weiblichen Probanden: Kontrollen ( $n=0$ ), nicht ataktische MT ( $n=3$ ) und ataktische MT ( $n=12$ ) dargestellt. In (C) nur für die männlichen Probanden: Kontrollen ( $n=0$ ), nicht ataktische MT ( $n=2$ ) und ataktische MT ( $n=8$ ). In allen Diagrammen lagen die Werte der nicht ataktischen MT und ataktischen MT nah beieinander, die der männlichen Probanden waren geringfügig höher als die der weiblichen MT.



**Abbildung 37: Vergleich der Parkin Protein-Level Bonn: Kontrollen, nicht ataktische MT und ataktische MT**

(A) zeigt die Menge Parkin in  $\Delta c$  für die Kontrollen ( $n=23$ ), nicht atakt. MT ( $n=9$ ) und atakt. MT ( $n=33$ ). In (B) wurde die Parkinmenge nur für die weiblichen Probanden: Kontrollen ( $n=9$ ), nicht atakt. MT ( $n=7$ ) und atakt. MT ( $n=10$ ) dargestellt. In (C) nur für die männlichen Probanden: Kontrollen ( $n=14$ ), nicht atakt. MT ( $n=2$ ) und atakt. MT ( $n=17$ ). In (A) zeigte sich, dass die atakt. MT höhere Werte mit einer Signifikanz von  $p \leq 0,05$  gegenüber den nicht atakt. MT aufwiesen. Auch die männlichen Probanden zeigten für diesen Sachverhalt eine Signifikanz von  $p \leq 0,05$ . Im Vergleich waren alle erhobenen Parkinwerte für Bonn bei einem sehr geringen Level. Die Werte der Kontrollen lagen für alle Auswertungen in Bonn am höchsten und die der nicht ataktischen MT am niedrigsten.

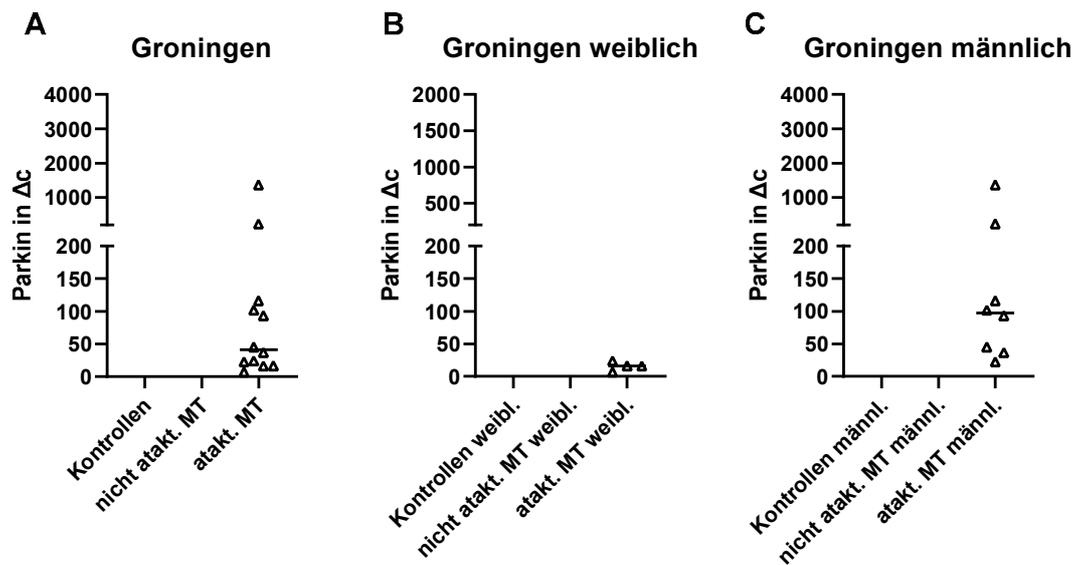
Abbildung 37 zeigt die Parkin Protein-Level für alle in Bonn entnommenen Proben. Hier war erkennbar, dass die Parkin Protein-Level geringe Werte von  $\Delta c < 20$  aufwiesen. Zwischen den nicht atakt. MT ( $\Delta c = 3$ ) und den atakt. MT ( $\Delta c = 8$ ) in (A) waren die Werte der atakt. MT mit einer Signifikanz von  $p \leq 0,05$  höher als die der nicht ataktischen MT. Die Werte der Kontrollen waren im Durchschnitt die höchsten. Auch für die weiblichen (B) und männlichen (C) Proben war dieses Muster festzustellen. Bei den männlichen Probanden waren ebenfalls mit einer Signifikanz von  $p \leq 0,05$  die Werte der atakt. MT höher als die der nicht atakt. MT.



**Abbildung 38: Vergleich der Parkin Protein-Level Coimbra: Kontrollen, nicht ataktische MT und ataktische MT**

(A) zeigt die Menge Parkin in  $\Delta c$  für die Kontrollen ( $n=11$ ), nicht ataktischen MT ( $n=5$ ) und ataktischen MT ( $n=45$ ). In (B) wurde die Parkin Proteinmenge nur für die weiblichen Probanden: Kontrollen ( $n=8$ ), nicht ataktische MT ( $n=2$ ) und ataktische MT ( $n=17$ ) dargestellt. In (C) nur für die männlichen Probanden: Kontrollen ( $n=3$ ), nicht ataktische MT ( $n=2$ ) und ataktische MT ( $n=24$ ). Coimbra zeigte Ausreißer sowohl für die männlichen Kontrollen ( $n=1$ ), als auch die männlichen ataktischen MT ( $n=3$ ) mit Werten zwischen 800 und 2000. Die niedrigsten Werte lagen bei den atakt. MT und die höchsten Werte bei den nicht atakt. MT, sowohl für die weiblichen als auch die männlichen Probanden.

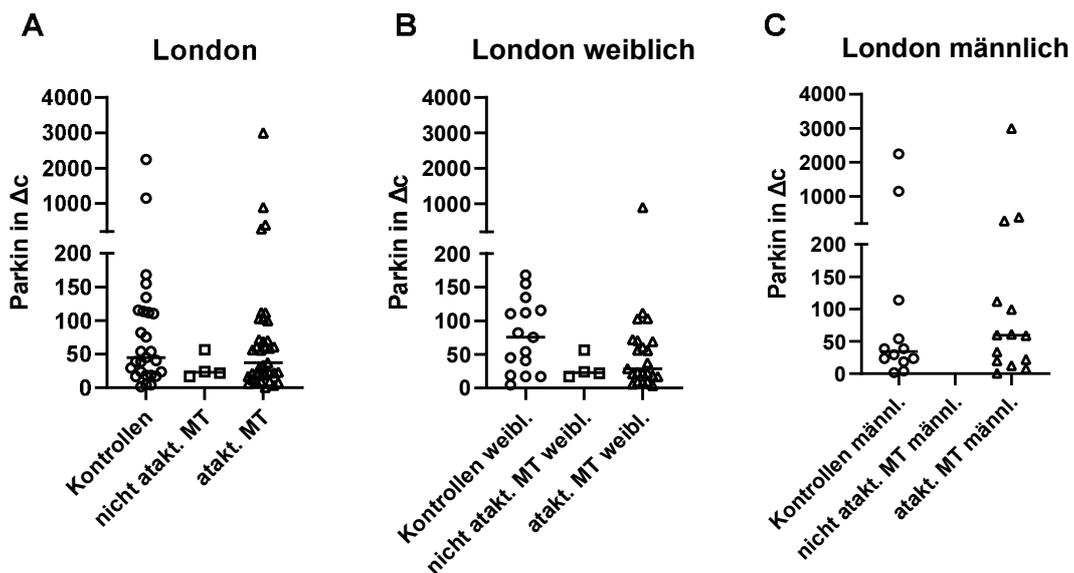
Die Parkin Protein-Level der in Coimbra genommenen Proben (Abbildung 38) zeigten eine weite Streuung der Werte. Für die Kontrollen und die ataktischen MT gab es  $n=5$  Ausreißer mit Werten zwischen  $\Delta c=800$  bis 40000. Hierbei waren bis auf einen Wert alle Ausreißer, der einer weiblichen (B) atakt. MT-Probe zuzuordnen war, bei den männlichen (C) Proben aufzufinden:  $n=3$  bei den männlichen atakt. MT und  $n=1$  bei den männlichen Kontrollen. Sowohl für alle Proben als auch die geschlechtsgetrennte Betrachtung waren die Werte für die atakt. MT am geringsten, gefolgt von den Kontrollen. Die höchsten Werte waren bei den nicht atakt. MT ( $n=5$ ) zu finden.



**Abbildung 39: Vergleich der Parkin Protein-Level Groningen: Kontrollen, nicht ataktische MT und ataktische MT**

(A) zeigt die Menge Parkin in  $\Delta c$  für die Kontrollen ( $n=0$ ), nicht ataktischen MT ( $n=0$ ) und ataktischen MT ( $n=12$ ). In (B) wird die Parkinmenge nur für die weiblichen Probanden: Kontrollen ( $n=0$ ), nicht ataktische MT ( $n=0$ ) und ataktische MT ( $n=4$ ) dargestellt. In (C) nur für die männlichen Probanden: Kontrollen ( $n=0$ ), nicht ataktische MT ( $n=0$ ) und ataktische MT ( $n=8$ ). Die Werte der männlichen ataktischen Probanden lagen im Mittel oberhalb der Werte der weiblichen Probanden. Bei den männlichen waren zusätzlich 2 Ausreißer mit Protein-Messwerten  $>\Delta c = 800$  zu erkennen.

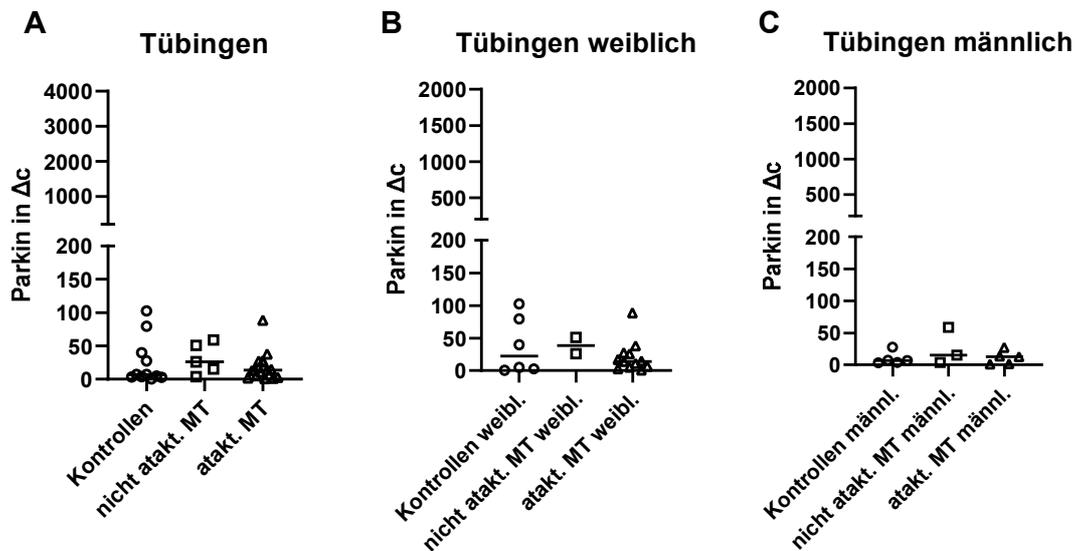
Leider konnten nicht für alle Zentren sowohl Proben von Kontrollen als auch von nicht atakt. MT erhoben werden. In Groningen/Nijmegen konnten ausschließlich Proben von atakt. MT gewonnen werden. Wie in Abbildung 39 dargestellt war bei den Parkin Protein-Level der in Groningen/Nijmegen erhobenen Proben erkennbar, dass hier die Werte für die männlichen mit einem Median von  $\Delta c=100$  deutlich gestreuter und oberhalb denen der weiblichen Probanden lagen, bei denen der Median etwa bei  $\Delta c=15$  lag. Zwei Ausreißer bei den männlichen Probanden wiesen hingegen auch Werte zwischen 800 und 2000 auf.



**Abbildung 40: Vergleich der Parkin Protein-Level London: Kontrollen, nicht ataktische MT und ataktische MT**

(A) zeigt die Menge Parkin in  $\Delta c$  für die Kontrollen ( $n=27$ ), nicht ataktischen MT ( $n=4$ ) und ataktischen MT ( $n=37$ ). In (B) wurde die Parkin Proteinmenge nur für die weiblichen Probanden: Kontrollen ( $n=15$ ), nicht atakt. MT ( $n=4$ ) und atakt. MT ( $n=23$ ) dargestellt. In (C) nur für die männlichen Probanden: Kontrollen ( $n=12$ ), nicht atakt. MT ( $n=0$ ) und atakt. MT ( $n=14$ ). Erkennbar war, dass der Median der weibl. Kontrollen mit  $\Delta c=75$  deutlich höher war als der der männlichen mit  $\Delta c=30$ , sich dies aber bei den atakt. MT umkehrte bei einem  $\Delta c=25$  bei den weiblichen und  $\Delta c=65$  bei den männlichen Probanden.

Die Daten der in London entnommenen Proben (Abbildung 40) zeigten eine deutliche Streuung der Parkin Proteinwerte. Hierbei waren zusätzlich einige Ausreißer mit Werten von  $\Delta c=800$  bis  $\Delta c=4000$  für die Kontrollen und die atakt. MT erkennbar. Generell gab es mit  $n=4$  eine sehr geringe Anzahl nicht atakt. MT innerhalb der Londoner Proben, bei denen es sich ausschließlich um weibliche Probanden handelte. Die größten Protein-Messwerte zeigten sich im Median für die Kontrollen ( $\Delta c=45$ ), die niedrigsten bei den nicht atakt. MT ( $\Delta c=22$ ). Auch für die weiblichen Proben waren im Median die höchsten Werte bei den Kontrollen zu verzeichnen ( $\Delta c=75$ ), und die niedrigsten für die nicht atakt. MT ( $\Delta c=15$ ). Bei den männlichen Kontrollen, nicht atakt. MT und atakt. MT waren die Parkin Protein-Level der atakt. MT im Median am höchsten ( $\Delta c=65$ ), die der Kontrollen am niedrigsten ( $\Delta c=30$ ).



**Abbildung 41: Parkin Protein-Level Tübingen: Kontrollen, nicht ataktische MT und ataktische MT**

(A) zeigt die Menge Parkin in  $\Delta c$  für die Kontrollen ( $n=11$ ), nicht ataktischen MT ( $n=6$ ) und ataktischen MT ( $n=16$ ). In (B) wurde die Parkin Proteinmenge nur für die weiblichen Probanden: Kontrollen ( $n=6$ ), nicht atakt. MT ( $n=2$ ) und atakt. MT ( $n=12$ ) dargestellt. In (C) nur für die männlichen Probanden: Kontrollen ( $n=5$ ), nicht atakt. MT ( $n=4$ ) und atakt. MT ( $n=4$ ). Tübingen zeigte jeweils in A-C im Median die höchsten Werte bei den nicht atakt. MT und die niedrigsten Werte bei den weiblichen Probanden für die atakt. MT und bei den männlichen Probanden für die Kontrollen.

Wie in Abbildung 41 veranschaulicht, zeigte Tübingen geringe Parkin Proteinwerte mit  $\Delta c < 50$ . Die Kontrollen zeigten im Median die niedrigsten Werte ( $\Delta c = 7$ ), gefolgt von den atakt. MT ( $\Delta c = 15$ ). Die höchsten Werte waren erkennbar für die nicht atakt. MT ( $\Delta c = 21$ ). Bei den weiblichen Proben (B) waren die höchsten Werte im Mittel die nicht atakt. MT ( $\Delta c = 39$ ), gefolgt von den Kontrollen ( $\Delta c = 22$ ) und die geringsten Werte waren bei den atakt. MT ( $\Delta c = 15$ ) zu erkennen. Die Reihenfolge für die männlichen Proben (C) war mit der der Gesamtproben für Tübingen vergleichbar und zeigte dementsprechend die höchsten Werte für die nicht atakt. MT ( $\Delta c = 14$ ) und die niedrigsten für die Kontrollen ( $\Delta c = 7$ ). Dazwischen lagen die atakt. MT mit einem Median von  $\Delta c = 9$ .

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass keine Regelmäßigkeit oder Gemeinsamkeiten auffällig waren und sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Zentren im Vergleich zeigten. Dennoch war auffällig,

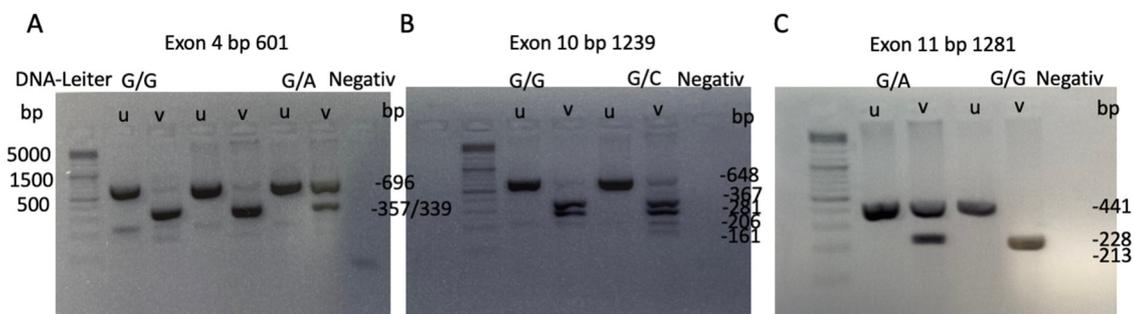
dass in einigen Zentren, darunter Coimbra, Groningen/Nijmegen und London, einige Ausreißer mit deutlich abweichend hohen Parkin Protein-Leveln mit Werten von über  $\Delta c=800$  festgestellt werden konnten.

Sowohl in Coimbra als auch in Tübingen waren die höchsten Werte im Median bei den nicht atakt. MT (sowohl männlich als auch weiblich) und auf den Azoren in der gesamtgeschlechtlichen Analyse festzustellen. Die atakt. MT hatten hingegen bei der Analyse jeweils der weiblichen und männlichen Probanden auf den Azoren, der gesamtgeschlechtlichen und männlichen Probanden aus Bonn und der männlichen Probanden aus London im Median die höchsten Werte. Dementsprechend hatten bei den männlichen Probanden am häufigsten die atakt. MT die höchsten Parkin Protein-Level. Im Gegensatz dazu zeigten die weiblichen Kontrollen aus Bonn und London, sowie die gesamtgeschlechtlichen Kontrollen aus London die höchsten Parkin Protein-Level. Im Allgemeinen zeigte sich jedoch, dass in Bonn und London die Kontrollen im Median die höchsten Parkin Protein-Level und auf den Azoren, in Coimbra und Tübingen die nicht atakt. MT die höchsten Parkin Protein-Level hatten.

### *3.3.6 Zusammenhang zwischen den Parkin Protein-Leveln und den PARK2 SNPs*

Nachdem die Parkin Protein-Level der Probanden bezüglich der demographischen Daten untersucht wurden, sollte nun der Zusammenhang zwischen den Protein-Leveln und den bekannten *PARK2* SNPs untersucht werden. Da die *PARK2* SNPs in den Probanden bereits untersucht wurden und sich Auffälligkeiten in Bezug auf die Pathogenese in SCA3 Patienten zeigten (vgl. Diplomarbeit Dr. Jonasz Weber), sollte ein Zusammenhang dieser mit den Parkin Protein-Leveln überprüft werden.

In 3.3.6 handelt es sich lediglich um Proben, die bei der Baseline Untersuchung entnommen wurden.



**Abbildung 42: Bestimmung der PARK2 SNPs mittels Agarose-Gelelektrophorese**

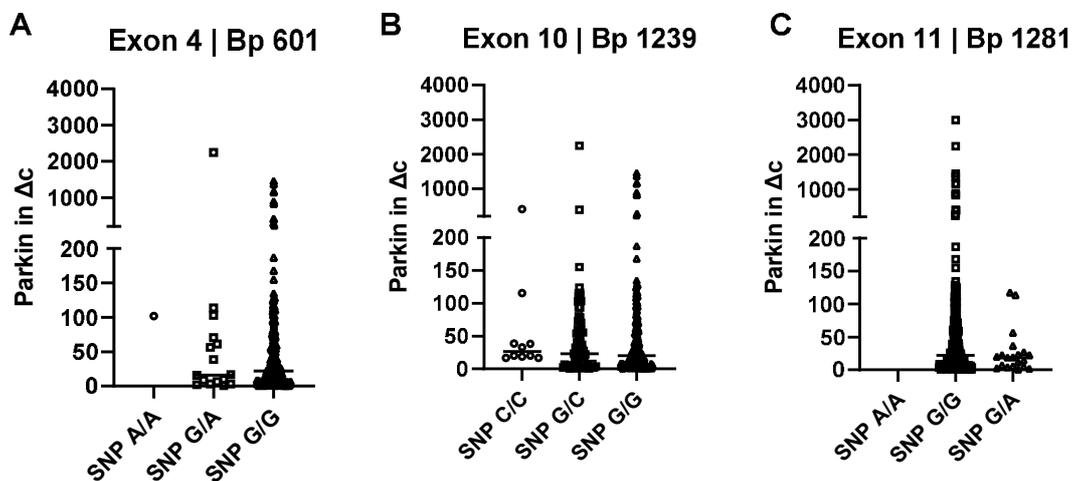
Dargestellt sind Beispiele der verschiedenen PARK2 SNPs, welche mittels Agarose-Gelelektrophorese ermittelt wurden. (A) zeigt Beispiele für Exon 4, (B) für Exon10 und (C) für Exon 11 mit den zugehörigen Basenpaare (bp). Dabei konnten für jedes Exon nur 2 der jeweils 3 SNPs für diese Arbeit dargestellt werden. Zur Kontrolle wurde die letzte Geltasche jeweils mit einer Negativkontrolle (Negativ) beladen.

Wie bereits im Material und Methodenteil beschrieben wurden 3 PARK2 SNPs anhand von DNA-Proben untersucht, die jeweils in 3 verschiedene Haplotypen zur Ausprägung kamen.

Abbildung 42 zeigt Beispiele für die verschiedenen PARK2 SNPs, welche mittels Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse analysiert wurden. Zum Vergleich wurde jeweils in die erste Tasche ein DNA-Leiter und in die letzte Tasche eine Negativkontrolle wie bereits in 2.2.7. beschrieben geladen. Anschließend wurde in die folgende Tasche eine unverdaute (u) und in die darauffolgende Tasche eine verdaute Probe (v) zur Bestimmung der SNPs geladen. Die entstandenen Banden wurden mit den bekannten Längen der SNPs anhand der DNA-Leiter verglichen. In (A) wurde ein Beispiel für SNP Bp601 gezeigt. Hier konnten zwei (G/G und G/A) der drei Haplotypen präsentiert werden. Erkennbar ist der Genotyp G/G aufgrund der dicken Bande um 350 bp und des zweiten dünnen Bandes bei 669 bp. Beispiel 2 zeigt den Genotyp G/A. Es sind zwei Banden in der verdauten Probe erkennbar, einmal bei 696 und eine zweite Bande bei 339/357. Eine Trennung der kleineren Banden mit 339 bp und 357 bp konnte unter den Konditionen nicht erreicht werden und ist immer als dickes Band zu erkennen. Bei dem seltenen Genotyp A/A wäre eine Bande bei 696 bp zu erwarten gewesen.

In (B) wurden Beispiele für SNP Bp 1239 dargestellt. Hier konnten ebenfalls nur 2 der 3 Haplotypen (C/C, G/C, G/G) ausgewiesen werden. Beispiel 1 zeigte nur ein Produkt bei 281 bp und 367 bp mit dem korrespondierenden Genotyp G/G. Beispiel 2 zeigt alle möglichen Produktlängen 161 bp, 206 bp, 281 bp, 367 bp und präsentiert dementsprechend den heterozygoten Genotypen G/C. Es fehlt das Beispiel definiert als Genotyp C/C, bei welchem ein Produkt bei 367 bp, im Vergleich zu Beispiel 2, fehlen würde.

Die Beispiele für die Genotypen des SNP 1281 wurden in (C) dargestellt. Auch hier konnten nur zwei der drei Genotypen (A/A, G/A, G/G) veranschaulicht werden. Während Beispiel 1 mit den zwei Produkten bei 213 bp und 228 bp und 441 bp den Genotyp G/A darstellte, stellte Beispiel 2 mit nur zwei Produkten bei 213 bp und 228 bp den Genotyp G/G dar. Bei dem Genotyp (A/A), welcher nicht dargestellt werden konnte, hätte man nur eine Bande bei 441 bp erwartet. Tabelle 18 im Material und Methodenteil stellt die erwarteten Produktlängen (bp) der SNPs mit ihren Restriktionsenzymen zu den jeweiligen Genotypen in einer Übersicht dar.



**Abbildung 43: Zusammenhang zwischen Parkin Protein-Leveln und PARK2 SNPs**

Dargestellt sind die jeweiligen Parkin Protein-Level der in den unterschiedlichen Exonen vorhandene SNPs. (A) zeigt die Protein-Level für Exon 4 bei Bp 601 für die SNPs A/A ( $n=1$ ), G/A ( $n=16$ ) und G/G ( $n=251$ ). (B) zeigt die Protein-Level für Exon 10 bei Bp 1239 für die SNPs C/C ( $n=10$ ), G/C ( $n=71$ ) und G/G ( $n=186$ ). Und (C) zeigt die Protein-Level für Exon 11 bei Bp 1281 mit den SNPs A/A ( $n=0$ ), G/G ( $n=249$ ) und G/A ( $n=20$ ). Es waren keine signifikanten Unterschiede erkennbar, der Median liegt für alle Exons und SNPs bei ca.  $\Delta c=25$ .

Nach Bestimmung der *PARK2* SNPs und der Parkin Protein-Level für die vorhandenen Proben, sollten diese in Korrelation zueinander betrachtet werden. Dies sollte zur Untersuchung von potenziellen Gemeinsamkeiten, Unterschieden oder Auffälligkeiten dienen. Für den Vergleich der Parkin Protein-Level in Korrelation zu den bekannten SNPs der Exone 4,10 und 11 konnten insgesamt 804 verschiedene Genotypen einbezogen werden. Bei allen restlichen Proben war es nicht möglich die Genotypen aufgrund mangelnder Probenmenge oder zu geringer DNA-Menge in der Probe zu bestimmen.

Abweichende Anzahl in den Bildunterschriften der Probanden bei der Aufteilung in Kontrollen, nicht atakt. MT und atakt. MT liegt an fehlenden klinischen Daten bezüglich der Einteilung innerhalb des SARA-Scores.

Abbildung 43 veranschaulicht die Parkin Proteinmenge der drei Exone und der jeweiligen Genotypen. Hier ist erkennbar, dass sowohl für Exon 4 bei Bp 601, bei Exon 10 mit Bp bei 1239 und bei Exon 11 bei Bp 1281 keine signifikanten Unterschiede in den Parkin Protein-Leveln festgestellt werden konnte. Die Parkin Protein-Level für alle Exone und deren Genotypen lagen um die  $\Delta c=25$ .

Exon 4 hatte mit  $n=1$  eine geringe Häufigkeit im Vorkommen des Genotyps A/A. Die Verteilung zeigte bei G/G deutlich mehr Ausreißer in höhere Parkin Protein-Level und einen geringfügig höheren Median als bei dem Genotypen G/A. Jedoch lag der Genotyp G/G mit  $n=251$  auch in einer deutlich höheren Anzahl als G/A mit  $n=16$  vor.

Exon 10 zeigte eine geringere Proteinmenge von Genotyp C/C ( $n=10$ ) über Genotyp G/C ( $n=71$ ) zu Genotyp G/G ( $n=186$ ), der jedoch einhergehend war mit einer erhöhten Probenanzahl.

Exon 11 zeigte für A/A mit  $n=0$  kein Vorkommen, allerdings für G/G ( $n=249$ ) und G/A ( $n=20$ ) eine nahezu gleiche Menge an Parkin, ungeachtet der unterschiedlichen Anzahl der Proben.

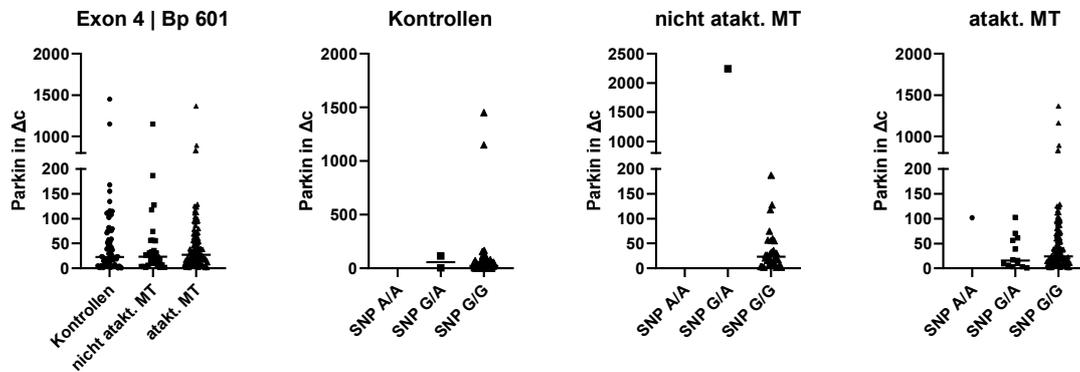
Insgesamt war erkennbar, dass die Werte für den Genotyp G/G für jedes Exon die höchsten Parkin Proteinwerte, aber auch die höchste Anzahl an Probanden aufwies.

Anschließend folgt erneut die Aufteilung der Probanden bezüglich der einzelnen Exone und *PARK2* SNPs in die drei Gruppen: Kontrollen, nicht atakt. MT und atakt. MT. Abbildung 44 stellt Exon 4 Bp 601 dar, Abbildung 45 Exon 10 Bp 1293 und Abbildung 46 Exon 11 Bp 1281. Erkennbar war, dass bei Exon 4 und Exon 11 die Parkin Protein-Level der atakt. MT im Median größer waren als die der Kontrollen und nicht atakt. MT. Bei Exon 10 hingegen waren die Parkin Protein-Level der Kontrollen im Median am höchsten.

Bei Exon 4 war erkennbar, dass bei den Kontrollen die höchsten Protein-Level im Median bei SNP G/A waren. Bei den nicht atakt. MT konnte für den SNP G/A nur ein Ausreißer aufgezeichnet werden und bei den atakt. MT waren die im Median höchsten Protein-Level für den SNP G/G zu verzeichnen.

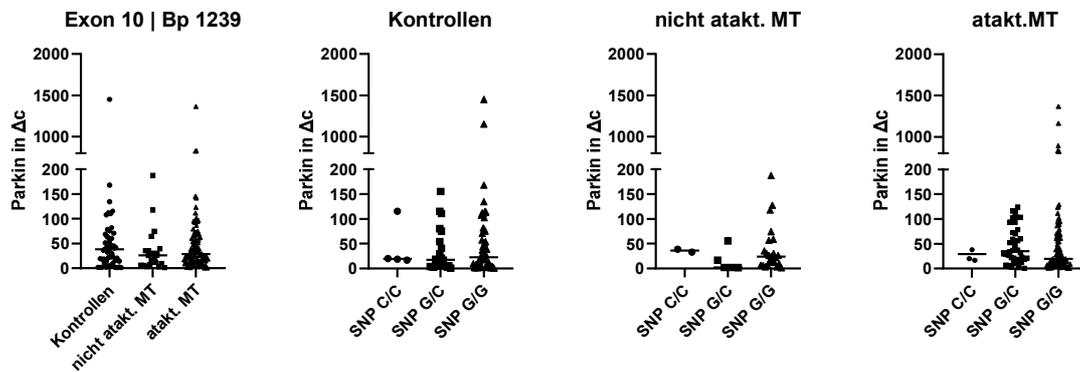
Bei Exon 10 konnte beobachtet werden, dass die Parkin Protein-Level der Kontrollen höher waren als die der nicht atakt. MT und der atakt. MT. Bei den Kontrollen waren die höchsten Protein-Level im Median bei SNP G/G, bei den nicht atakt. MT bei SNP C/C und den atakt. MT bei SNP G/C zu finden.

Exon 11 zeigte, dass bei den Kontrollen die Parkin Protein-Level im Median sowohl für den SNP G/G als auch G/A ähnlich hoch waren. Bei den nicht atakt. MT waren die höheren Protein-Level im Median für den SNP G/A zu verzeichnen und bei den atakt. MT waren die höheren Protein-Level bei SNP G/G zu erkennen. Bei den atakt. MT war der Unterschied zwischen den SNPs G/G und G/A mit  $p=0,0208$  auch signifikant mit höheren Parkin Protein-Level beim Genotyp G/G.



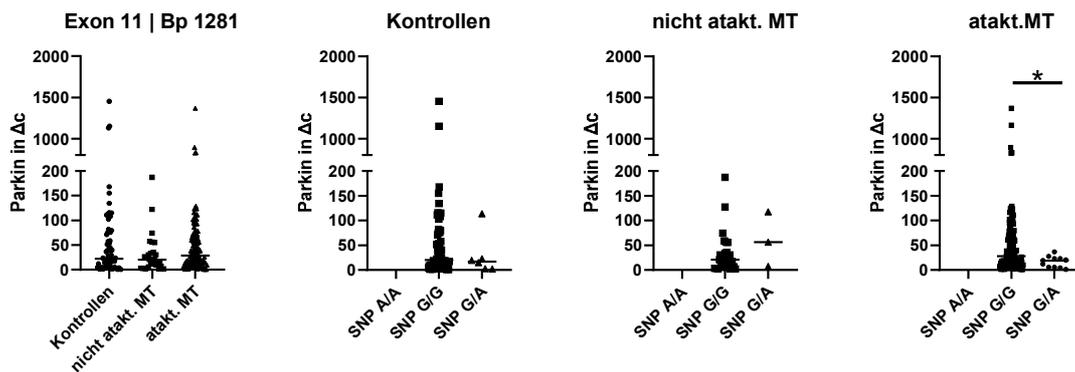
**Abbildung 44: Darstellung der Parkin Protein-Level für Exon 4 Bp 601**

Dargestellt sind die Parkin Protein-Level der PARK2 SNPs des Exon 4 aufgeteilt in Kontrollen mit den SNPs A/A (n=0), G/A (n=2), G/G (n=72), nicht atakt. MT und die SNPs A/A (n=0), G/A (n=1), G/G (n=30) und atakt. MT mit den SNPs A/A (n=1), G/A (n=13), G/G (n=135). Erkennbar ist, dass die Parkin Protein-Level der atakt. MT im Median höher waren als die der Kontrollen und der nicht atakt. MT. Bei den Kontrollen waren die höchsten Protein-Level im Median bei SNP G/A, bei den nicht atakt. MT konnten für den SNP G/A nur ein Ausreißer aufgezeichnet werden und bei den atakt. MT waren die im Median höchsten Protein-Level für den SNP G/G zu verzeichnen.



**Abbildung 45: Darstellung der Parkin Protein-Level für Exon 10 Bp 1239**

Dargestellt sind die Parkin Protein-Level der PARK2 SNPs des Exon 10 aufgeteilt in Kontrollen mit den SNPs C/C (n=4), G/C (n=22), G/G (n=51), nicht atakt. MT mit den SNPs C/G (n=2), G/C (n=5), G/G (n=23) und atakt. MT mit den SNPs C/C (n=4), G/C (n=40), G/G (n=106). Erkennbar ist, dass die Parkin Protein-Level der Kontrollen im Median höher waren als die der nicht atakt. MT und der atakt. MT. Bei den Kontrollen waren die höchsten Protein-Level im Median bei SNP G/G, bei den nicht atakt. MT bei SNP C/C und den atakt. MT bei SNP G/C.



**Abbildung 46: Darstellung der Parkin Protein-Level für Exon 11 Bp 1281**

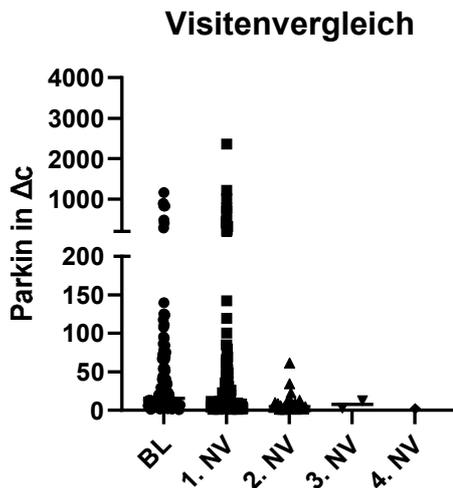
Dargestellt sind die Parkin Protein-Level der PARK2 SNPs des Exon 11 aufgeteilt in Kontrollen mit den SNPs A/A (n=0), G/G (n=73), G/A (n=6), nicht atakt. MT mit den SNPs A/A (n=0), G/G (n=27), G/A (n=3) und die atakt. MT mit den SNPs A/A (n=0), G/G (n=139), G/A (n=11). Erkennbar ist, dass die Parkin Protein-Level der atakt. MT im Median höher waren als die der Kontrollen und der nicht atakt. MT. Bei den Kontrollen waren die Protein-Level im Median sowohl für den SNP G/G als auch G/A ähnlich hoch. Bei den nicht atakt. MT waren die höheren Protein-Level im Median für den SNP G/A zu verzeichnen und bei den atakt. MT waren die höheren Protein-Level bei SNP G/G zu erkennen. Bei den atakt. MT war der Unterschied zwischen den SNPs G/G und G/A mit  $p=0,0208$  auch signifikant für höhere Parkin Protein-Level bei Genotyp G/G.

Zusammenfassend konnte man feststellen, dass in diesen Untersuchungen keine signifikanten Unterschiede der verschiedenen Genotypen in ihren Parkin Protein-Leveln nachgewiesen werden konnten. Der Median lag für alle Exone und deren Genotypen bei  $\Delta c=25$ . Erfolgt eine weitere Aufteilung der jeweiligen Probanden in Kontrollen, nicht atakt. MT und atakt. MT ist jedoch auffällig, dass bei den Kontrollen Exon 4 SNP G/A, bei Exon 10 SNP G/G und bei Exon 11 SNP G/G die höchsten Parkin Protein-Level aufwiesen und die atakt. MT die höchsten Protein-Level bei Exon 4 SNP G/G, Exon 10 SNP G/C und bei Exon 11 SNP G/G.

### 3.3.7 Longitudinale Entwicklung der Parkin Protein-Level über 5 Jahre

Um eine Entwicklung der Parkin Protein-Level und deren Einfluss auf den Phänotyp in SCA3-Patienten zu untersuchen, galt es anschließend longitudinale Daten zu erheben und zu analysieren. Hierzu dienten Nachvisiten, die zusätzlich zu den Baseline Untersuchungen der jeweiligen Probanden der ESMI-Kohorte durchgeführt wurden. Diese Visiten sollten bestmöglich im Abstand von einem Jahr erfolgen und identische Untersuchungen zur Baseline-Untersuchung

beinhalten, um einen möglichst hohen Vergleichswert erzielen zu können. Dementsprechend sollten sowohl die standardisierten Probenentnahmen als auch die klinischen Untersuchungen möglichst identisch ablaufen.



**Abbildung 47: Parkin Proteinlevel Höhe bei longitudinalem Visitenvergleich über 5 Jahre**

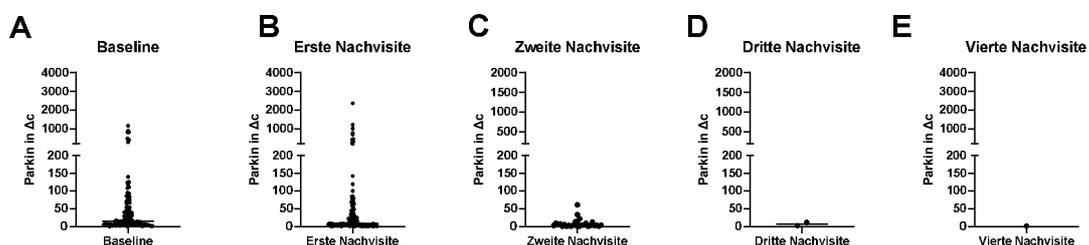
Dargestellt sind die Visiten über einen Zeitraum von 5 Jahren, die miteinander verglichen wurden. Die Erste Probenabnahme erfolgte bei der Baseline (BL, n=101) Untersuchung, die folgenden Untersuchungen wurden als 1. Nachvisite (1. NV, n=120), 2. Nachvisite (2. NV, n=28), 3. Nachvisite (3. NV, n=2) und 4. Nachvisite (4. NV, n=1) gekennzeichnet. Erkennbar war, dass die Anzahl der Proben im Verlauf deutlich abnahm. Die Höhe der Parkin Protein-Level in  $\Delta c$  lag sowohl für die BL als auch die 1. NV auf einem ähnlich hohen Level, nahm zur 2. NV ab, stieg wieder leicht bei der 3. NV und war erneut verringert bei der 4. NV.

Es sollte untersucht werden, ob sich eine Veränderung in den Parkin Protein-Leveln über einen longitudinalen Zeitraum zeigte, um einen Verlauf in den Protein-Leveln zu untersuchen, welcher möglicherweise eine Regelmäßigkeit aufweisen könnte. Hierfür war es für einige Probanden möglich zusätzlich zu der Baseline-Probe auch eine Probe der 1. Nachvisite (NV) zu bekommen. Für wenige Probanden gab es auch Proben einer 2. oder 3. Visite. Für eine Probe gab es eine Entnahme bei einer 4. Nachvisite. Die geringe Anzahl an longitudinalen Proben ist darauf zurückzuführen, dass es einige Probanden gab, die bereits verstorben sind oder auch viele der Kontrollprobanden keine Termine zur Nachvisite mehr wahrnahmen. Zusätzlich ist davon auszugehen, dass die Coronapandemie ein weiterer limitierender Faktor war, der Arztbesuche in

diesem Zeitraum einschränkte und gerade solche longitudinalen Daten zu Forschungszwecken beeinträchtigte und eingeschränkt haben könnte.

In Abbildung 47 und Abbildung 48 wurden von den Probanden, von denen longitudinale Werte mit mindestens zwei Visiten vorhanden waren, die Parkin Protein-Level dargestellt. Dabei ist in diesen Daten nicht festgelegt, an welcher Visite der Proband teilgenommen hatte.

In (A) zeigte die Baseline (BL) Untersuchung im Durchschnitt die höchsten Protein-Level. Die Menge der Protein-Level nahm zur ersten Nachvisite ab. Dieser Trend der Abnahme ließ sich auch bei den folgenden Visiten (2. NV, 3. NV und 4. NV) erkennen. Eine Ausnahme bildete die 3. NV (D), bei der ein geringer Anstieg der Parkin Protein-Level im Vergleich zur 2. NV (C) zu verzeichnen war, jedoch konnten nur 2 Proben zum Zeitpunkt der 3. NV mit einbezogen werden. Zudem war erkennbar, dass die Ausreißer nur in der Baseline und der 1. NV (B) zu finden waren. Für die folgenden Proben waren jedoch auch eine geringere Anzahl an Proben vorhanden. Die Werte bewegten sich hauptsächlich in einem Bereich unterhalb  $\Delta c=50$ . Wenige Proben besonders bei der BL und 1. NV ergaben Protein-Level zwischen  $\Delta c=150$  und  $\Delta c=50$ , vereinzelte Ausreißer wiesen in diesen beiden Visiten Werte zwischen  $\Delta c=800$  und  $\Delta c=4000$  auf.



**Abbildung 48: Parkin Protein-Level bei den einzelnen Visiten im longitudinalen Vergleich über 5 Jahre**

Dargestellt sind in A Baseline  $n=101$ , in B erste Nachvisite  $n=120$ , in C die zweite Nachvisite  $n=28$ , in D die dritte Nachvisite  $n=2$  und in E die vierte Nachvisite ( $n=1$ ). Erkennbar ist ein sinkender Median im Verlauf der Visiten.

Somit zeigt sich ein Trend der Abnahme der Parkin Protein-Level von der BL-Untersuchung zu den Folgeuntersuchungen. Auszuschließen ist jedoch nicht, dass dieser Effekt mit der verringerten Probenanzahl einhergeht.

### *3.3.8 Zusammenfassung der Ergebnisse aus 3.3*

Die Untersuchungen der Parkin Protein-Level zeigten zusammenfassend, dass zwar höhere Parkin Protein-Level bei den MT im Vergleich zu den Kontrollen zu finden waren, diese aber bei Aufteilung in atakt. und nicht atakt. MT nicht mehr signifikant waren. Ebenso wie höhere Protein-Level bei den männlichen Probanden (MT und Kontrollen), vor allem für die atakt. MT, zu erkennen waren, sich hier jedoch keine signifikanten Unterschiede zeigten und auch das Entnahmezentrum keine Unterschiede zeigte. Zudem konnten keine Auffälligkeiten der Parkin Protein-Level in den *PARK2* SNPs gefunden werden und auch keine signifikanten Unterschiede in den longitudinalen Daten über 5 Jahre.

Zusammenfassend zu 3.3. zeigt Tabelle 39 eine Übersicht über die Messergebnisse der Parkin Protein-Level im Vergleich der untersuchten Gruppen und die zugehörigen Ergebnisse der Untersuchungen der Probanden der ESMI-Kohorte, besonders die der SCA3-Patienten in Bezug auf die bestimmten Parkin Protein-Level.

Tabelle 39: Zusammenfassung der Ergebnisse aus Abschnitt 3.3.

Messergebnisse	Ergebnisse
Parkin Protein-Level im Vergleich zwischen	
Kontrollen und MT	<ul style="list-style-type: none"> <li>- höhere Parkin Protein-Level bei MT im Vergleich zu Kontrollen</li> <li>- mit <math>p \leq 0,01</math> signifikant höher bei MT</li> </ul>
Kontrollen, nicht atakt. MT und atakt. MT	<ul style="list-style-type: none"> <li>- höchsten Parkin Protein-Level bei Kontrollen (<math>\Delta c = 100</math>)</li> <li>- atakt. MT geringere Parkin Protein-Level als Kontrollen</li> <li>- nicht atakt. MT geringste Parkin Protein-Level mit <math>\Delta c = 50</math></li> <li>- keine signifikanten Unterschiede der Gruppen</li> <li>- häufigsten „Ausreißer“ bei atakt. MT</li> </ul>
Geschlecht	<p><b>(A) Gesamt</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- männliche Probanden (MT und Kontrollen) höhere Parkin Protein-Level als weibliche</li> <li>- signifikant höhere Werte (<math>p \leq 0,01</math>)</li> </ul> <p><b>(B) Kontrollen</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- höhere Parkin Protein-Level bei weiblichen Kontrollen</li> </ul> <p><b>(C) nicht atakt. MT</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- höhere Parkin Protein-Level bei weiblichen nicht atakt. MT</li> </ul> <p><b>(D) atakt. MT</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- höhere Parkin Protein-Level bei männlichen atakt. MT</li> </ul>
Zentrum der Probenentnahme	<ul style="list-style-type: none"> <li>- keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Zentren</li> </ul> <p><b>Azoren</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- keine Kontrollen mit einbezogen, da dort das Einverständnis zur Untersuchung der gesunden Kontrollen durch die zuständige Ethikkommission nicht vorlag</li> </ul>

- im Mittelwert keine erkennbaren Unterschiede in ihrer Parkin Proteinmenge

### **Bonn**

- Parkin Protein-Level geringe Werte von  $\Delta c < 20$
- signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ) zwischen den nicht atakt. MT und den atakt. MT
- Werte der Kontrollen waren im Durchschnitt die höchsten

### **Coimbra**

- weite Streuung der Werte
- nicht ataktischen MT am höchsten bei  $\Delta c = 115$ , gefolgt von den Kontrollen bei  $\Delta c = 50$  und den atakt. MT  $\Delta c = 25$
- n=5 Ausreißer mit Werten zwischen  $\Delta c = 800$  bis 40000
- Werte für die atakt. MT am geringsten, gefolgt von den Kontrollen - höchsten Werte waren bei den nicht atakt. MT

### **Groningen**

- keine Kontrollen und nicht atakt. MT
- Parkin Protein-Level atakt. MT lagen bei  $\Delta c = 40$
- Werte für die männlichen mit  $\Delta c = 100$  deutlich gestreuter und oberhalb denen der weiblichen Probanden  $\Delta c = 15$  lagen

### **London**

- Ausreißer mit Werten von  $\Delta c = 800$  bis 4000 für die Kontrollen und die atakt. MT
- Parkin Proteinmenge für die Kontrollen am höchsten, gefolgt von den nicht atakt. MT und den atakt. MT

### **Tübingen**

- geringe Parkin Proteinwerte mit  $\Delta c < 50$
- Werte der Kontrollen sehr niedrig ( $\Delta c = x$ ), gefolgt von atakt. MT

<p><i>PARK2</i> SNPs</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- keine signifikanten Unterschiede in den Parkin Protein-Leveln</li> <li>- Parkin Protein-Level für alle Exone und deren Genotypen lagen um die 25</li> </ul> <p><b>Exon 4</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- n=1 eine geringe Häufigkeit im Vorkommen des Genotyps A/A</li> <li>- G/G deutlich mehr Ausreißer in höhere Parkin Protein-Level</li> <li>- G/G geringfügig höheren Median als bei dem Genotyp G/A</li> </ul> <p><b>Exon 10</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- geringere Proteinmenge von Genotyp C/C über Genotyp G/C</li> <li>- höchste Proteinmenge Genotyp G/G</li> </ul> <p><b>Exon 11</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- A/A mit n=0 kein Vorkommen</li> <li>- G/G und G/A eine nahezu gleiche Menge an Protein Parkin</li> <li>- bei der Aufteilung in Kontrollen, nicht atakt. MT und atakt. MT zeigte sich hingegen, dass im Vergleich zwischen den drei Gruppen jeweils bei unterschiedlichen SNPs die höchsten Parkin Protein-Level zu verzeichnen waren</li> <li>- Signifikanz von p=0,0208 bei Exon 11 im Vergleich der SNP G/G und G/A mit höheren Parkin Protein-Leveln bei. Genotyp G/G</li> </ul>
<p>Longitudinal</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Starke Abnahme der Probenanzahl im Verlauf der longitudinalen Daten über 5 Jahre erkennbar</li> <li>- keine signifikanten Unterschiede feststellbar</li> <li>- Protein-Level bei BL am höchsten, Abnahme der Protein-Level zu den Folgevisiten</li> </ul>

### 3.4 Analyse klinischer Daten in SCA3-Patienten

Nachdem die Parkin Protein-Level untersucht wurden, sollte weiterhin ein Zusammenhang mit der phänotypischen Ausprägung untersucht werden. Hierzu standen erstmalig klinische Daten zur Verfügung, die im Folgenden in Bezug zu den genetischen und proteinbiochemischen Daten gebracht werden sollen. Hierbei handelt es sich zum einen erneut um Alter und Geschlecht der Probanden, zum anderen um Daten über eingenommene Medikamente zur Behandlung von Parkinson-Symptomen, klinischen Scores zur Bewertung der ataktischen Symptome mittels SARA-Score und der nicht ataktischen Symptome mittels INAS-Score. Sowie dem Vorhandensein eines *Restless-Leg-Syndroms* (RLS) und der diesbezüglich eingenommenen Medikamente (RLS-Medikamente), da sich dieses gehäuft bei Patienten mit PD-Symptomen äußern könnte.

Erstmalig sollte sich in dieser Arbeit anschließend damit beschäftigt werden, wie sich die klinischen Daten der Probanden äußerten und ob es Zusammenhänge zwischen diesen und den vorhandenen im Labor untersuchten Parametern, also den *PARK2* SNPs und den Parkin Protein-Leveln gab. Dafür wurden möglichst viele klinische Parameter gesammelt und aus Gründen der Übersichtlichkeit im Anhang in zwei Tabellen zusammengefasst (Anhang 13 und Anhang 14). Hierbei wurden exemplarisch lediglich die Probanden erfasst, für die auch zu allen erhobenen klinischen Parametern Daten vorhanden waren, daher sind Daten von insgesamt 407 Probanden auf die das zutrifft erfasst worden. Probanden, bei denen ein Teil der klinischen Daten fehlte konnten nicht in die Analyse miteingeschlossen werden.

Die Labordaten, welche im Folgenden verarbeitet wurden, sind lediglich auf PBMC-Proben, die bei der BL-Untersuchung entnommen wurden, zurückzuführen, (ausgenommen einer Probe (Co24), bei welcher es sich um eine PBMC-Probe der 1. Follow-Up-Untersuchung handelt).

In Tabelle 40 ist eine Übersicht der demografischen Informationen für die insgesamt 407 Probanden dargestellt. Es erfolgte eine Einteilung dieser Probanden bezüglich ihrer Medikamenteneinnahme in 3 Gruppen: 1) SCA3-

Patienten mit PD-Medikation, 2) MT mit anderen Medikamenten und 3) MT ohne Medikamenteneinnahme.

Zur Vollständigkeit wurden auch die Kontrollen unter den Probanden noch aufgeführt in zusätzlichen Gruppen (A) MT und Kontrollen mit anderen Medikamenten und (B) MT und Kontrollen ohne Medikamenteneinnahme. Unter den SCA3- Patienten mit PD-Medikation befanden sich keine Kontrollen.

Im Vergleich gab es wenige Probanden die PD-Medikamente einnahmen, aber viele MT und Kontrollen die zwar Medikamente, aber darunter keine PD-Medikamente einnahmen. Die Anzahl zwischen männlichen und weiblichen Probanden war in allen Gruppen ausgeglichen. Für einige Probanden fehlte die Geschlechtsangabe der klinischen Daten, diese wurden unter „ohne Geschlechtsangabe“ zusammengefasst. Das durchschnittliche Alter bei Probenentnahme waren 51 Jahre bei Gruppe 1, 49 Jahre bei Gruppe 2, 48 Jahre bei Gruppe A, 44 Jahre bei Gruppe B und 45 Jahre bei Gruppe 3. Das AAO war bei allen 3 Gruppen mit 37 Jahren (Gruppe 1 und B) und 39 Jahren bei Gruppe A, 40 bei Gruppe 2 und 38 bei Gruppe 3 ähnlich. Kaum Unterschiede zeigten sich in den CAG-Wiederholungen. Gruppe 1,2 und 3 hatten durchschnittlich gleich viele CAG-Wiederholungen mit 69 CAG-*Repeats* im Vergleich zu 57 CAG-*Repeats* bei Gruppe A und durchschnittlich nur 46 CAG-*Repeats* bei Gruppe B. Diese Unterschiede sind jedoch darauf zurückzuführen, dass sich in Gruppe A und B sowohl MT als auch Kontrollen befinden. Auch beim SARA und INAS konnten höhere Werte bei den SCA3-Patienten mit PD-Medikation im Vergleich zu Gruppe 2 und 3 festgestellt werden.

Auch beim SARA und INAS konnten im Vergleich zu allen anderen Gruppen insgesamt höhere Werte bei den SCA3-Patienten mit PD-Medikation festgestellt werden.

Tabelle 40: Demografische und klinische Eigenschaften der Probanden (SCA3 Patienten mit PD-Medikation, MT und Kontrollen mit anderen Medikamenten, MT mit anderen Medikamenten, MT mit Kontrollen ohne Medikamenteneinnahme und MT ohne Medikamenteneinnahme) in der analysierten ESMI-Kohorte die auf klinische Daten untersucht wurden

Demografische Informationen	(1) SCA3-Pat mit PD-Medikation	(A) MT <b>und</b> <b>Kontrollen</b> mit anderen Medikamenten	(2) MT mit anderen Medikamenten	(B) MT <b>und</b> <b>Kontrollen</b> ohne Medikamenteneinnahme	(3) MT ohne Medikamenteneinnahme
Anzahl	49	239	179	119	60
männlich	47 % (23)	44 % (105)	45 % (81)	49 % (58)	53 % (32)
weiblich	51 % (25)	52 % (125)	51 % (91)	41 % (49)	37 % (22)
Ohne Geschlechtsangabe	2% (1)	4% (9)	4 % (7)	10 % (12)	10 % (6)
Alter bei Probenentnahme	51	48	49	45	44
Age at Onset (AAO)	37	39	40	37	38
CAG-Wiederholung	69	57	68	46	68
SARA	18	9	12	4	8
INAS	6	4	4	2	3

### 3.4.1 SCA3-Patienten mit Medikamenteneinnahme zur Behandlung von PD-Symptomen

Zuerst erscheint es sinnvoll die SCA3-Patienten mit PD-Medikation genauer zu analysieren.

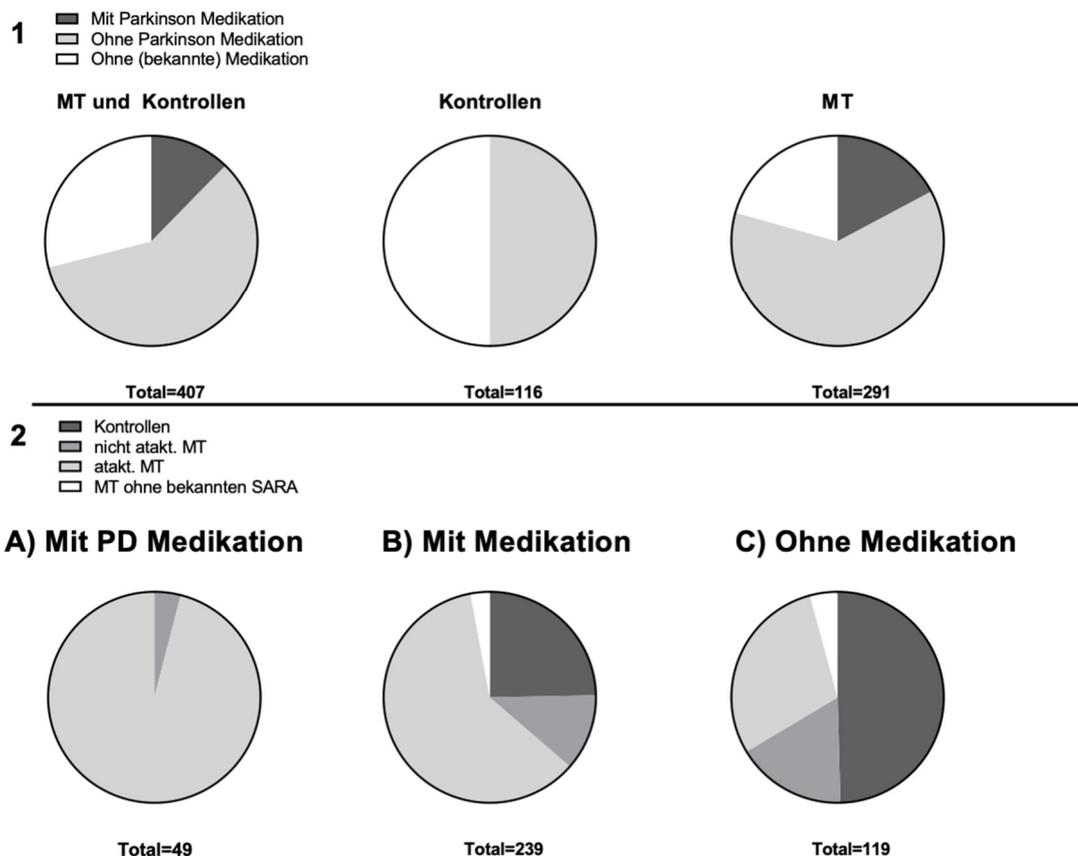
Da es in dieser Arbeit vorrangig um den Einfluss des Parkinson-assoziierten Proteins Parkin auf die Pathogenese der SCA3 geht, sollte der Einfluss der Medikamente zur Behandlung von PD-Symptomen wie beispielsweise motorische Einschränkungen, einschließlich Zittern (Tremor), Muskelstarre (Rigor), Bewegungsarmut (Akinese), *Restless-Leg-Syndrom* (RLS) und ihr Einfluss auf die SCA3 Patienten untersucht werden. Diese Untersuchung erfolgte im direkten Vergleich mit Probanden (MT und Kontrollen), die keine PD-Medikamente einnahmen.

Bei allen Daten der Probanden, die unter Abschnitt 3.4. analysiert wurden, handelt es sich um PBMC-Proben, welche bei der BL-Untersuchung entnommen wurden.

*Tabelle 41: Auflistung der berücksichtigten Parkinsonmedikamente zur Einteilung der Probanden und Anzahl der Probanden, die diese Medikamente einnehmen*

Parkinson Medikamente		Anzahl der Einnahmen
	L-Dopa	15
Anticholinerga	Biperiden	1
MAO-B-Hemmer	Selegin	1
	Rasagilin	0
	Amantadin	17
	Budipin	0
COMT-Hemmer	Entacapon	0
	Tolcapon	0
Non-Ergot Dopaminantagonisten	Ropininol	8
	Pramexipexol	11
	Apomorphin	0
	Rotigotin	2
	Pribibedil	1
Ergot Dopaminantagonisten	Bromocriptin	0
	Pergolid	0
	Lisurid	0
	Cabergolin	0
Andere	Trihexyphenidyl	8
	Parkadina	2
	Carbidopa	5
	Benserazide	3
	Hydrochlorid	1
	B-neurax	1
	Metodura	1
	Isicom	1
	Pregubalin	1
	Tramadol	1
	Madopa	1

Ein wichtiges Augenmerk wurde somit bei der Untersuchung der klinischen Daten auf die Einnahme der PD-Medikamente gelegt. Tabelle 41 zeigt eine Zusammenfassung der eingenommenen PD-Medikamente durch die Probanden der ESMI-Kohorte, welche in diese Arbeit eingeschlossen werden konnten und die Anzahl der Probanden, die diese Medikamente jeweils einnahmen. Erkennbar ist, dass die meisten SCA3-Patienten L-Dopa (15-mal), Amantadin (17-mal) und Pramexipexol (11-mal) einnahmen und die Großzahl der übrigen Medikamente nur von einer geringen Anzahl an Probanden eingenommen wurde. Ein wichtiges Augenmerk wurde somit bei der Untersuchung der klinischen Daten auf die Einnahme der PD-Medikamente gelegt. Tabelle 41 zeigt eine Zusammenfassung der eingenommenen PD-Medikamente durch die Probanden der ESMI-Kohorte, welche in diese Arbeit eingeschlossen werden konnten und die Anzahl der Probanden, die diese Medikamente jeweils einnahmen.



**Abbildung 49: Probanden mit PD-Medikation, mit Medikation (aber nicht PD) und ohne Medikation**

1 zeigt eine Übersicht aller Probanden (n=407) (links) die in die Analyse der klinischen Daten einbezogen werden konnten. Dargestellt ist eine Unterscheidung in Probanden, die PD-Medikamente bekamen in dunkelgrau (n=49,) Probanden, die eine Medikamenteneinnahme angegeben haben, aber keine PD-Medikamente bekamen in hellgrau (n=239) und Probanden, die keine Medikation bekamen bzw. bei denen keine Medikation bekannt war in weiß (n=119). Dargestellt sind ebenfalls einmal nur die Kontrollen (mitte) (n=116) und einmal nur die MT (n=291) (rechts) mit den jeweiligen Anteilen an PD-Medikation, ohne PD-Medikation und ohne (bekannte) Medikation. In 2 sind diese Probanden in Kontrollen (dunkelgrau), nicht atakt MT (mittelgrau), atakt. MT (hellgrau) und ohne bekannten SARA (weiß) eingeteilt worden. In 2A sind die Probanden aus 1 aufgeführt, welche PD-Medikamente bekamen (Kntr. n=0, nicht atakt MT (n=2), atakt. MT n=47, ohne bekannten SARA n=0), in 2B jene, die Medikamente bekamen, jedoch darunter keine PD-Medikamente (Kntr. (n=59), nicht atakt. MT (n=28), atakt. MT n=145, ohne bekannten SARA (n=7)) und in 2C alle Probanden, die keine Medikation bekamen bzw. bei denen keine Medikation bekannt war (Kntr. (n=59), nicht atakt. MT (n=20), atakt. MT (n=35), ohne bekannten SARA (n=5)).

Zur Veranschaulichung wie hoch der Anteil der Medikamente einnehmenden Probanden war, wurde in Abbildung 49 dargestellt wie viele Probanden einbezogen werden konnten und ob und welche Medikation diese bekamen. Hierbei erfolgte nur eine Unterscheidung in PD-Medikation, in der alle in Tabelle 41 aufgelisteten PD-Medikamente zusammengefasst sind, ob andere Medikamente eingenommen wurden, wobei PD-Medikamente ausgeschlossen waren, und Probanden, die keinerlei Medikamente einnahmen. Zusätzlich sollte in (2) unterschieden werden, welcher Gruppe von Probanden, also Kontrollen,

nicht atakt. MT oder atakt. MT, diese Probanden zugeordnet werden konnten (Abb. 46,2 A-C).

Somit ist dies eine Übersicht der zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit aufgeführten Probanden (n=407). Hierbei wurde in 1 unterschieden, welche dieser Probanden mit den in Tabelle 41 aufgelisteten Parkinson Medikamenten behandelt wurden (dunkelgrau), welche medikamentös behandelt wurden, jedoch keine der aufgelisteten Parkinson Medikamente zum Zeitpunkt der Probenentnahme (hellgrau) erhielten und welche zu diesem Zeitpunkt entweder keine Medikation bekamen oder diese zum Zeitpunkt der Probenentnahme nicht erfasst werden konnte (weiß).

Schaut man sich 1 nun genauer an, kann man erkennen, dass von allen Probanden (MT und Kontrollen) (links) 12 % PD-Medikamente einnahmen, 59 % andere Medikamente einnahmen, und 29 % keine Medikamente einnahmen. Dementsprechend war der Anteil derer, die PD-Medikamente einnahmen am geringsten. Schaut man sich nur das Tortendiagramm der Kontrollen in der Mitte an, erkennt man, dass es keine Kontrollprobanden gab, die PD-Medikamente einnahmen, aber die Probanden, die andere Medikamente einnahmen oder keine Medikamente einnahmen waren prozentual gesehen ähnlich viele. Bei den MT sah das wieder anders aus. Das Tortendiagramm der MT zeigt, dass die meisten der MT Medikamente einnahmen, aber der Anteil derer, die PD-Medikamente einnahmen war dennoch geringer als der, die keine Medikamente einnahmen.

In 2 erfolgte eine Einteilung der Probanden jeweils in Kontrollen (dunkelgrau), nicht atakt. MT mit SARA <3 (mittelgrau), atakt. MT mit SARA >3 (hellgrau) und Probanden ohne bekannten SARA (weiß). 2A zeigt somit alle Probanden, die eine Medikation zur Bekämpfung der Parkinson-Symptome bekamen. Eine ausführliche Tabelle über diese Probanden findet sich im Anhang (Anhang 13, Anhang 14).

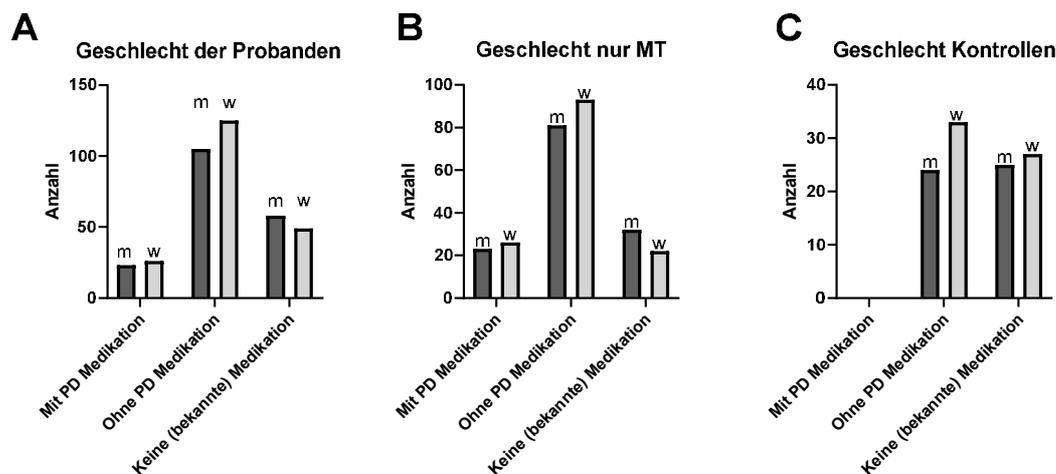
Zu erkennen war, dass 49 der 407 Probanden zum Zeitpunkt der BL-Untersuchung Medikamente von den in Tabelle 41 aufgeführten PD-Medikamenten bekamen. Dabei handelte es sich um 2 nicht atakt. MT, was einem Anteil von 4%. entspricht, aber 47 atakt. MT, was dementsprechend 96% der Probanden ausmachte. Von den Kontrollen bekam zu diesem Zeitpunkt

niemand PD-Medikamente. Im Gegensatz dazu kann man in 2B erkennen, dass es sich bei allen Probanden, die andere Medikamente bekamen, also keine PD-Medikamente, nur noch bei ca. 60% um atakt. MT, aber bei 25 % bereits um Kontrollen handelte. Nicht atakt. MT bekamen zu 12 % andere Medikamente und 3 % der Probanden konnten diesen Gruppen aufgrund fehlender Angaben des SARA nicht zugeordnet werden. Bei den Probanden, die keine Medikamente bekamen, war der Anteil der Kontrollen dementsprechend hoch und lag bei 50 %. 17 % der nicht atakt. MT bekamen keine Medikamente und 29 % der atakt. MT. Die restlichen 4 % der Probanden, die keine Medikamente einnahmen, konnten den Gruppen (Knt., nicht atakt. MT, atakt. MT) nicht zugeteilt werden, da auch hier keine klinischen Angaben zum SARA-Score vorlagen.

#### *3.4.2 Geschlecht der Probanden mit PD-Medikation*

Anschließend sollte auch hier ausgeschlossen werden, dass das Geschlecht einen Einfluss auf die PD-Einnahme hatte. Daher sollten vorerst alle Probanden von denen das Geschlecht und deren Medikation oder nicht-Medikation bekannt war analysiert werden. Anschließend erfolgte eine Unterteilung dieser Gruppe in MT und Kontrollen.

In Abbildung 50 wurde somit die Anzahl aller Probanden (MT und Kontrollen), nach männlichem und weiblichem Geschlecht unterteilt und in Bezug zu ihrer Medikation, d.h. mit PD-Medikation, ohne PD-Medikation und ohne (bekannte) Medikation, dargestellt. Hierbei war zu erkennen, dass keine signifikanten Unterschiede der Medikation zwischen den Geschlechtern festgestellt werden konnte. Dies galt sowohl für die MT (B) als auch die Kontrollen (C). Somit zeigten ca. die gleiche Anzahl an männlichen und weiblichen SCA3-Patienten PD-Symptome, welche mit PD-Medikamenten behandelt wurden.



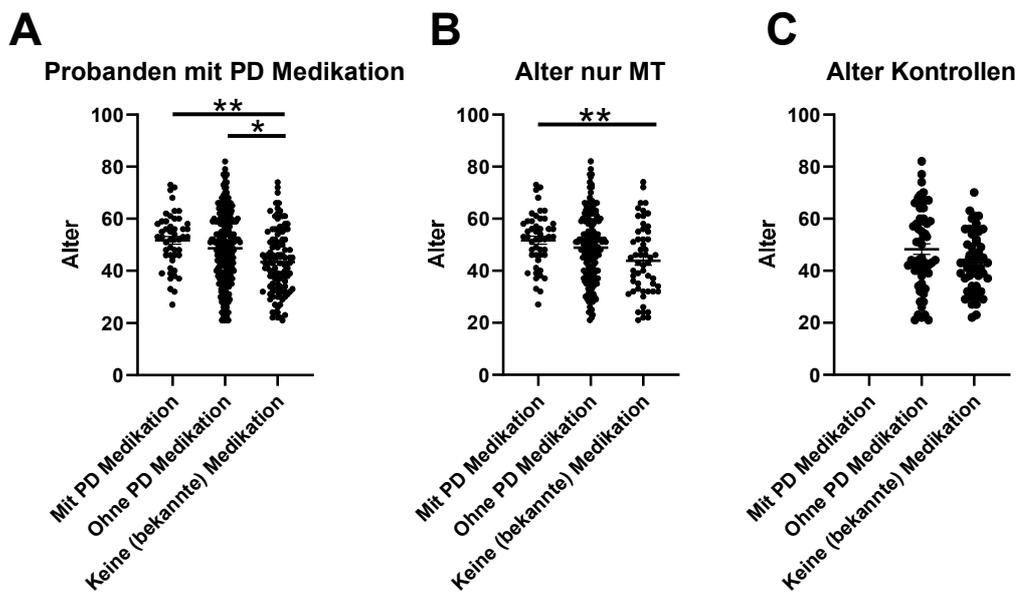
**Abbildung 50: Anzahl der männlichen und weibliche Probanden (MT und Kontrollen) mit PD-Medikation, mit anderer Medikation und ohne (bekannte) Medikation**

Erkennbar war eine gleichmäßige Verteilung ohne signifikante Unterschiede der Patienten zwischen den Geschlechtern. Hierbei lagen Daten zu folgenden Probanden vor: In A mit PD-Medikation männl. (n=23), weibl. (n=25), mit Medikation männl. (n=105), weibl. (n=125), keine Medikation männl. (n=58), weibl. (n=49), in die Unterteilung nicht mit aufgenommen, da fehlende Daten zum Geschlecht vorlagen waren (n=22). In B wurden nur die MT unter allen Probanden dargestellt, in C nur die Kontrollen innerhalb der Gruppe der Probanden.

### 3.4.3 Alter der Probanden mit PD-Medikation

Im Folgenden erfolgte eine Gegenüberstellung des Alters der Probanden mit PD-Medikation in Bezug zu ihrer Medikation. Detaillierte Tabellen zu diesen Probanden befinden sich der Übersichtlichkeit wegen im Anhang (Anhang 13 und Anhang 14). Hier erfolgte dieselbe Aufteilung der Probanden: mit PD-Medikation, ohne PD-Medikation und ohne (bekannte) Medikation. In A ist zu sehen, dass Probanden mit PD-Medikation ein signifikant ( $p \leq 0,01$ ) höheres Alter mit durchschnittlich 52 Jahren hatten als Probanden ohne Medikation, die im Durchschnitt 43 Jahre alt waren. Zudem war ein signifikanter Unterschied ( $p \leq 0,05$ ) zwischen dem Alter der Probanden mit anderer Medikation (PD-Medikation ausgeschlossen) mit durchschnittlich 49 Jahren und denen ohne (bekannte) Medikation festzustellen. Die Probanden, die eine Medikation bekamen waren somit im Durchschnitt älter. Sowohl die Probanden die PD-Medikamente bekamen als auch die Probanden, die andere Medikamente als PD-Medikamente bekamen. Dennoch hatten die Probanden mit PD-Medikation

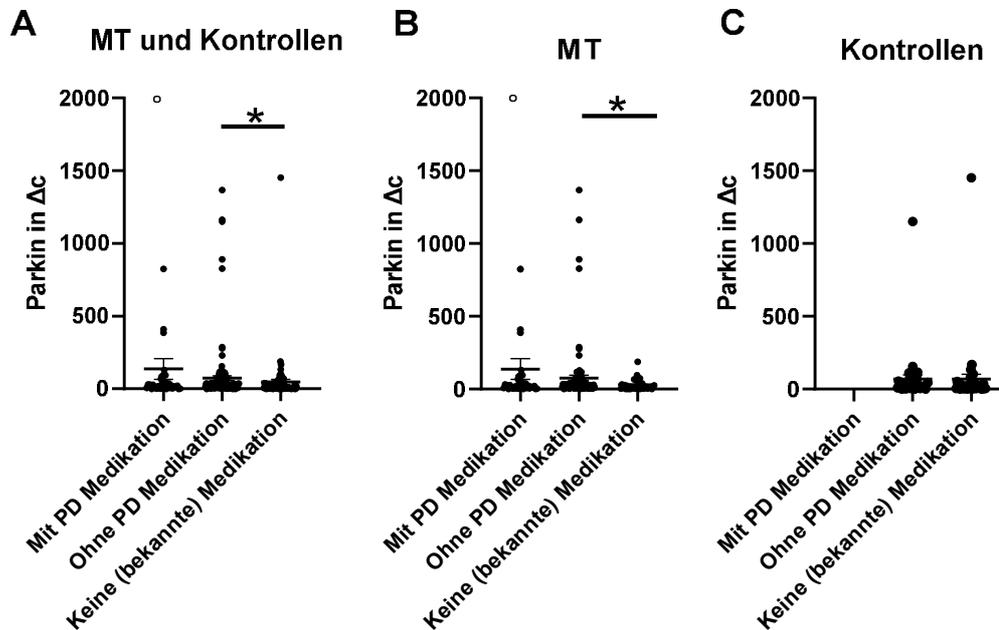
mit durchschnittlich 52 Jahren das höchste Alter im Vergleich mit den anderen Gruppen. Dieser Unterschied war auch unter Ausschluss der Kontrollen nur bei den MT (B) zu erkennen. Hier war das durchschnittliche Alter der MT mit PD-Medikamenteneinnahme mit einer Signifikanz von  $p \leq 0,01$  höher (Durchschnitt 52 Jahre) als das Alter derer, die keine Medikamente einnahmen mit durchschnittlich 44 Jahren. Diese waren somit im Durchschnitt fast 8 Jahre jünger als die MT mit PD-Medikation. Anschließend wurde die Gruppe der Kontrollen analysiert. Hier waren dementsprechend keine Probanden, die PD-Medikamente einnahmen. Dennoch waren die Probanden die Medikamente einnahmen mit 48 Jahren noch durchschnittlich 5 Jahre älter als die Probanden, die keine Medikamente bekamen. Diese waren dementsprechend durchschnittlich 43 Jahre alt. Jedoch zeigte sich bei den Kontrollprobanden kein signifikanter Unterschied im Alter zwischen den Gruppen.



**Abbildung 51: Alter der Probanden mit PD-Medikation, mit anderer Medikation und ohne (bekannte) Medikation**

Dargestellt sind alle Probanden (MT und Kontrollen) mit PD-Medikation ( $n=49$ ), ohne PD-Medikation ( $n=230$ ) und ohne (bekannte) Medikation ( $n=108$ ) in (A). In (B) ist das Alter aller MT und in (C) das Alter aller Kontrollen dargestellt. Signifikante Unterschiede des Alters zeigten bei signifikant geringerem Alter ( $p \leq 0,01$ ) der Probanden ohne bekannte Medikation und den Probanden mit PD-Medikation, sowie ebenfalls bei geringerem Alter der Probanden ohne Medikation, gegenüber der Probanden ohne PD-Medikation mit  $p \leq 0,05$ . Im Vergleich der MT war ebenfalls eine Signifikanz mit  $p \leq 0,01$  zwischen den MT ohne Medikation und denen mit PD-Medikation mit geringerem Alter der MT ohne Medikation festzustellen.

### 3.4.4 Vergleich der Parkin Protein-Level in PBMCs zwischen Kontrollen und MT in Bezug auf die Medikation



**Abbildung 52: Höhe der Parkin Protein-Level bei Probanden (MT und Kontrollen) mit PD-Medikation, ohne PD-Medikation und ohne (bekannte) Medikation**

In (A) ist die Höhe der Parkin Protein-Level der Probanden mit PD-Medikation ( $n=43$ ), mit Medikation, die keine PD-Medikamente bekam ( $n=160$ ) und Probanden ohne (bekannte) Medikation ( $n=79$ ). Für  $n=128$  Probanden konnten keine Parkin Protein-Level bestimmt werden. Anschließend erfolgte eine Aufteilung von (A): in nur MT (B) und nur Kontrollen (C). Hierbei zeigt sich, dass der signifikante Unterschied aus A zwischen Probanden ohne PD-Medikation und ohne (bekannte) Medikation innerhalb der MT lagen.

Folgend sollte ein potenzieller Einfluss der Medikation auf die Höhe der Parkin Protein-Level untersucht werden.

Abbildung 52 zeigt die Höhe der Protein-Level bei Probanden, die Medikamente zur Behandlung von PD-Symptomen (vgl. Tabelle 41) bekamen, Probanden, die Medikamente bekamen, jedoch keine zur Behandlung von PD-Symptomen, und die Höhe der Protein-Level der Probanden, die keine Medikation bekamen, bzw. für die keine Medikation bekannt war. Für 128 Probanden konnte die Höhe der Protein-Level für diese Arbeit bisher nicht bestimmt werden, diese sind in Abbildung 52 daher nicht erfasst worden. In (A) handelte es sich um alle MT und Kontrollen, in (B) und (C) wurden die in (A) dargestellten Probanden aufgeteilt in MT (B) und Kontrollen (C). Erkennbar war hierbei in A eine signifikant geringere

Höhe der Protein-Level für die Probanden, die keine Medikation bekamen mit einem Median von  $\Delta c=13$  im Vergleich zu denen, welche eine Medikation bekamen mit einem Median von  $\Delta c=22$  mit PD-Medikation und einem Median von  $\Delta c=25$  mit anderer Medikation als PD. Dies äußerte sich mit einer Signifikanz von  $p \leq 0,05$ . Weiterhin war erkennbar, dass die Protein-Level der Probanden, die Parkinson-Medikamente erhielten im Mittel am höchsten ausfiel. Auch in (B) war diese Signifikanz von  $p \leq 0,05$  bei den MT mit im Median deutlich höheren Werten mit PD-Medikation ( $\Delta c=22$ ) und anderer Medikation ( $\Delta c=24$ ) im Vergleich zu Probanden ohne Medikamenteneinnahme ( $\Delta c=10$ ) festzustellen. Die in (C) dargestellten Kontrollprobanden zeigten sowohl ohne PD-Medikation ( $\Delta c=20$ ) als auch ohne bekannte Medikation ( $\Delta c=18$ ) keine deutlichen Unterschiede in den Protein-Leveln. Da es sich in (C) um Kontrollen handelte waren unter diesen keine Probanden mit PD-Medikation. Dennoch war auffällig, dass der Median im Vergleich bei den Kontrollen ohne Medikation geringer war als bei den MT ohne Medikation.

#### *3.4.5 Vergleich der PARK2 SNPs in PBMCs zwischen Kontrollen und MT in Bezug auf die Medikation*

Nachdem die *PARK2* SNPs bereits mit den Parkin Protein-Leveln korreliert wurden, sollten diese ebenfalls in Korrelation zu den klinischen Daten gesetzt werden. Für diese Analyse war es möglich jeweils 47 Probanden für den SNP des Parkin Exon 4 und Exon 10 und 49 Probanden für den SNP des Parkin Exon 11 einzubeziehen, da für diese Probanden genetische Daten vorhanden waren. Eine Auflistung aller Probanden, für die klinische Daten zur PD-Medikation vorhanden waren, findet sich im Anhang (Anhang 13 und Anhang 14). Tabelle 42 zeigt lediglich die Anzahl der Probanden mit PD-Medikation für die jeweiligen Genotypen. Erkennbar ist, dass keine Probanden vorhanden waren, die sowohl den seltenen Genotypen A/A des Exon 4 als auch Exon 11 hatten, sowie bei Exon 10 nur ein Proband den Genotypen C/C aufwies. Eine prozentuale Verteilung der Genotypen für die unterschiedlichen SNPs und ihre genomische Lokalisation (Exone im Parkin) ist in Abbildung 53 ersichtlich. Da eine geringe

Probenanzahl für einige Genotypen vorlag, ließen sich keine Signifikanzen ermitteln.

Tabelle 42: Probanden mit PD-Medikation und Anzahl der PARK2 SNPs je Genotyp

SNP	Genotyp	Anzahl
Parkin Exon 4 Bp601	A/A	0
	A/G	3
	G/G	44
Parkin Exon 10 Bp1239	C/C	1
	G/C	16
	G/G	30
Parkin Exon 11 Bp1281	A/A	0
	G/G	46
	A/G	3

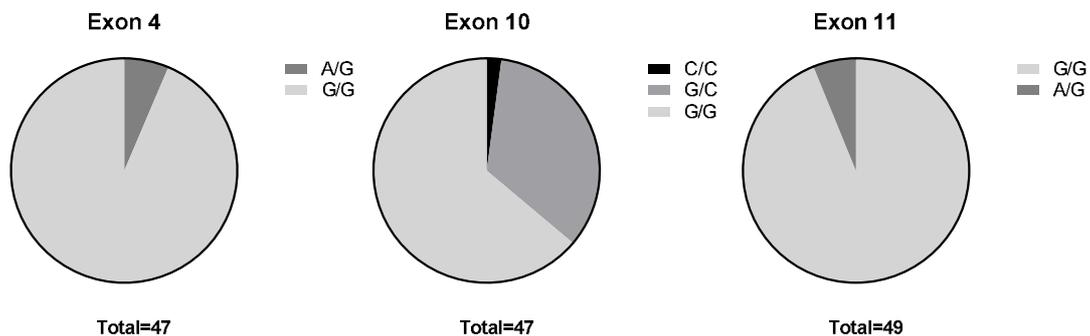


Abbildung 53: SNP-Verteilung der Probanden mit PD-Medikation

Zu erkennen ist die Verteilung der SNPs für Exon 4, Exon 10 und Exon 11 wie in Tabelle 42 beschrieben. Bei Exon 4 haben 6 % der Patienten den Genotyp A/G und 94 % den Genotyp G/G, der Genotyp A/A ist nicht vertreten. Mit 2 % ist der Genotyp C/C bei Exon 10 vertreten, G/C mit 34 % und G/G mit 64 %. 94 % der Probanden haben den Genotyp G/G bei Exon 11 und 6 % den Genotyp A/G, 0 % der Probanden mit PD-Medikation haben den Genotyp A/A. Aufgrund der geringen Probandenanzahl für viele der Genotypen ließen sich keine Signifikanzen statistisch ermitteln.

### *3.4.6 Untersuchung der Probanden mit PD-Medikation auf ihre Einteilung in die INAS-Untergruppen*

Anschließend sollten auch die INAS-Untergruppen genauer betrachtet werden, da im INAS nicht-motorische Symptome wie Reflexe, motorische, sensorische und ophthalmologische Symptome abgebildet werden und dies zusätzliche Informationen zu weiteren Parkinson-Symptomen wie beispielsweise Rigor und Tremor liefern. Um den Zusammenhang zwischen der PD-Medikation und weiteren klinischen Tests zu untersuchen, sollte eine Gegenüberstellung der INAS-Untergruppen und der Medikation erfolgen. Eine Übersicht der INAS-Untergruppen stellt Tabelle 43 dar.

Die Einteilung der INAS-Untergruppen erfolgte über einen ja/nein-Entscheid. Die Auswertung erfolgte bei der BL-Untersuchung mittels eines Untersuchungsbogens, wie im Anhang zu finden (Anhang 2). Wurde bei den Probanden eine Auffälligkeit des INAS-Scores festgestellt, waren diese positiv, also mit „ja“ bewertet, andernfalls erfolgte eine Einteilung zu „nein“.

Für 37 Probanden mit PD-Medikation konnten die INAS-Untergruppen (wie in Tabelle 43 beschrieben) bestimmt werden, für alle restlichen Probanden mit PD-Medikation, waren keine Informationen über die INAS-Untergruppen vorhanden, sowie für 188 Probanden ohne PD-Medikation und 70 Patienten ohne (bekannte) Medikation. Für 133 Probanden hingegen lagen bisher keine INAS-Untergruppen vor, daher konnten diese nicht mit in die Auswertung einbezogen werden. Diese Darstellung erfolgte in den Abbildungen 54 und 55. Erkennbar war, dass viele Probanden ohne PD-Medikation positive INAS-Untergruppen aufwiesen und im Vergleich dazu wenige Probanden ohne (bekannte) Medikation, bei denen jedoch auch die geringste Anzahl an Probanden vorlag, positive INAS-Untergruppen hatten. Mit  $p \leq 0,001$  war die Anzahl der Probanden mit Medikation höher, die Auffälligkeiten in den INAS-Untergruppen zeigten, als bei den Probanden, die keine Medikamente einnahmen. Im Folgenden soll herausgearbeitet werden, in welchen INAS-Untergruppen am häufigsten Symptome gezeigt wurden und welche Medikation diese Probanden bekamen.

Tabelle 43 stellt die einzelnen INAS-Untergruppen dar, sowie die Anzahl der Probanden (n=295), die in einem ja/nein Entscheid für „ja“ zu den jeweiligen INAS-Untergruppen eingeteilt wurden. Zusätzlich erfolgte die Aufteilung in die 3 Gruppen 1) Mit PD-Medikamenten, 2) mit anderen Medikamenten als PD-Medikamente und 3) ohne (bekannte) Medikamente. Es erfolgte eine prozentuale Einteilung innerhalb der 3 Gruppen für die Probanden, die beim ja/nein Entscheid mit „ja“ eingestuft wurden.

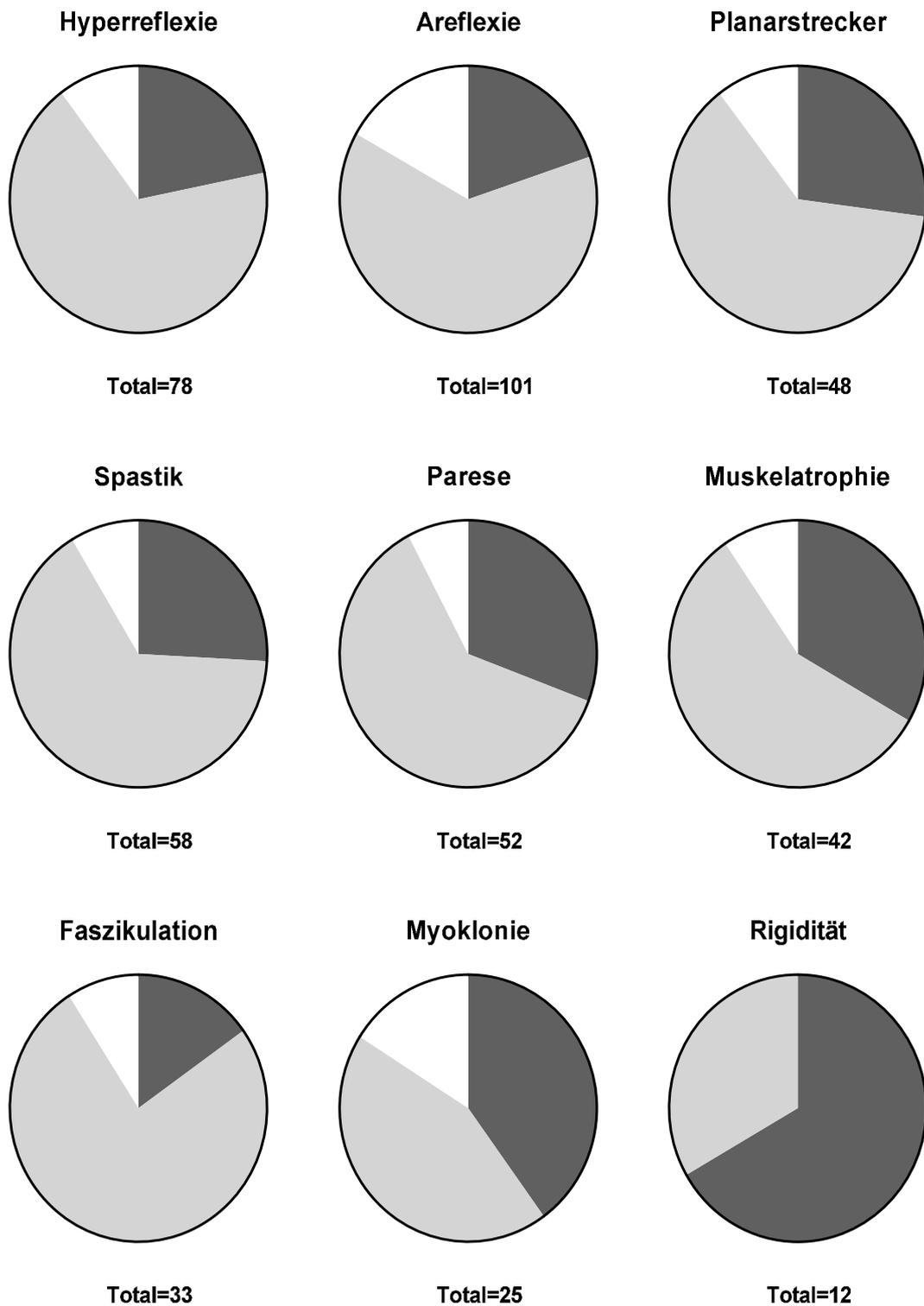
*Tabelle 43: Übersicht der INAS-Untergruppen mit Anzahl der Probanden die in den jeweiligen INAS-Untergruppen Symptome zeigten, sowie deren Medikation eingeteilt in (1) Mit PD-Medikamenten, (2) Ohne PD-Medikamente und (3) Ohne (bekannte) Medikation (in %) und (4) die Anzahl der Probanden insgesamt die im ja/nein Entscheid ein „ja“ der jeweiligen INAS-Untergruppe hatten*

INAS-Untergruppen	Mit PD-Medikamenten (n=37) (%)	Mit anderen Medikamenten als PD-Medikamente (n=188) (%)	Ohne (bekannte) Medikamente (n=70) (%)	Anzahl Probanden die im ja/nein Entscheid „ja“ für die jeweilige INAS-Untergruppe aufwiesen
Hyperreflexie (gesteigerte Reflexbereitschaft)	21,79	67,95	10,26	78
Areflexie (vollständiges Fehlen eines oder mehrerer Reflexe)	19,8	63,37	16,83	101
Plantarstrecker	27,08	62,5	10,42	48
Spastik (Verhärtung und Steifheit von Muskeln, die	25,86	65,52	8,62	58

Bewegung, Körperhaltung und das Gleichgewicht erschweren)				
Parese (Teilausfall motorischer Funktionen einzelner Muskel oder Muskelgruppen oder einer Extremität)	30,77	61,54	7,69	52
Muskelatrophie (Muskelschwund)	33,33	57,14	9,52	42
Faszikulation (unwillkürliche feine Zuckungen kleiner Muskelfasergruppen)	15,15	75,76	9,09	33
Myoklonie (rasche unwillkürliche Muskelzuckungen)	40	44	16	25
Rigidität (Steifigkeit)	66,67	33,33	0	12
Dyskinesie (durch unwillkürliche, anhaltende Muskelspannung)	33,33	66,67	0	9
Dystonie (durch unwillkürliche Muskelkontraktion)	34,78	56,52	8,7	46
Anhaltender Tremor (Ruhetremor)	40	20	40	5

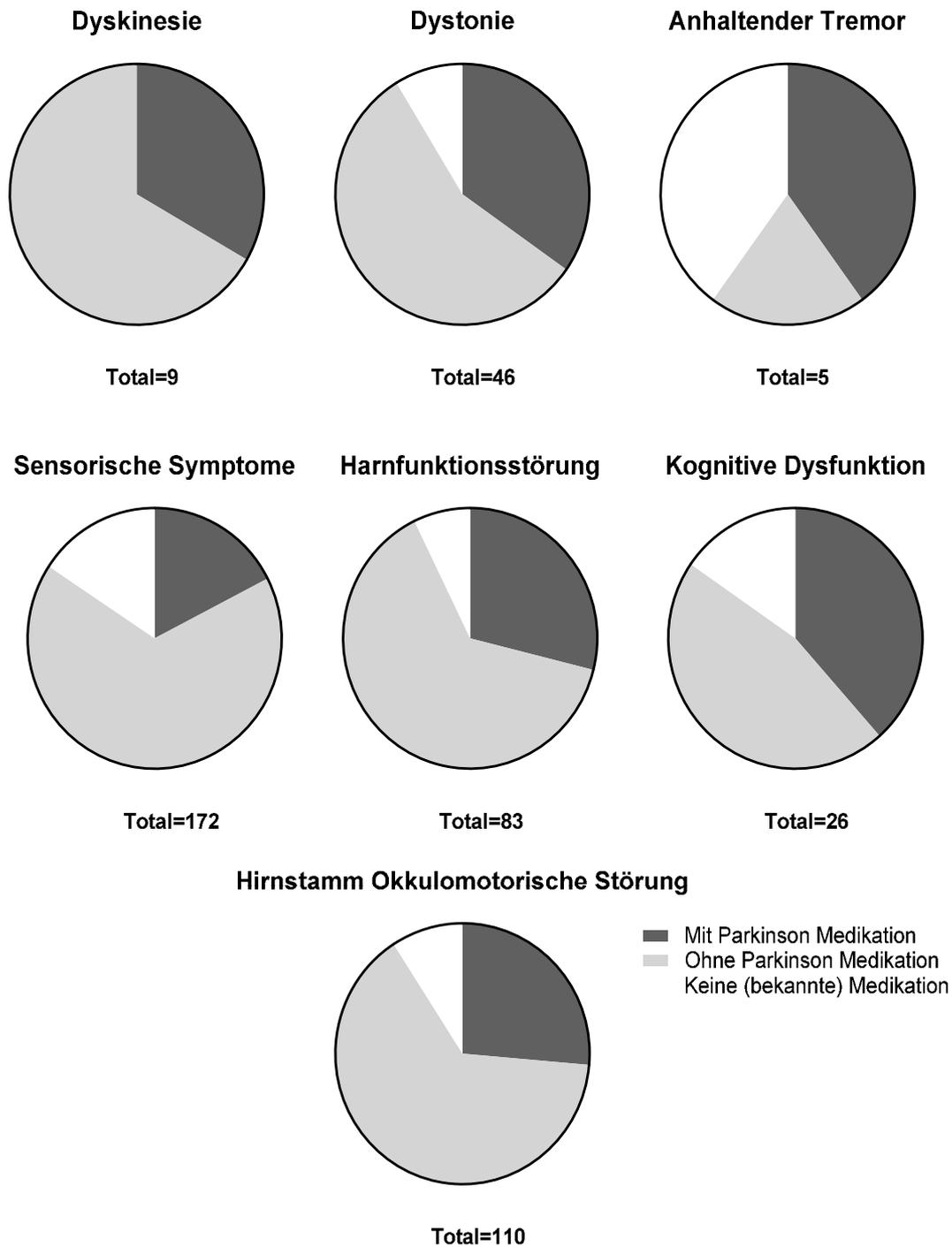
Sensorische Symptome (hier gestörter Vibrationssinn in den Füßen)	17,44	66,86	15,7	172
Harnfunktionsstörung	28,92	63,86	7,23	83
Kognitive Dysfunktion	38,46	46,15	15,38	26
Hirnstamm Okkulomotorische Störung	26,36	64,55	9,09	110

Für alle Probanden, die mit ja zu den 16 INAS-Untergruppen zugehörig waren, wurde der prozentuale Anteil in die 3 Gruppen in den Abb. 53 und Abb. 54 veranschaulicht. In Dunkelgrau sind alle Probanden mit PD-Medikation dargestellt, in hellgrau die Probanden, die eine Medikation bekamen, aber keine PD-Medikamente und in weiß die Probanden, die laut eigener Angaben keine Medikamente einnahmen. Für jede INAS-Untergruppe ist die totale Anzahl der Probanden, die Symptome in den jeweiligen INAS-Untergruppen zeigten, angegeben. Erkennbar ist, dass die meisten Probanden Symptome der Areflexie, Harnfunktionsstörungen, sowie sensorische Störungen und okkulomotorische Störungen zeigten. Wenige Probanden zeigten Symptome wie Rigidität, Dyskinesie und einen anhaltenden Tremor. Eine weitere Auffälligkeit zeigte sich darin, dass es keine Probanden ohne Medikamenteneinnahme gab, die Symptome wie Rigidität und Dyskinesie zeigten. Zusätzlich wird veranschaulicht, dass für alle INAS-Untergruppen der Anteil der Probanden ohne PD-Medikation am höchsten war und der Anteil der Probanden, die keine Medikation bekommen, am geringsten.



**Abbildung 54: INAS-Untergruppen**

Darstellung der INAS-Untergruppen: Hyperreflexie, Areflexie, Planarstrecker, Spastik, Parese, Muskelatrophie, Faszikulation, Myoklonie und Rigidität mit Totaler Probandenanzahl, die Symptome in diesen Gruppen aufwies, sowie einer anteiligen Darstellung der Medikamenteneinnahme in (1) dunkelgrau: Mit PD-Medikation, (2) hellgrau: Ohne PD-Medikation und (3) weiß: keine Medikation



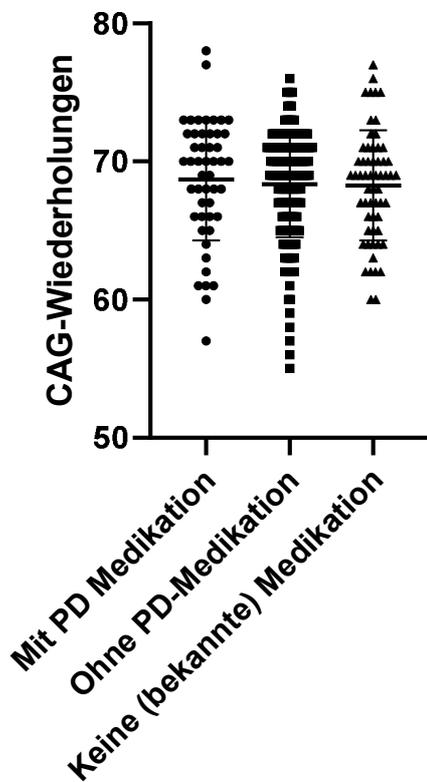
**Abbildung 55: INAS-Untergruppen**

Darstellung der INAS-Untergruppen: Dyskinesie, Dystonie, anhaltender Tremor, Sensorische Symptome, Harnfunktionsstörung, kognitive Dysfunktion, Hirnstamm Okkulomotorische Störungen mit Totaler Probandenanzahl, die Symptome in diesen Gruppen aufwies, sowie einer anteiligen Darstellung der Medikamenteneinnahme in (1) dunkelgrau: Mit PD-Medikation, (2) hellgrau: Ohne PD-Medikation und (3) weiß: keine (bekannte) Medikation

### 3.4.7 Zusammenhang PD-Medikation und CAG-Wiederholungen des mutierten ATXN3-Gens

Nachdem bei allen Probanden (MT und Kontrollen) untersucht wurde, welche Medikation (PD-Medikation, eine andere Medikation oder keine Medikation) eingenommen wurde und eine Untersuchung des Alters, sowie deren Geschlecht, Parkin Protein-Level, SNPs und INAS-Untergruppen gemacht wurde, sollten im Anschluss nur die SCA3-Patienten (MT), die eine PD-Medikation bekamen, genauer betrachtet werden. Die Analysen sollten zeigen, ob ein Zusammenhang der Medikamenteneinnahme, speziell von PD-Medikamenten und der *CAG-Repeats* in unseren Daten feststellbar waren, der Rückschlüsse auf einen Zusammenhang der *Repeats* auf die PD-Symptome schließen lässt. Denn dieser Zusammenhang zwischen PD-Symptomen und Anzahl an CAG-Wiederholungen wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben. In Untersuchungen wurde vermutet, dass SCA3-Patienten mit PD-Symptomen eher eine geringere Anzahl an expandierten CAG-Repeat-Wiederholungen im Vergleich zu Patienten ohne PD-Symptome zeigten (Gwin-Hardy et al., 2001) und diese eher unter 70 *CAG-Repeats* lagen (Kuo et al., 2022).

Folgend wurden also vorerst die CAG-Wiederholungen in Bezug zur Medikation gestellt und in Abbildung 56 dargestellt. Hierbei wurde unterteilt in MT mit PD-Medikation, ohne PD-Medikation und ohne Medikation. Zwischen den Gruppen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Jedoch war erkennbar, dass in diesen Daten die CAG-Wiederholungen für alle 3 Gruppen bei einem Mittelwert von 68 *CAG-Repeats* lag. Der Mittelwert der SCA3-Patienten mit PD-Medikation war dabei mit 68,71 geringfügig höher als der der Patienten ohne PD-Medikamente (68,37) und derer ohne Medikamenteneinnahme (68,27). Unter den hier aufgeführten Probanden fanden sich keine Patienten, die eine intermediäre Repeat-Länge, also eine CAG-Repeat-Länge von 45-54 Wiederholungen hatten.



**Abbildung 56: Anzahl der CAG-Wiederholungen des mutierten ATXN3-Gens bei MT mit PD-Medikation, ohne PD-Medikation (anderer Medikation) und ohne (bekannte) Medikation**

Aufgeführt sind die Anzahl der CAG-Wiederholungen des mutierten ATXN3-Gens bei SCA3-Patienten (mit mutiertem ATXN3-Gen) mit PD-Medikation ( $n=49$ ), ohne PD-Medikation ( $n=176$ ) und ohne (bekannte) Medikation ( $n=59$ ). Der Mittelwert der CAG-Wiederholungen liegt bei allen Gruppen ungefähr bei 68 Repeats und zeigt somit keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Medikamenteneinnahme und somit auf die PD-Symptome.

### 3.4.8 Untersuchung der SCA3-Patienten mit klinischen Daten für den SARA-Untergruppe 7

Die 49 SCA3-Patienten, die PD-Medikation bekamen, sollten anschließend auf mögliche Unterschiede in ihren klinischen Scores untersucht werden. Hier erschien es sinnvoll sich vorerst auf den SARA-Score und den INAS-Score zu beschränken und hierbei lediglich die *ITEMS* genauer zu beleuchten, die ebenfalls einen Aufschluss über bestehende Parkinson-Symptome geben können. Daher eigneten sich SARA ITEM 7, INAS 10 und INAS 13. Hierzu findet

sich im Anhang eine Übersicht zur klinischen Einteilung der Patienten, sowohl zum SARA-Score als auch zum INAS-Score (Anhang 1 und Anhang 2). SARA-Untergruppe 7 beschreibt die schnell wechselnde Handbewegung, INAS 10 die Steifigkeit und INAS 13 den Ruhetremor. Wie in Tabelle 43 zu entnehmen ist, erfolgte die Einteilung des SARA einmal für die rechte Hand und einmal für die linke Hand. Aus diesen beiden Werten wurde anschließend ein Mittelwert errechnet, der zur Übersicht dient. Mittels dieses Wertes konnten die 49 SCA3-Patienten in drei Gruppen nach dem erzielten Punktwert für die SARA-Untergruppe 7 eingeteilt werden: (I) SARA7 0-1, (II) SARA7 1-2, (III) SARA7 3-4. Nach Einteilung dieser 3 Gruppen wurden diese untereinander bezüglich Anzahl, Geschlecht, Alter, PD-Medikamente, INAS- Untergruppen 10 und 13, sowie RLS und RLS-Medikation verglichen. Zur Übersicht stellt Tabelle 44 diese Vergleiche dar. Erkennbar ist, dass die meisten Patienten (23) in Gruppe (I), also SARA 7 mit 0-1 erzielten Punkten, eingeteilt werden konnten. Zu Gruppe (II) und (III) konnten jeweils 13 SCA3-Patienten mit PD-Medikation zugeordnet werden. Die Verteilung der männlichen und weiblichen Patienten schien ausgeglichen. Das durchschnittliche Alter der Gruppe (I) ist mit 52 Jahren ebenso hoch wie bei Gruppe (II), bei Gruppe (III) hatten die Patienten ein geringeres durchschnittliches Alter von 46 Jahren. Die gegebenen PD-Medikamente zeigten keine Regelmäßigkeit eines bestimmten Medikamentes in einer der Gruppen.

Tabelle 44: Vergleich von SARA 0-1 (I), 1,5-2,5 (II), 3-4 (III) bezüglich Anzahl, Geschlecht, Alter, PD-Medikamente, INAS 10 und 13, RLS, RLS-Medikation. Dabei werden nur SCA3-Patienten mit PD-Medikation einbezogen.

	(I) SARA 0-1	(II) SARA 1,5-2,5	(III) SARA 3-4
Anzahl	Weiblich: 12 Männlich: 9 unbekannt: 1 Gesamt: 22	Weiblich: 7 Männlich: 6 unbekannt: 0 Gesamt: 13	Weiblich: 5 Männlich: 7 unbekannt: 0 Gesamt: 12
Alter (Durchschnitt)	52	52	46
PD-Medikament	Amantadine Parkadina Pramipexol Ropinirole Rotigotine Metodura Isicom Levodopa Carbidopa Trihexyphenidyl	Levodopa Ropinorol Rotigotin, Amantadine Madopa Parkadina, Pramipexole Trihexyphenidyl B-Neurax, Pramipexole Benserazid Trihexyphenidyl Pregubalin Tramadol Madopa	Trihexyphenidyl Pramipexole Biperidin Amantadine Levodopa Carbidopa Benserazidehydrochlorid Ropinirol Selegiline
INAS 10	ja: 2 nein: 19 unbekannt: 2	ja: 4 nein: 6 unbekannt: 3	ja: 2 nein: 4 unbekannt: 7
INAS 13	ja: 0 nein: 21 unbekannt: 2	ja: 1 nein: 9 unbekannt: 2	ja: 1 nein: 5 unbekannt: 7

RLS	ja: 11 nein: 11 unbekannt: 1	ja: 6 nein: 5 unbekannt: 1	ja: 1 nein: 12 unbekannt: 0
RLS- Medikament	ja: 9 nein: 14	ja: 5 nein: 8	ja: 1 nein: 12

Bei INAS 10 zeigte sich im Vergleich zwischen den Gruppen, dass die anteilige Häufigkeit des Vorhandenseins (ja) der Rigidität bei (II) und (III) höher lag als bei SARA (I), was jedoch auch an der im Vergleich geringeren Probandenanzahl liegen kann. INAS 13 (Ruhetremor) kam jeweils nur bei einem Patienten in Gruppe (II) und (III) vor. Das *Restless-Leg-Syndrom* (RLS) hingegen konnte häufiger bei SARA (I) und (II), als bei SARA (III) festgestellt werden. Die meisten Probanden, die ein RLS hatten, bekamen auch RLS-spezifische Medikamente.

### 3.4.9 Zusammenfassung der Ergebnisse aus 3.4.

Nach der Zusammenfassung der Ergebnisse der Parkin Protein-Level soll folgend auch für die klinischen Daten eine tabellarische Übersicht der Ergebnisse in Tabelle 45 mit Zusammenfassung der Ergebnisse aus 3.4. gezeigt werden.

Tabelle 45: Zusammenfassung der Ergebnisse aus 3.4.

Klinische Daten	Ergebnisse
PD-Medikamente	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 20 verschiedene PD-Medikamente wurden eingenommen</li> <li>- 49 Probanden mit PD-Medikamenteneinnahme</li> <li><b>(I) Einteilung in Probanden (MT und Kontrollen), MT, Kontrollen</b></li> <li>- Alle Probanden (MT und Kontrollen): Großteil nahm Medikamente ein, geringer Anteil (12 %) nahm PD-Medikamente ein, 29 % nahmen keine Medikamente</li> <li>- von den Kontrollen nahm keiner PD-Medikamente ein, ca. die Hälfte nahm keine Medikamente, die andere Hälfte nahm andere Medikamente als PD-Medikamente ein</li> <li>- MT: alle Probanden die PD-Medikamente einnahmen waren MT, mehr MT nahmen keine Medikamente ein als die, die PD-Medikamente einnahmen</li> <li><b>(II) Einteilung in Kontrollen, nicht atakt. MT, atakt. MT und MT ohne bekannten SARA</b></li> <li>- mit PD-Medikation keine Kontrollen, 4 % nicht atakt. MT und 96 % atakt. MT</li> <li>- mit Medikation 25 % Kontrollen, nicht. atakt. MT 12 %, atakt. MT 60 % und Probanden ohne bekannten SARA 3 %</li> <li>- ohne Medikation waren 50 % Kontrollen, nicht atakt. MT 20 % und atakt. MT 29 %, 5 % ohne bekannten SARA</li> </ul>
Geschlecht	<ul style="list-style-type: none"> <li>- keine signifikanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern Männlich und Weiblich</li> </ul>

Alter	<p><b>(A) Probanden (MT und Kontrollen)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Probanden mit PD-Medikation waren älter als Probanden ohne Medikamenteneinnahme</li> <li>- Probanden mit Medikamenteneinnahme waren älter als Probanden ohne Medikamenteneinnahme</li> </ul> <p><b>(B) MT</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- MT mit PD-Medikamenten waren älter als MT ohne Medikation</li> <li>- Alter MT mit PD-Medikation war signifikant höher</li> </ul> <p><b>(C) Kontrollen</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- keine Kontrollen mit PD-Medikation</li> <li>- Kontrollen ohne PD-Medikation waren älter als Kontrollen ohne Medikamenteneinnahme</li> </ul>
Parkin Protein-Level	<p><b>(A) MT und Kontrollen</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Parkin Protein-Level am höchsten bei Probanden mit PD-Medikation</li> <li>- Parkin Protein-Level am niedrigsten bei Probanden ohne Medikamenteneinnahme</li> <li>- Protein-Level signifikant niedriger bei Probanden ohne Medikamenteneinnahme als Probanden mit Medikamenteneinnahme</li> </ul> <p><b>(B) MT</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Parkin Protein-Level am höchsten bei MT mit PD-Medikation</li> <li>- Protein-Level signifikant niedriger bei MT ohne Medikamenteneinnahme als MT mit Medikamenteneinnahme</li> </ul> <p><b>(C) Kontrollen</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Parkin Protein-Level bei Kontrollen mit Medikamenteneinnahme und ohne Medikamenteneinnahme vergleichbar niedrig</li> </ul>
PARK2 SNPs	<b>Exon 4</b>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 6 % Genotyp A/G und</li> <li>- 94 % Genotyp G/G</li> <li>- Genotyp A/A ist nicht vertreten</li> </ul> <p><b>Exon 10</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Genotyp C/C 2 %</li> <li>- G/C mit 34 %</li> <li>- G/G 64 %</li> </ul> <p><b>Exon 11</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 94 % Genotyp G/G</li> <li>- 6 % den Genotyp A/G</li> <li>- 0 % der Probanden mit PD-Medikation haben den Genotyp A/A</li> </ul> <p>- aufgrund der geringen Probandenanzahl für viele der Genotypen ließen sich keine Signifikanzen ermitteln</p>
INAS- Untergruppen	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 16 Untergruppen</li> <li>- ohne Medikamenteneinnahme signifikant niedrigere Anzahl an Probanden, die INAS-Auffälligkeiten zeigten im Vergleich mit Probanden ohne PD-Medikation</li> <li>- häufigste Symptome: Areflexie, Harnfunktionsstörungen, sensorische Störungen und Okkulomotorische Störungen</li> <li>- wenige Probanden zeigten Symptome wie Rigidität, Dyskinesie und einen anhaltenden Tremor</li> <li>- keine Probanden ohne Medikamenteneinnahme , die Symptome wie Rigidität und Dyskinesie zeigten</li> <li>- Anteil der Probanden ohne PD-Medikation am höchsten ist</li> <li>- Anteil der Probanden, die keine Medikation bekommen am geringsten</li> </ul>
CAG- Wiederholung	<ul style="list-style-type: none"> <li>- CAG-Wiederholung für alle 3 Gruppen bei einem MW von 68 <i>Repeats</i></li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- geringfügig höher bei MT mit PD-Medikation (68,71)</li> <li>- keine signifikanten Unterschiede</li> </ul>
<i>SARA-Score</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- nur Probanden mit PD-Medikation (n=49)</li> <li>- durchschnittliches Alter in allen Gruppen 52 Jahre</li> <li>- keine Auffälligkeiten in der Einnahme von PD-Medikamenten</li> <li>- die meisten Probanden konnten Gruppe (I) SARA 1-2 zugeordnet werden</li> <li>- vergleichbare Anzahl INAS 10 und INAS 13 in den 3 Gruppen</li> <li>- RLS-Symptome und RLS-Medikamente am häufigsten in Gruppe (I) SARA 1-2</li> </ul>



## 4 Diskussion

Um die neurodegenerative Erkrankung Spinozerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3) besser zu verstehen und die große Bandbreite an Symptomen der SCA3 nachvollziehen zu können, sowie bestenfalls zu therapieren, ist es wichtig die Neuropathologie der strukturellen Basis der SCA3-Patienten besser zu verstehen. Hierbei spielen sowohl genetische als auch klinische Faktoren eine große Rolle.

Die Forschung befasst sich besonders mit der möglichen Früherkennung des Krankheitsbeginns über Biomarker, sowie der Untersuchung der Krankheitsmodulatoren und Einflussfaktoren.

Weitere Ansätze der Therapie sind von großem Interesse, da es sich bei der SCA3 um die häufigste ADCA handelt und es bisher nur möglich ist die klinischen Symptome zu lindern, eine bewährte Therapie zur Behandlung der SCA3 hingegen jedoch noch fehlt (McLoughlin et al., 2020; Paulson et al., 2017). Weitere Erkenntnisse auf genetischer als auch auf klinischer Ebene sollen helfen schlussendlich therapeutische Maßnahmen zur Bekämpfung dieser progressiven ataktischen Störung zu finden.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss des Proteins Parkin auf die Pathogenese der SCA3.

Um diesen Einfluss in verschiedenen Bereichen zu untersuchen, erfolgte die Einteilung in Teil A mit der Analyse des Mausmodells mit Metabolomanalyse einerseits und Verhaltensanalyse andererseits und in Teil B mit der Analyse der ESMI-Probanden anhand ihrer Parkin Protein-Level und bezüglich der klinischen Daten. Zudem erfolgt eine genauere Betrachtung hinsichtlich bestehender Zusammenhänge zwischen der SCA3 mit dem Parkinson-ähnlichen Phänotyp, welcher sich in einigen SCA3-Patienten zeigt (Bettencourt, Santos, et al., 2011).

## 4.1 TEIL A: Mausmodell

### 4.1.1 Auswertung der Metabolomdaten des Mausmodells

Zur Analyse des Einflusses von Parkin auf die Pathogenese der SCA3 fanden Vergleiche der Metabolite zwischen vier verschiedenen Genotypen im Mausmodell statt: Zwischen Wildtyp, SCA3 YAC (Cemal et al., 2002), PARK2 ko (Itier et al., 2003) und der Kreuzung dieser beiden Genotypen: dm-YAC/PARK. Der Hauptpathogeneseort der SCA3 befindet sich mit der Degeneration des Kleinhirns und weiterer Bereiche des Nervensystems hauptsächlich im Cerebellum (Bettencourt & Lima, 2011). Daher erfolgte für die Untersuchung der Metabolite eine Probenentnahme des Cerebellums mit 2 und 12 Monaten bei allen vier Genotypen. Hierbei diente die Probenentnahme mit 2 Monaten als Baseline der Untersuchung, ohne zu erwartende Pathologie in Form von Aggregaten und neurologischem Phänotyp, und die Probenentnahme mit 12 Monaten zur Veranschaulichung der neurologischen Entwicklung mit neurologisch sichtbarer Pathologie, Aggregaten und falls vorhanden, mit neurologischem Phänotyp. Zusätzlich gab es einen zweiten Entnahmeort, bei dem Plasmaproben gewonnen wurden. Denn Plasmaproben sind im Vergleich dazu relativ einfach zu gewinnen und somit auch weniger invasiv für den Patienten im Gegensatz zu anderen gängigen Entnahmeorten wie beispielsweise bei der Gewinnung von Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit (*Cerebrospinal fluid*, CSF).

Die Ergebnisse dieses Entnahmeortes sollten als Vergleich dienen, um eine mögliche Aussagekraft der Plasmaproben zu beurteilen. Sollten sich Gemeinsamkeiten zwischen Plasma und dem eigentlichen Pathogeneseort Cerebellum finden lassen, so könnten diese Plasmaproben in folgenden Studien genutzt werden um Biomarker zu gewinnen und den Krankheitsverlauf zu untersuchen.

Sowie möglicherweise dazu führen, dass bereits durch Plasmaproben eine Aussage über den Krankheitsverlauf getroffen werden können und das AAO der Erkrankung genauer zu bestimmen um dadurch die deutlich invasiveren

Methoden zur Bestimmung des Krankheitsverlaufs, wie beispielsweise Probenentnahme von CSF, abzulösen.

In neueren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Biomarker für die Neurodegeneration mit hoher Korrelation zwischen Gehirn und Plasma bzw. Serum existieren. Dies zeigten beispielsweise Untersuchungen des Markerproteins Neurofilament leichte Ketten (NFL). Hier konnten bereits in präataktischen SCA3-Mutationsträgern erhöhte NFL-Werte auch im Plasma detektiert werden (Faber et al., 2023; Wilke et al., 2022). Dies kann in weiteren möglicherweise longitudinalen Studien dazu führen, dass die Bestimmung des Verlaufs der Serum-NFL-Werte in präataktischen MT Aufschluss darüber geben kann zu welchem Zeitpunkt mit dem Ausbruch der Erkrankung zu rechnen ist. Der Vergleich der Ergebnisse der Metabolomanalyse fand vorwiegend zwischen den Mutanten (SCA3 YAC, PARK2 ko, dm-YAC/PARK) gegenüber dem Wildtyp statt.

Betrachtet man also die Metabolite im Vergleich zwischen WT und SCA3 YAC konnte man erkennen, dass im Vergleich zwischen WT und SCA3 YAC *3-Hydroxypicolinic-acid* und *3-Hydroxybutyric-acid* im Alter von 2 Monaten im Plasma signifikant erhöht waren, *Creatinine* hingegen mit 12 Monaten im Plasma signifikant verringert. Im Cerebellum dem gegenüber gestellt zeigten sich zu keinem Messzeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den Metaboliten der WT- und SCA3 YAC-Mäuse.

Zwischen WT und PARK2 ko war mit 2 Monaten im Plasma *Thymidine* und *5-AMP | dGMP* signifikant verringert. Im Cerebellum war der *Valin*, *Leucin* und *Isoleucin Metabolismus* signifikant gleich hoch zwischen WT- und PARK2 ko-Mäusen.

Die meisten Signifikanzen zeigten sich somit im Alter von 2 Monate, wo die SCA3-Mäuse keinen neurologischen Phänotyp oder neuropathologische Merkmale wie Aggregate ausprägen (Weber et al., 2020). Die Pathogenese der SCA3-Erkrankung und somit die interessanten Abweichungen in den Metaboliten, wurde jedoch zum Zeitpunkt von 12 Monaten erwartet.

Da bereits mit dem gleichen SCA3 Mausmodell Metabolomanalysen durchgeführt wurden, sollten diese Ergebnisse mit den Metabolomanalysen von Toonen et al. verglichen werden (Toonen et al., 2018).

Auffällig war, dass obwohl beide Analysen vom gleichen Unternehmen durchgeführt wurden, keine vergleichbaren Ergebnisse zwischen Wildtyp und den SCA3 YAC-Mäusen vorlagen. In Tabelle 46 ist eine kurze Übersicht der Metabolite, bei denen in beiden Analysen signifikante Unterschiede gefunden wurden mit Angabe des Entnahmeortes, dem Entnahmezeitpunkt und der Signifikanz (in p), dargestellt.

Dabei ist jedoch auch wichtig zu beachten, dass Unterschiede zwischen den in unseren Daten und in den von Toonen et al. untersuchten Datenerhebungen vorlagen. In unseren Daten erfolgte die Untersuchung von Plasma- und Cerebellum-Proben mit 2 und 12 Monaten bei jeweils 10 Mäusen pro Gruppe (5 männliche, 5 weibliche). Bei Toonen et al. hingegen erfolgten Untersuchungen des Hirnstamms, Cerebellums, Striatums und des Cortexes. Zudem erfolgten die Untersuchungen mit 4, 12 und 16 Monaten bei 4 Mutanten (SCA3 YAC) und 4 WT-Mäusen.

Toonen et al. konnten die meisten metabolitischen Veränderungen im Hirnstamm und Striatum erkennen. In unseren Daten erfolgte jedoch lediglich eine Probenentnahme im Cerebellum, dem Hauptpathogeneseort der SCA3. Das Cerebellum und der Cortex waren laut Toonen et al. wenig betroffen, wie auch in unseren Ergebnissen zu erkennen war.

Die einzigen erhöhten *Foldchanges* die signifikant waren, die sowohl bei Toonen et al. als auch in den in dieser Arbeit ausgewerteten Daten zu finden waren, waren bei den Metaboliten *L-Citrullin* und *Tyrosin*. Hier waren signifikante Veränderungen bei Toonen et al., im Cerebellum zu erkennen, in unseren Daten befanden sich diese signifikanten Unterschiede jedoch im Plasma und auch nicht für den Vergleich der WT-Mäuse mit den SCA3 YAC-Mäusen, sondern ausschließlich für die Gruppe der dm-YAC/PARK Mäuse im Vergleich mit den WT-Mäusen (Tabelle 46).

Tabelle 46: Vergleich der Signifikanzen der Daten Toonen et al mit unseren Ergebnissen mit Angabe des Entnahmeortes, Entnahmezeitpunkt und Signifikanz (in p)

	Toonen			WT vs.		WT vs. dm-	
	WT vs. SCA3	YAC		SCA3	YAC	YAC/PARK	
	Signifikanz (in p)			Signifikanz (in p)		Signifikanz (in p)	
Entnahmeort	Cerebellum			Cerebellum		Plasma	
Entnahmezeitpunkt (Monat)	4	12	16	2	12	2	12
Metabolite							
L-Citrullin	0,009	-	-	-	-	0,14	0,023
Tyrosin	-	0,049	-	-	-	0,033	0,262

Auffällig war, dass die häufigsten signifikanten Veränderungen sich in unseren Daten im Vergleich der dm-YAC/PARK-Mäuse zum WT im Plasma zeigten. Mit signifikant erhöhten FC mit 2 Monaten bei *5-AMP* | *dGMP*, *L-Cysteine-S-sulfate*, *Triethanolamine*, *UMP*, *Argininosuccinic-acid*, *Lysine*, *Cinnamic-acid*, *Nicotinamide*, *Dihydrouracil* | *1-Methylhydantoin*, *2-Oxobutyric-acid*, *3-Methylcrotonyl-glycine* | *N-Tiglylglycine*, *Biotin*, *Phenylalanine*, *3-Hydroxybutyric-acid*, *N-Acetyl-L-alanine*, *Isoleucine* | *Leucine* | *L-Norleucine*, *N-N-Dimethylglycine*, *3-Amino-3-4-hydroxyphenyl-propanoic-acid* | *Tyrosine*, *2-Aminoisobutyric-acid* | *Aminobutyric-acid*, *Histidine*, *UMP*, *Lysine*, *Arginine*, *Panthenol*, *5-Deoxy-5-methylthio-adenosine*, *Cytidine*, *Phenylalanine*, *Leucine* | *L-Norleucine*, *Tyrosine*, *3-Ureidopropionic-acid*, *Histidine*, *L-Glutamine* | *D-Glutamine*, *L-Citrulline*, *O-Phosphorylethanolamine*.

Nur *L-Citrulline* und *L-Aspartic-acid* zeigten signifikant erhöhte FC mit 12 Monaten, dem Zeitpunkt zu dem man eine Pathologie im Gehirn der Tiere erwarten würde.

Sowohl mit 2 als auch mit 12 Monaten erhöhte FC zeigten sich bei *D-Glucuronic-acid* | *D-Galacturonic-acid* | *Galacturonic-acid*, *Malonic-acid*.

Weitere 3 signifikante Unterschiede waren im Vergleich zwischen den WT-Mäusen und den dm-YAC/PARK-Mäusen im Cerebellum zu finden. Es zeigten

sich vergleichbar hohe FC im Alter von 2 Monaten bei *Glycerol-3-Phosphat*. Signifikant verringerte FC der dm-YAC/PARK-Mäusen waren auch bei *N-Acetyl-D-Glucosamin* mit 12 Monaten festzustellen. Signifikant erhöhte FC zeigten sich hingegen für *Aspartylglycosamine* mit 2 Monaten.

Schaut man sich dazu im Vergleich auch Studien in SCA3-Patienten an konnten ebenfalls bestimmte Metabolite als mögliche Biomarker in der SCA3 identifiziert werden: Unterschiede zwischen SCA3-Patienten und gesunden Kontrollen zeigten sich bei Metaboliten, die zum Aminosäure- und Fettsäure-Metabolismus zählen. Als potenzielle Serum Biomarker konnten *palmitoleic acid*, *linolenic acid*, *L-Proline* und *L-Tryptophan* identifiziert werden (Yang et al., 2019). Übereinstimmend mit Toonen et al. hatten diese Ergebnisse, dass auch in dessen Untersuchungen des SCA3 YAC-Mausmodells *Tryptophan* als vielversprechender potenzieller Biomarker beschrieben wurde (Toonen et al., 2018).

In Bezug auf die Ergebnisse in unseren Daten zeigten sich somit keine deutlichen Gemeinsamkeiten, dennoch waren auch die in Yang et al. und Toonen et al. identifizierten Metabolite in unseren Daten vertreten, zeigten aber eher eine geringe Anzahl an signifikanten Auffälligkeiten und konnten somit nicht als potenzielle Biomarker durch uns verifiziert werden. Zum Vergleich ist eine Übersicht aller Metabolite und zugehörigen *Pathways* im Anhang zu finden (Anhang 3, Anhang 4, Anhang 5, Anhang 6).

Aufgrund dieser Ergebnisse scheint das Plasma zur Untersuchung möglicher Biomarker und daher zur Untersuchung von Unterschieden der Metabolite zwischen den Genotypen als unzuverlässig, da die Plasmaproben mit den Ergebnissen der Cerebellumproben im Vergleich zwischen WT und SCA3 YAC starke Abweichungen darstellten und somit vermutlich zu Ungenauigkeiten und einer geringen Aussagekraft führten.

Dennoch schien auch das Cerebellum in beiden Mausstudien keinen aussagekräftigen Aufschluss über bestimmte Metabolite als Biomarker in der SCA3 liefern zu können, da sich dort eine geringe Anzahl an signifikanten Unterschieden in beiden Mausstudien zeigte. Dementsprechend ist die Suche

nach metabolischen Biomarkern und deren Bewertung über Plasmaproben zumindest aus Tiermodellen als fraglich zu beurteilen.

Da in dieser Arbeit zum einen das *PARK2*-Gen, welches für juvenilen PD verantwortlich ist, analysiert wurde und bei einigen SCA3-Patienten unter anderem PD-Symptome vorkommen, sollte ebenfalls genauer betrachtet werden, welche Metabolite in PD bereits bekannt sind und diese sollen mit den in der SCA3 veränderten Metaboliten im Vergleich zu gesunden Kontrollen verglichen werden. Dabei fallen einige Gemeinsamkeiten, aber auch deutliche Unterschiede auf:

Neuere Studien zeigten signifikant reduzierte Konzentrationen von *formic acid* bei PD-Patienten und Einfluss auf den Pyruvat Metabolismus, Methan Metabolismus und den *Kynurenine Pathway*, welcher bekannterweise in PD beeinflusst ist, sowie erhöhte Konzentrationen von *Succinat* (Pathan et al., 2021). Bleibt man bei den signifikant veränderten *Pathways* konnte beobachtet werden, dass der Glycin-, Threonin- und Serin Metabolismus mit dem Alter in PD-Patienten korreliert. Diese Studien zeigten ebenfalls, dass der Tryptophan Metabolismus die PD-Erkrankung charakterisiert. Hohe Glycin-Level modulieren die Freisetzung von Dopamin und Glutamat, aufgrund dessen sich ein gewisses Ungleichgewicht der dopaminergen und muskarinergen Neurone bildet (D'Ascenzo et al., 2022). Ähnlich konnte dies auch in Untersuchungen von Hwangbo et al. festgestellt wurden. Hier zeigte sich ein Zusammenhang von PD mit Alanin, Kynurenin, Tryptophan und Serin im Vergleich mit gesunden Kontrollen. Wie darüber hinaus im Vitamin E and *Urea Cycle* Metabolismus (Hwangbo et al., 2022).

Dies spiegelte sich teilweise in unseren Daten wider. Hier zeigten sich die häufigsten Veränderungen im Purin, Pyrimidin, Alanin, Arginin und Prolin, Aspartat und Glutamat Metabolismus, sowie in der Fructose und Mannose Degradation (Anhang 4 und Anhang 6).

Andere Untersuchungen in PD-Patienten zeigten im Kontrast dazu erhöhte Konzentrationen von *Formic acid* (Nagesh Babu et al., 2018), zudem erhöhte Mengen Arginin und reduzierte Mengen Lysin (Armengou et al., 2003; Virarkar et

al., 2013). Reduzierte Konzentrationen von Lysin konnten schon früh in Untersuchungen von PD-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen sowohl im CSF als auch im Serum/Plasma festgestellt werden (Mally et al., 1997; Molina et al., 1997) und scheinen einen großen Einfluss auf PD-Patienten zu haben. Denn Lysin ist essenziell für den Menschen, da der Neurotransmitter Glutamat im Lysinabbau entsteht (Papes et al., 2001).

In unseren Daten zeigten sich zwar sowohl Lysin als auch Arginin signifikant verändert, jedoch in erhöhten FC mit signifikanten Unterschieden bei Lysin. Diese waren nur im Vergleich zwischen WT und dm-YAC/PARK bei 2 Monate alten Tieren festzustellen. Erhöhte FC bei Arginin konnten ebenfalls nur in 2 Monate alten Tieren und im Vergleich zwischen WT und dm-YAC/PARK beobachtet werden.

Es konnte weiterhin bei PD-Patienten beobachtet werden, dass auch verringerte Konzentrationen von Glutamat und Taurin zu finden waren, sowie im CSF erhöhte Level von Tyrosin. Im Serum/Plasma stellten sich verringerte Level von Aspartat, Serin, Tryptophan und Lysin dar und erhöhte Serum/Plasma Level von Prolin und Homocystein (Jimenez-Jimenez et al., 2020).

In weiteren Studien konnten auch Veränderungen in der Dopamin Synthese, Steroid Hormon Biosynthese, Fettsäure Biosynthese, Synthese und Abbau von Ketonkörpern festgestellt werden, wie auch veränderte Pyruvat, Arginin, Prolin, Alanin, Aspartat, Glutamat, Tyrosin, Phenylalanin Konzentrationen. Und ferner eine Veränderung der Neurotransmission, Störung der Energieproduktion und veränderte Zellmembranstrukturen (Toczyłowska et al., 2020). Auch dies zeigte sich in unseren Daten nur bedingt.

Bisher stellten sich in verschiedenen unterschiedlichen Studien somit eher unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Metabolite dar. Dies bedingt sich zwar teilweise aufgrund der verschiedenen Entnahmestellen (unterschiedliche Bereiche des Gehirns) und verschiedenen Proben (CSF, Serum/Plasma, etc), einen Einfluss auf die Metabolit-Level können möglicherweise aber auch gewisse Medikamente nehmen oder auch unterschiedliche und unzählige andere äußere Einflüsse.

Hinterfragt man also dahingehend die Aussagekraft der Analyse von Plasmaproben für diesen Zweck ist es sinnvoll nach alternativen Möglichkeiten in der Diagnostik zur Bewertung von Biomarkern Ausschau zu halten. Eine dieser Möglichkeiten bietet beispielsweise die Magnetresonanztomografie (MRT), sowie die Protonen-Magnetresonanzspektroskopie (MRS). Diese Diagnostikmöglichkeiten bieten zum einen eine vielversprechende nicht invasive Möglichkeit der Diagnostik als auch die Möglichkeit der Evaluation der Wirksamkeit potenzieller Therapien. N-Acetylaspartat, N-Acetylaspartylglutamat, Glutamat und Taurin waren in Untersuchungen des Cerebellums mit dieser Technik, unabhängig des Alters der Tiere, signifikant verringert in SCA3-Mäusen. Verringerte N-Acetylaspartat-Level schienen ebenfalls zu einer Verschlechterung des klinischen Status in SCA3-Patienten zu führen (Miranda et al., 2022).

Somit scheinen Metabolite im Verlauf der SCA3 Veränderungen zu zeigen, die bisher in unserer Mausstudie, sowie in den Untersuchungen von Toonen et al. nicht abgebildet werden konnten (Toonen et al., 2018).

Betrachtet man weitere Studien zeichnet sich als potenzieller Proteinmarker Interleukin-33 als Biomarker ab, welcher in Proben des Hirnstamms von 6-Monate alten SCA3 YAC-Mäusen als reduziert identifiziert werden konnte (Ramani et al., 2017), sowie in Proben des Gehirns von 17,5 Monate alten Mäusen (Toonen et al., 2018). Auch Aminoacylase-3 konnte sich in Studien durch eine hohe Regulation in 6-Monate alten SCA3 YAC-Mäusen als potenzieller Biomarker auszeichnen (Ramani et al., 2017). Außerdem wurde die Aminoacylase-3 bereits durch seine hohe Regulation in Studien zu HD mehrfach beschrieben (Becanovic et al., 2010; Giles et al., 2012; Langfelder et al., 2016) und ist durch seinen Abbau von N-Acetylaspartat ein häufig verwendeter Marker in der Magnetresonanztomographie, der seine Verwendung nicht nur bei HD sondern auch in der SCA3 findet (Klaes et al., 2016; Lopes et al., 2013).

Neben weiteren Biomarkern wie beispielsweise NFL, der als möglicher sensitiver Biomarker in der SCA3 in Betracht kommt (Faber et al., 2023; Wilke et al., 2022), ergaben sich bei der Suche nach weiteren Biomarkern der SCA3 in neueren Untersuchungen an Probanden zwischen Kontrollen, nicht atakt. MT und atakt. MT anhand von Blutproben die RNA-Expression von SAFB2, SFSWAP und

LTBP4, MEG3, TSPOAP1 als mögliche Marker in der Krankheitsprogression der SCA3 (Raposo et al., 2023). Amyloid Marker sollen in der Lage sein Gedächtnis Dysfunktion und nicht-ataktische Symptome der SCA3 zu identifizieren (Shen et al., 2023).

Es besteht eine hohe Wichtigkeit in der Erforschung der Biomarker, denn durch diese können auch mögliche Therapieansätze erarbeitet werden, die anschließend in weiteren Studien wie Verhaltensanalysen bewertet werden können. Eine Therapie mit Coenzym Q10 zeigte in genetisch veränderten Mäusen bereits positive Effekte auf das Gangbild sowie ein gesteigertes Überleben von Purkinje-Zellen (Wu et al., 2022).

#### *4.1.2 Verhaltensanalyse des Mausmodells und Einfluss von Parkin auf die klinische Pathogenese der SCA3*

Anschließend an die Untersuchung der Metabolite folgten verschiedene Verhaltensanalysen (Körpergewichtsmessung, RotaRod, CatWalk, LabMaster) in denen der Einfluss des Proteins Parkin anhand der vier Genotypen (WT, PARK2 ko, SCA3 YAC, dm-YAC/PARK) in seiner phänotypischen Ausprägung untersucht und verglichen wurde.

In früheren Studien konnten die Untersuchungen der SCA3 YAC-Maus zeigen, dass sich zwar milde, aber langsam fortschreitende zerebelläre Defizite finden lassen. Diese waren erkennbar ab einem Alter von 4 Wochen an Veränderungen der Körperhaltung, Hypotonie sowie motorischen und sensorischen Verlusten (Cemal et al., 2002).

In Studien der letzten Jahre konnte dieser frühe neurologische Phänotyp teilweise jedoch nicht mehr verifiziert werden und es zeigte sich erstmals im Alter von 75 Wochen ein milder motorischer Phänotyp (Costa Mdo et al., 2013).

Die PARK2 ko Mutanten zeigten kognitive Defizite und eine Inhibition der amphetamininduzierten Dopaminausschüttung, der Glutamat Neurotransmission und verringerte GSH-Level im Striatum (Itier et al., 2003). Abweichend zu einer normalen Performance zeigten sich hingegen Defizite des prozeduralen und kurzfristigen räumlichen Gedächtnisses, welche auf Defizite in der synaptischen

Plastizität des Hippocampus, ohne größere olfaktorische, emotionale oder motorische Beeinträchtigungen, schließen zu lassen (Rial et al., 2014).

Betrachtet man die Untersuchungsergebnisse dieser Arbeit zeigten sich folgende Auffälligkeiten:

Die WT-Mäuse hatten das höchste Gewicht im Vergleich zwischen den Genotypen, darunter lagen die PARK2 ko-Mäuse, noch geringer war das Gewicht der SCA3 YAC- und dm-YAC/PARK-Mäuse. Demzufolge lässt sich schlussfolgern, dass die Kombination zwischen dem homozygot ausgeschalteten *PARK2*-Gen in Kombination mit dem exprimierten homozygoten murinen *Ataxin-3*-Gen in Bezug auf das Gewicht dazu führte, dass die doppelt mutierten Mäuse (dm-YAC/PARK) das geringste Gewicht aufwiesen. Jedoch zeigte sich im LabMaster auch, dass diese Mäuse die geringste Nahrungsaufnahme hatten. Interessanterweise wiesen die männlichen Tiere in unseren Analysen bei allen Genotypen größere Gewichtsschwankungen als die weiblichen Tiere und auch mehrere signifikante Abweichungen zwischen den Genotypen auf. Dennoch hatten die Männchen im Vergleich zu den Weibchen ein geringfügig höheres Gewicht.

Eine Gewichtsreduktion der hemizygoten YAC84Q Mäuse (SCA3 YAC) war jedoch bereits zu Beginn der mit diesen Mäusen durchgeführten Untersuchungen erkennbar. Cemal et al. konnte in seiner Studie ein geringeres Gewicht der transgenen Mäuse mit Zusammenhang von erhöhter transgener Kopienanzahl sowie erhöhter Polyglutaminlänge feststellen (Cemal et al., 2002).

In Vergleichen zwischen WT-Mäusen, SCA3 YAC-Mäusen, Calpain-1 *knockout* Mäusen und doppelt mutierten Mäusen war ebenfalls eine Gewichtsreduktion der SCA3 YAC-Maus ab der 36. Woche ersichtlich. Auch hier waren die männlichen Mäuse stärker von der Gewichtsreduktion betroffen als die weiblichen, sowohl bei den SCA3 YAC-Mäusen als auch bei den doppelt mutierten Tieren im Vergleich mit dem WT (Weber et al., 2020).

Nicht nur in Untersuchungen der SCA3 zeigten sich Diskrepanzen zwischen den männlichen und weiblichen Mäusen, sondern auch in Untersuchungen anderer transgen veränderter Mäuse weiterer PolyQ-Erkrankungen. Beispielsweise waren männliche Mäuse und Ratten in der HD-Forschung ebenfalls stärker von

einer Körpergewichtsreduktion betroffen als die weiblichen Tiere (Phan et al., 2009; Weishaupt et al., 2019).

Zudem war teilweise in Untersuchungen erkennbar, dass auch die Mäuse, bei denen das Parkin-Gen ausgeschaltet wurde, eine signifikant geringere Gewichtszunahme im Vergleich mit WT-Mäusen zeigten und somit auch ein generell geringeres Gewicht hatten (Palacino et al., 2004). In Bezug zum Gewicht konnte jedoch in anderen Untersuchungen der PARK2 ko-Mäuse keine signifikanten Abweichungen im Vergleich zum Gewicht der WT-Mäuse festgestellt werden (Itier et al., 2003; Serrano et al., 2005). Dies spiegelte sich auch in unseren Analysen wider, denn auch hier waren nur geringfügige Unterschiede des Gewichts zwischen den PARK2 ko- und den WT-Mäusen feststellbar.

Diese Ergebnisse konnten auch in Untersuchungen von SCA3-Patienten beobachtet werden, bei denen ein häufiger Befund fortschreitender Gewichtsverlust trotz unverändertem Appetit war (Schmitt et al., 1997).

In neueren Untersuchungen mit SCA3-Patienten wurden diese Ergebnisse ebenfalls bestätigt. Diese zeigten im Vergleich mit gesunden Kontrollen einen geringeren *body mass index* (BMI) (Saute et al., 2011). Zudem fand sich eine negative Korrelation zwischen CAG-Wiederholungslänge und dem Körpergewicht (Saute, Donis, et al., 2012; Saute, Silva, et al., 2012).

Auch in HD-Patienten konnte dies festgestellt werden (Sanberg et al., 1981), was schon früh zu der Annahme führte, dass der Gewichtsverlust häufig mit PolyQ-Erkrankungen assoziiert ist.

Bei der Untersuchung der Balance und Koordination der unterschiedlichen Genotypen im RotaRod-Test zeigten die PARK2 ko-Mäuse durchgehend bessere Ergebnisse als die beiden anderen Mutanten. Die mutierten Mäuse mit ataktischem Phänotyp (SCA3 YAC und dm-YAC/PARK) hatten also die geringste Laufzeit woraus sich schließen lässt, dass diese ein geringeres Gleichgewicht im Vergleich mit den nicht mutierten und den PARK2 ko-Mäusen hatten.

Demzufolge führt der *knockout* des *PARK2*-Gens eher zu einer Verbesserung der Balance im RotaRod-Test, indem die Mäuse in der Lage sind, länger auf dem sich drehenden Stab zu balancieren. Somit ist anzunehmen, dass sich bei den

PARK2 ko-Mäusen eine Steigerung des Gleichgewichts zeigt, welche durchaus in Zusammenhang mit dem reduzierten Gewicht in Bezug auf die WT-Tiere stehen kann. Betrachtet man in Bezug auf das Laufverhalten der SCA3 YAC-Mäuse auch das geringere Körpergewicht dieser, konnte ein deutlich reduziertes Gewicht bei den SCA3 YAC-Mäusen besonders ab dem Alter von 9 Monaten (ca. ab der 36. Woche) beobachtet werden. Zwar hatten die SCA3 YAC-Mäuse somit also ebenfalls ein geringeres Körpergewicht als die WT-Mäuse, dennoch war die RotaRod-Performance der SCA3 YAC-Mäuse trotz reduziertem Gewicht schlechter als die der WT- und PARK2 ko-Mäuse. Daher ist naheliegend, dass die SCA3 YAC-Mäuse zusätzlich reduzierte Fähigkeiten in ihrer Balance zeigten und nicht von dem reduzierten Körpergewicht profitieren.

SCA3 YAC-Mäuse wiesen bereits in früheren Untersuchungen reduzierte Fähigkeiten im RotaRod Test auf. Diese äußerten sich bei den Mäusen zwischen 7,5 und 13 Monaten. Auch kürzere Abdruckmuster mit 13,5 Monaten konnten dabei festgestellt werden (Chen et al., 2008). Im Gegensatz dazu bestätigen unsere Ergebnisse bezüglich der PARK2 ko-Mäuse die Erkenntnisse von Itier et al., dass sich zumindest in der Balance keine motorischen Defizite zeigten. Im Vergleich zum WT profitierten die PARK2 ko-Mäuse vermutlich von dem verringerten Gewicht und für diese war weiterhin eine normale Performance im RotaRod-Test möglich (Itier et al., 2003).

Andere Verhaltensanalysen, wie die Ergebnisse der Catwalk-Analysen, zeigten sich ebenfalls potenziell durch das Körpergewicht beeinflusst.

Die PARK2 ko- und SCA3 YAC-Mäuse hatten durch das geringere Gewicht eine gesteigerte Regelmäßigkeit in ihrem Gangbild zu beiden Messzeitpunkten bei einer zusätzlich leicht verringerten Durchschnittsgeschwindigkeit der SCA3 YAC-Mäuse gegenüber den anderen Genotypen. Die reduzierte Geschwindigkeit begründet sich möglicherweise darin, dass die Mutation dazu führt, dass sich diese Mäuse aufgrund der geschwächten Balance und Gangschwierigkeiten vorsichtiger fortbewegten. Dies findet sich auch in den Untersuchungen von Cemal et al. wieder, bei denen die mutierten Mäuse gegenüber dem WT einen weiten Gang mit Tremor der Extremitäten hatten (Cemal et al., 2002).

Durch die phänotypische Ausprägung der Erkrankung zeigte sich im Gangbild der Mäuse ein Tippeln, was zu einem verkleinerten Abdruckbereich führte, und ab einem Alter von 15 Monaten deutlich durch kleine Abdruckbereich bei den SCA3 YAC-Mäusen festgestellt werden konnte. Verkleinerte Abdruckmuster konnten auch Chen et al. bereits bei 13,5 Monate alten SCA3 YAC Mäusen feststellen (Chen et al., 2008).

Bei den doppelt mutierten Mäusen (dm-YAC/PARK) verzeichneten wir generell häufig die schlechtesten Ergebnisse und auch Unterschiede zwischen den Geschlechtern waren zu erkennen. Bei den dm-YAC/PARK-Mäusen schienen die männlichen Mäuse durch das geringere Gewicht weniger in ihrem Gangbild beeinflusst zu sein als die weiblichen Mäuse.

Es lässt sich vermuten, dass die mutierten Mäuse mit ataktischem Phänotyp (SCA3 YAC und dm-YAC/PARK) ein geringeres Gleichgewicht im Vergleich zu den nicht mutierten und den PARK2 ko-Mäusen hatten. Dies entspricht auch den Ergebnissen von Itier et al. und Rial et al., die keine motorischen Einschränkungen der PARK2 ko-Mäuse verzeichnen konnten (Itier et al., 2003; Rial et al., 2014). In Studien mit anderen doppelt mutierten Mäusen, beispielweise mit einem Calpain-1 *knockout* und einem SCA3 Mausmodell, waren teilweise ähnliche Ergebnisse in den Verhaltensanalysen erkennbar. Hier stellten sich in der Analyse die doppelt mutierten Mäuse, im Vergleich mit den SCA3 YAC-Mäusen, einerseits mit einer Verschlechterung des motorischen Phänotyps anhand des RotaRod-Tests dar, andererseits konnte im Gegensatz zu unseren Ergebnissen kein verringertes Gewicht dieser, stattdessen eine Verbesserung des allgemeinen Überlebens, festgestellt werden (Haas et al., 2022; Weber et al., 2020).

Auch bei Studien mit SCA3-Patienten konnte phänotypisch ein breiter Gang festgestellt werden, der häufig assoziiert mit einem Tremor war. Dieses Gangbild steht in Zusammenhang mit Gangunsicherheiten oder Gleichgewichtsstörungen (Rogers et al., 1997), wodurch versucht wird mit Hilfe des breiten Gangs eine bessere Balance, bei bestehendem ataktischen Phänotyp, zu erlangen (Riess et al., 2008).

Um eine möglichst hohe automatisierte Standardisierung der Ergebnisse zu gewährleisten, wurde der LabMaster Test genutzt, welcher bereits in Studien mit SCA3-Mäusen zeigte, dass diese Standardisierung zu einer Minimierung von äußeren Einflüssen führte und ein geeignetes Verfahren darstellt, um das Verhalten der SCA3-Mäuse zu analysieren. Dieser Test ermöglicht die simultane Detektion von mehreren Parametern, wie beispielsweise der Aktivität, Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme und das Angstverhalten der Tiere über einen Zeitraum von 70 Stunden (Hubener et al., 2012).

Bei den Verhaltensanalysen im LabMaster-Test zeigte sich eine geringere Aktivität der PARK2 ko- und dm-YAC/PARK-Mäuse mit 3 Monaten. Die Anpassung an eine neue Umgebung zeigte eine geringere Aktivität mit 9 Monaten bei allen männlichen Mutanten im Vergleich zum WT.

Dies spiegelt teilweise das bereits von Cemal et al. beschriebene Verhalten der SCA3-Mäuse wider, welche weniger aktiv, weniger neugierig und weniger wachsam waren als die WT-Mäuse (Cemal et al., 2002). Bei der Anpassung an eine neue Umgebung waren die PARK2 ko- und dm-YAC/PARK-Mäuse am wenigsten aktiv, was durch die von Rial et al. beschriebenen Verhaltensauffälligkeiten zu erklären wären (Rial et al., 2014).

Da im Labmaster neben Aktivität auch die Nahrungs- und Wasseraufnahme getrackt wird, kann somit ein Bezug zum Gewicht der Mäuse hergestellt werden. Im Vergleich zeigte sich eine geringere Nahrungsaufnahme der PARK2 ko- und dm-YAC/PARK-Mäuse sowohl mit 3 als auch mit 9 Monaten, welche wahrscheinlich auch im Gewicht dieser Genotypen zum Ausdruck kommen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich der motorische Phänotyp bei den doppelt mutierten Mäusen im Vergleich mit den anderen Genotypen verschlechterte.

Da der ataktische Phänotyp, der durch die SCA3 YAC-Maus dargestellt werden soll (Cemal et al., 2002) in einigen Studien nicht ausreichend reproduziert werden konnte (Toonen et al., 2019; Weber et al., 2020), wurde bereits für weitere Studien ein SCA3 *knock-in* Mausmodell mit einer *Hyper*-Expansion von mehr als 150 Glutaminen entwickelt (Haas et al., 2022).

## **4.2 TEIL B: ESMI-Probanden**

### *4.2.1 Analyse der Parkin Protein-Level in SCA3 Patienten*

Das Protein Parkin ist eine neuroprotektive E3-Ubiquitin-Ligase, welches durch das *PARK2*-Gen konjugiert wird und einen Interaktionspartner des Ataxin-3 darstellt. Es erfolgt eine direkte Bindung der beiden Proteine ATXN3 und Parkin N- und C-terminal. Parkin wird durch diese Interaktion indirekt ubiquitiniert, indem die mit Parkin interagierende E2-Konjugase an ATXN3 bindet und folglich Ubiquitin auf ATXN3 an Stelle von Parkin transferiert wird, was demnach zur Degradation von Parkin führt. Bei einem expandierten PolyQ-Bereich des ATXN3-Proteins wird diese Degradation sogar verstärkt (Durcan et al., 2012; Durcan et al., 2011). Umgekehrt scheint Parkin in den Abbau von Proteinen mit expandiertem PolyQ-Bereich involviert zu sein. Versuche im Zellmodell zeigten bei einer Überexpression von Parkin reduzierte Aggregation und Zytotoxizität von expandierten ATXN3-Protein-Fragmenten (Tsai et al., 2003).

Da Parkin nicht nur die Hauptursache bei familiärem PD darstellt und Risikofaktor bei sporadischem PD ist (Dawson & Dawson, 2014), sondern ebenfalls eine bestimmende Rolle in verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer, ALS und HD (Hebron et al., 2014; Rosen et al., 2010; Tsai et al., 2003) spielt, sollte die Rolle von Parkin in der SCA3 anhand der Parkin Protein-Level im Blut von SCA3-Patienten genauer analysiert werden.

Um den gegenseitigen Einfluss dieser beiden Proteine zusätzlich an humanen DNA- und PBMC-Proben zu untersuchen, erfolgte die Analyse der Höhe der Parkin Protein-Level aus PBMC-Proben mit verschiedenen Parametern (Alter, Geschlecht, Entnahmezentrum, *PARK2* SNPs) der Patienten und einer anschließenden Einteilung dieser in Kontrollen, nicht atakt. MT und atakt. MT.

Da der Einfluss von Parkin bereits in einigen neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer, ALS und HD in der Literatur beschrieben wurde (Zhang et al., 2015), ist die Vermutung naheliegend, dass die Parkin Protein-Level durch die Korrelation zwischen den Proteinen Parkin und ATXN3 möglicherweise unterschiedlich hohe Level zwischen nicht atakt. MT und den atakt. MT aufweisen und diese Veränderungen in den Parkin Protein-Leveln

gegebenenfalls das AAO oder den Krankheitsverlauf besser voraussagen könnten.

Betrachtet man Untersuchungen in PD-Patienten sollen sich Parkin-Substrate dabei einerseits sowohl in PD-Patienten als auch im Tiermodell ansammeln, andererseits scheint Parkin bei Überexpression ein multifunktionales neuroprotektives Protein zu sein (Dawson & Dawson, 2014). Zusammenhänge zwischen der Proteinkonzentration von Parkin und der Ausprägung eines Parkinsonismus konnten bereits in SCA3-Patienten festgestellt werden (Park et al., 2015; Paulson, 2007).

In dieser Arbeit zeigte sich, dass im Vergleich zwischen MT und Kontrollen, die MT signifikant höhere Parkin Protein-Level hatten. Erfolgte die Aufteilung in Kontrollen, nicht atakt. MT und atakt. MT hatten die Kontrollen die niedrigsten Parkin Protein-Level, die nicht atakt. MT im Median höhere als diese und die atakt. MT ähnlich hohe Parkin Protein-Level wie die nicht atakt. MT. Jedoch waren die Unterschiede nach dieser Aufteilung nicht mehr signifikant. Daher ist die Hypothese, dass mit voranschreitender Krankheitsprogression die Menge der Parkin Protein-Level ansteigt.

Jedoch konnte zudem festgestellt werden, dass im Vergleich zwischen männlichen und weiblichen Probanden, die männlichen Probanden unabhängig vom Genotyp signifikant höhere Parkin Protein-Level aufwiesen. Aufgrund dessen ist fraglich, ob das Geschlecht ebenfalls die Höhe dieser Protein-Level beeinflusst.

Solche geschlechtsspezifischen Unterschiede wurden in der Literatur bereits beschrieben. In einer neueren Studie konnten beispielsweise gewisse Unterschiede zwischen Männern und Frauen in Bezug auf Beginn, Verlauf und Ausprägung von motorischen und nicht-motorischen Symptomen von PD, sowie Unterschiede zwischen dem generellen Risiko an Parkinson zu erkranken, identifiziert werden (Cerri et al., 2019).

Durch die hohe Standardisierung bei der Blutentnahme und Verarbeitung (Santana et al., 2023) konnte glücklicherweise festgestellt werden, dass das Entnahmezentrum keinen Einfluss auf die Höhe der Protein-Level hatte, denn es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Zentren

feststellbar. Dennoch konnte in diesen kleineren Gruppen keine Regelmäßigkeit der Höhe der Parkin Protein-Level zwischen Kontrollen, nicht atakt. MT und atakt. MT erkannt werden. In London hatten die Kontrollen die höchsten Werte, auf den Azoren, in Coimbra und Tübingen hatten die nicht atakt. MT die höchsten Parkin Protein-Level und in Bonn die atakt. MT. Besonders in Bonn waren die Protein-Level zwischen den männlichen nicht atakt. MT und den atakt. MT signifikant höher bei den atakt. MT. Dabei wurde durch die deskriptive Kohortenstatistik ausgeschlossen, dass sich in einer Gruppe signifikant mehr Männer als Frauen befanden.

Die Interaktion zwischen ATXN3 und Parkin führt zudem dazu, dass besonders Genotypen der *PARK2* SNPs als genetische Modifikatoren der SCA3 in Betracht kommen.

Da hier die Untersuchung der Parkin Protein-Level im Vordergrund steht, sollte ein Bezug zwischen den *PARK2* SNPs und den jeweiligen Protein-Leveln untersucht werden.

Aufgrund der indirekten Deubiquitinierung des Proteins Parkin durch ATXN3 besteht die Annahme, dass eine veränderte Interaktion dieser beiden Proteine in Abhängigkeit der *PARK2* SNPs auch zu einer veränderten Ubiquitinierung dieser führen kann und sich damit einhergehend auch in einer Veränderung der Parkin Protein-Level widerspiegeln kann.

Dieser Arbeit zufolge konnte jedoch kein modifizierender Einfluss auf die Abbauprozesse in Bezug auf die Parkin Protein-Level erkannt werden.

In der Literatur zeigte sich bisher, dass bei SCA3-Patienten der Genotyp A/G an Bp 601 signifikant häufiger zu finden war als die homozygoten Genotypen A/A und G/G im Vergleich zu Kontrollen (Sato & Kuroda, 1999). Die Homozygoten Genotypen G/G des *PARK2* SNP Bp 1239 scheinen zudem mit sporadischem PD, sowie bei dem *PARK2* SNP Bp 1281 mit familiärem PD assoziiert zu sein. Die seltenen Varianten hingegen sollen einen protektiven Effekt gegen autosomal-rezessiven juvenilen Parkinson (ARJP) haben (Lucking et al., 2003). Eine krankheitsmodifizierende Rolle des *PARK2* SNP Bp 1239 konnte diesem SNP in der bisher unveröffentlichten Diplomarbeit von Dr. rer. nat. Jonasz J.

Weber zugeschrieben werden. Dort zeigte sich ein verringertes AAO von 3 Jahren bei dem Genotyp C/C.

Da für diese Arbeit lediglich 5 Probanden den Genotyp C/C des *PARK2* SNP Bp 1239 aufwiesen ist eine Aussagekraft diesbezüglich hier jedoch eher zu vernachlässigen.

Für alle Exone und deren Genotypen waren vergleichbare Werte mit einem  $\Delta c$  von 25 in der Gesamtkohorte festgestellt worden. Bei Exon 4 Bp 601 und Genotyp G/G sowie bei Exon 10 Bp 1239 und Genotyp C/C lag der Median der Parkin Protein-Level geringfügig höher als bei den restlichen Genotypen. Jedoch war auch hier jeweils ein großer Unterschied in der Anzahl der Probanden vorhanden. Zudem zeigte sich eine große Streuung der Parkin Protein-Level für fast alle Genotypen. Ausgenommen war der Genotyp G/A des Exon 11 Bp 1281 bei dem hingegen aber auch nur 20 Probanden der Gesamtkohorte (MT und Kontrollen) vorhanden waren.

Interessant war, dass nach der Einteilung der Probanden in Kontrollen, nicht atakt. MT und atakt. MT in Bezug auf die Genotypen beobachtet werden konnte, dass je nach Gruppe unterschiedliche Genotypen die höchsten Parkin Protein-Level aufwiesen. Möglicherweise liefern die *PARK2* SNPs in Bezug auf die Parkin Protein-Level einen interessanten und effektiven Ansatz für die weitere SCA3-Forschung.

Wichtig für das Verständnis der gemessenen Parkin Protein-Level ist die Detektion der Parkin Protein-Level mittels TR-FRET. Dieser wurde in unserem Institut bereits erfolgreich für ATXN3 (Gonsior et al., 2021), wie auch für die Bestimmung der Parkin Protein-Level, etabliert (siehe Dissertation von Dr. Patrik Pelz). Weiterhin konnte der TR-FRET Assay zusätzlich für die Bestimmung von löslichem Ataxin-2 etabliert werden (Bux et al., 2023).

Bei der Messung der Werte ist die eingesetzte Proteinkonzentration ein wichtiger Parameter für die Entstehung verlässlicher Messwerte. Denn wenn zu hohe Konzentrationen des Substrats eingesetzt werden, kommt es zum HOOK-Effekt, auch „prozone effect“ genannt. Bei zu hoher Substratkonzentration, sprich einer übermäßigen Auslastung der Antikörper, können diese nicht an demselben

Molekül binden. Daraufhin erfolgt eine Bindung dieser an zwei verschiedenen Proteinen und es kann kein Energietransfer stattfinden (Schietecatte, 2012). Folgend nimmt die Signalstärke ab, obwohl eine hohe Menge an Protein in der Probe enthalten ist. Der HOOK-Effekt konnte auch bei einem TR-FRET Assay für Huntingtin-Protein gezeigt werden. Hier erzeugte eine Proteinmenge von ca. 0,1 ng/Well abnehmende Signalstärken trotz nachweislich erhöhter Proteinmenge der Probe (Cui et al., 2014). Eine Abmilderung des HOOK-Effekts konnte in einer Studie mit Calmodulin durch die Nutzung von positiven kooperativen Bindungen (allosterische Aktivatoren oder Inhibitoren) erzielt werden (Roy et al., 2017). Fraglich ist jedoch, inwiefern solche Linker-Proteine in den vorliegenden Assay eingebaut werden könnten.

Auch wenn der TR-FRET Assay einige Vorteile aufweist und ein sensitiveres Verfahren darstellt, um Proteinmengen zu bestimmen, weist dieser auch in der Parkin-Detektion zum jetzigen Zeitpunkt noch Defizite und Nachteile auf. Diese sollten besonders bei der Interpretation späterer Messwerte immer berücksichtigt werden. Zu den möglichen Fehlerquellen des Assays zählen beispielsweise durch den Anwender verursachte Pipettierfehler, wie z.B. Ungenauigkeiten beim Pipettieren, was zu erhöhten Abweichungen des Duplikats führen würde. Besonders Anwenderfehler lassen sich unproblematisch bereinigen oder direkt vermeiden. Problematischer ist die Verhinderung von anwenderunabhängigen Fehlerquellen. Diese sind beispielsweise störende Schwebeteilchen oder Lichtausbleichungen der Fluoreszenz-markierten Antikörper. Diese wurden bereits in anderen TR-FRET Studien beschrieben und thematisiert (Liang et al., 2014). Sie können einen indirekten Einfluss auf die Signalstärke der Probe nehmen, was zu Verzerrungen der Messung führen kann. Einer dieser Störfaktoren ist Hämoglobin. Durch den Häm-Farbstoff, welcher eine Eigenfluoreszenz aufweist, wird die Messung gestört und im Endeffekt verfälscht (Cohen et al., 2016). Auch bei sorgfältiger Vorbereitung der Proben kann es in einigen Fällen zu Verunreinigungen der PBMC-Proben mit Erythrozyten kommen.

Laut einer Studie zur PD1-PDL2 Wechselwirkung können Salicylate, welche zur Behandlung von Schmerzen und zur Blutverdünnung eingesetzt werden,

ebenfalls mit dem TR-FRET Assay interagieren (Hanley et al., 2016). Bei entsprechender Medikation können diese in den Blutproben der Probanden enthalten sein. Möglicherweise können die beschriebenen Ausreißer in den Messwerten durch eine dieser Fehlerquellen erklärt werden. Dies bedarf allerdings weiterer Messreihen und Analysen.

Weitere Limitationen des TR-FRET Assays können durch die Ungenauigkeiten und den starken Einfluss der Bestimmung der Gesamtproteinmenge der PBMC-Probe entstehen, welche für die Berechnung der  $\Delta c$ -Werte genutzt wurde. Zur Bestimmung der Gesamtproteinmenge diente in dieser Arbeit der Bradford-Assay, im Gegensatz zu anderen TR-FRET Anwendungen, bei denen der BCA-Assay genutzt wurde (Cui et al., 2014; Weiss et al., 2012). Außerdem könnte die in den lysierten PBMC-Proben enthaltene Reagenz TritonX100 laut Herstellerangaben ein Problem bei der Gesamtproteinbestimmung darstellen und einen weiteren möglichen Störfaktor bilden (Thermo Fischer Scientific, 2012).

Alternativen zur Bestimmung der Protein-Level mittels PBMC-Proben bietet beispielsweise der ELISA Test zur Bestimmung dieser anhand von CSF-Proben, wie es bei der Bestimmung der Parkin Protein-Level zur Untersuchung von Parkin als potenziellen Biomarker bei Multipler Sklerose durchgeführt wurde (Cossu et al., 2021). Auch bei der Bestimmung von Huntingtin konnte diese Methode ebenfalls erfolgreich anhand von CSF-Proben genutzt werden (Wild et al., 2015). Als sensitivere Methoden im Vergleich zum TR-FRET Assay könnte beispielsweise das *Single-molecule-counting*, also der SMC-Assay (Singulex-Assay von Evotec) herangezogen und für Parkin erprobt werden, wie es ebenfalls für die Evaluation der Plasma-Level von einigen potenziellen Biomarkern für PD bereits durchgeführt wurde (Youssef et al., 2023). CSF ist aufgrund der engen räumlichen Beziehung zum erkrankten Organ in der SCA3 von besonderem Interesse und wird daher auch häufig als Ausgangsmaterial in der Forschung an neurodegenerativen Erkrankungen genutzt.

Dennoch stellt Plasma als Ausgangsmaterial ein leichter zu gewinnendes Biomaterial als CSF dar, welches zudem weniger invasiv für den Patienten gewonnen werden kann.

Auffällig war, dass zwar viele Daten von Probanden bei der Baseline Untersuchung gewonnen werden konnten, jedoch die longitudinalen Daten zur Auswertung im Verlauf der Untersuchungen immer geringere Anzahlen hatten. Bei zu geringer Anzahl an Probanden pro Gruppe im longitudinalen *Setup* sind keine aussagekräftigen Ergebnisse mehr zu erwarten. Sinnvoll ist es diese Daten weiterhin zu füllen, um auch den Krankheitsverlauf analysieren zu können. Besonders sinnvoll ist die Untersuchung der nicht atakt. MT und den Zeitpunkt ab dem diese als atakt. MT ( $SARA \geq 3$ ) eingestuft werden können. Hier wäre es interessant, den Vergleich der Parkin Protein-Level zu bestimmen und zudem bezüglich der klinischen Daten zu vergleichen. In Bruchstücken konnte der Vergleich in dieser Arbeit betrachtet werden, jedoch fehlten ausreichende Daten, um eine Auswertung dieser Daten zu erstellen und diese zu bewerten. Die geringe Anzahl der Daten ist womöglich zum einen darauf zurückzuführen, dass die Daten in verschiedenen Zentren gesammelt werden und eine Zusammenstellung dieser Daten eine gewisse Zeit in Anspruch nehmen wird. Weiterhin war sicherlich die Corona-Pandemie ein Störfaktor, der dazu führte, dass Daten in geringerem Ausmaß aufgenommen werden konnten und die Probanden sich ggf. nicht zur Untersuchung einfinden konnten. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass einige Probanden mit frühem AAO und langer Erkrankungsdauer möglicherweise schon verstorben sein können oder diesen der Weg ins Spezialzentrum beschwerlich erscheint. Besonders schwierig ist es longitudinale Daten von Kontrollprobanden zu erhalten, da diese sich ggf. nicht zu erneuten Untersuchungen einfinden werden.

Zur Beurteilung der Veränderung der Parkin Protein-Level ist es daher also besonders wichtig bedeutend mehr präataktische Patienten (nicht atakt. MT) einzubeziehen und diese gezielt zu untersuchen. Eine Schwierigkeit in der Rekrutierung der nicht atakt. MT liegt darin, dass diese lediglich über bereits erkrankte (atakt. MT) Verwandte ausfindig gemacht werden können.

Untersuchungen von SCA3-Patienten zeigten, dass ein bestimmter SNP im APOE-Gen zu einem durchschnittlich 4 Jahre früheren Erkrankungsbeginn führte (Peng et al., 2014).

Untersuchungen auf den Azoren zeigten zudem, dass weitere SNPs in Genotypen des APOE-Gens als Modifikatoren der SCA3 besonders bei Parkinson-ähnlichem Phänotyp ursächlich sein können. Es konnte gezeigt werden, dass das Epsilon2/Epsilon3 Allel bei zwei SCA3 Patienten mit Parkinson-ähnlichem Phänotyp vorhanden war (Bettencourt, Raposo, et al., 2011; Lima & Raposo, 2018). Weitere Untersuchungen zu den APOE SNPs anhand der ESMI-Kohorte erscheinen sinnvoll, um das Zusammenspiel dieser SNPs weiter zu untersuchen und auch in Zusammenhang zu klinischen Daten und dem Parkinson-ähnlichem Phänotyp zu stellen. Dies war auch Ziel dieser Arbeit, allerdings konnten aufgrund der aufwändigen Etablierung dieser Methode aus zeitlichen Gründen keine weiteren Messungen und Analysen zur Untersuchung der APOE SNPs im Rahmen dieser Arbeit stattfinden.

#### *4.2.2 Analyse klinischer Daten in SCA3 Patienten*

Da sich die SCA3 phänotypisch in breiter Variation zeigt sollte die phänotypische Ausprägung der SCA3-Patienten genauer analysiert werden. Diese neurodegenerative Erkrankung äußert sich in zentralen klinischen Merkmalen, wie beispielsweise der Ataxie der oberen Extremitäten und des Rumpfes. Die Patienten zeigen Bewegungsstörungen der Extremitäten besonders beim Gehen, aber auch beim Stehen und bereits im Sitzen. Häufig werden auch motorische Störungen mit pyramidalen Zeichen, Nystagmus, Dysarthrie und Gesichtsfaszikulation beobachtet. Ein früher Krankheitsbeginn ist häufig mit Spastiken, extrapyramidalen Steifheit und Dystonie vergesellschaftet, wohingegen ein später Krankheitsbeginn eher mit distaler Atrophie und Sinnesverlust vergesellschaftet ist (Coutinho & Andrade, 1978; Rub et al., 2003; Rub, de Vos, Brunt, et al., 2002; Rub, de Vos, Schultz, et al., 2002; Sudarsky & Coutinho, 1995).

Dies spiegelte sich ebenfalls in den Ergebnissen dieser Arbeit wider. Die meisten Patienten zeigten Symptome der Areflexie mit vollständigem Fehlen eines oder mehrerer Reflexe, sensorische und okulomotorische Störungen. Unter den

Probanden (MT und Kontrollen) ohne Medikamenteneinnahme waren keine Symptome wie Rigidität oder Dyskinesie festzustellen.

Einige der SCA3-Patienten zeigen zudem einen Parkinson-ähnlichen Phänotyp (Durr et al., 1996; Tuite et al., 1995). Auch wenn dies in der Literatur mittlerweile häufig beschrieben wurde, sind es jedoch nur wenige Patienten, die einen Parkinson-ähnlichen Phänotyp ausprägen, was der Grund dafür ist, warum diese bisher wenig untersucht wurden.

In einem *two-case report* wurden 2 SCA3-Patienten dargestellt, die unter der Parkinson'schen Trias (Tremor, Bradykinesie, Rigidität) leiden, und die genetische Variation dieser untersucht (Bettencourt, Santos, et al., 2011).

Da es bisher keine kausale Therapie jedoch symptomatische Therapieansätze gibt, sollen diese im Folgenden erwähnt werden.

Bei einigen SCA3-Patienten konnte in Untersuchungen eine gewisse Responsivität auf Dopamin und somit eine Sensitivität auf Levodopa festgestellt werden, was eine mögliche symptomatische Therapie für diese Patienten darstellt (Tuite et al., 1995; Zhang et al., 2021).

Betrachtet man den SARA-Score konnte für die Gabe von Riluzol eine signifikante Verbesserung dessen nachgewiesen werden, sodass eine Riluzol-Therapie in den S1-Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie aufgeführt wird und als optionaler Therapieversuch bei SCA3-Patienten beschrieben wird (Romano et al., 2015).

Um die Probanden mit Parkinson-ähnlichem Phänotyp hier genauer zu betrachten, wurden diese anhand ihrer Medikation mit PD-Medikamenten herausgefiltert, zu welchen auch Levodopa zählt. Insgesamt konnten somit 49 SCA3-Patienten dieser Gruppe zugeteilt und deren klinische Daten dementsprechend analysiert werden.

Probanden, die PD-Medikamente bekamen, waren hauptsächlich atakt. MT (n=47), nur 2 Probanden waren bisher nicht ataktisch. Unter den Probanden befanden sich demzufolge keine Kontrollen.

Zum Vergleich dieser Gruppe dienten Probanden, die Medikamente bekamen, bei denen es sich jedoch nicht um PD-Medikamente handelte. 60 % der Probanden dieser Gruppe waren atakt. MT, 12 % waren nicht atakt. und 25 %

waren Kontrollen. 3 % der Probanden mit dieser Medikation konnten keiner der 3 Gruppen zugeteilt werden, da die klinische Angabe des SARA-Score fehlen. Probanden, die keine Medikation bekamen bzw. bei denen keine Medikation bekannt war, waren nur zu 29 % atakt. MT, zu 17 % nicht atak. MT und zu 50 % Kontrollen. Auch hier konnten 4 % der Probanden nicht in die Gruppen zugeteilt werden. Um jedoch Effekte anhand des SARA-Score zuverlässig messen zu können werden große Stichproben von ca. 200 Probanden benötigt. Daher stellt sich die Frage ob mit lediglich 49 Probanden ein aussagekräftiges Ergebnis zustande kommen konnte.

Bekannt ist bereits, dass die CAG-Wiederholungsanzahl direkt mit dem AAO korreliert (Maciel et al., 1995). Sowie der Zusammenhang eines frühen AAO, einer langen CAG-Wiederholungsanzahl und eines schweren Erkrankungsverlaufs (Durr et al., 1996). Dieser kausale Zusammenhang lässt darauf schließen, dass die CAG-Länge des expandierten Allels ein signifikanter Prädiktor zur Bestimmung des AAO darstellen kann (Diallo et al., 2018; Tezenas du Montcel et al., 2014). Dieser kausale Zusammenhang konnte auch in der ESMI-Kohorte beobachtet werden.

Das AAO steht zwar in Korrelation mit der CAG-Wiederholungszahl, dennoch bleibt eine Varianz des AAO, die nicht auf die CAG-Wiederholungszahl zurückzuführen ist. Denn auch weitere genetische oder umweltbedingte Faktoren, sowie Lebensstil, Ernährung und mögliche Therapien oder Medikamente können einen Einfluss auf den Erkrankungsbeginn nehmen (Akcimen et al., 2020; Schmitz-Hubsch et al., 2008; B. P. van de Warrenburg et al., 2005). Als eine weitere genetische Modifikation des AAO konnten beispielsweise DNA-Reparaturenzyme in einer *Genome-wide association study* (GWAS) bestätigt werden (Bettencourt et al., 2016).



Tabelle 47: Vergleich AAO, CAG-Wiederholungsanzahl, SARA-Score, INAS-Score zwischen Kontrollen, nicht atakt. MT, atakt. MT und SCA3 Patienten mit PD-Medikation, Mutationsträger mit anderen Medikamenten und MT ohne Medikamenteneinnahme

	Kon- trolle n (n= 115)	nicht atakt. MT (n=54)	atakt. MT (n= 235)	SCA3- Patienten mit PD- Medi- kation (n=49)	MT mit anderen Medi- kamenten (n=239)	MT ohne Medi- kamenten- einnahme (n=119)
CAG	24,5	66	69	69	68	68
AAO	-	-	39	37	40	38
SARA	0,6	3	14	18	12	8
INAS	0,7	1,7	5	6	4	3

Zum Vergleich der demografischen Daten zwischen den in 3.3. und 3.4. erarbeiteten klinischen Parametern (CAG-Wiederholungsanzahl, AAO, SARA-Score, INAS-Score) ist in Tabelle 47 eine Gegenüberstellung dargestellt, die gewisse Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen zeigt und somit Unterschiede zwischen den SCA3-Patienten und denen mit Parkinson-ähnlichem Phänotyp demonstriert. Zur Übersichtlichkeit sind die Gruppen der MT mit Kontrollen bezüglich der Medikamenteneinnahme nicht erneut erfasst worden, sondern lediglich die Gruppen der MT ohne Kontrollen.

Die CAG-Repeat-Länge bei Patienten mit PD-Medikation und atakt. MT lag mit einer Repeat-Länge von jeweils 69 Repeats, wie in Tabelle 47 ersichtlich, im Vergleich mit den nicht atakt. MT (Repeat-Länge: 66) deutlich höher. Die MT mit anderen Medikamenten als PD oder ganz ohne Medikamenteneinnahme hatten eine Repeat-Länge von ebenfalls 68 Repeats und lagen somit geringfügig unterhalb der SCA3-Patienten mit PD-Medikation und atakt. MT, aber hatten längere Repeats als die nicht atakt. MT. Da die Erkrankungsausprägung auch in Zusammenhang mit der Anzahl an CAG-Repeats steht, lässt sich vermuten, dass die Patienten mit einer höheren Repeat-Länge stärker erkrankt sind als die der anderen Gruppen. Dies spiegelt sich auch in den klinischen Daten, dem SARA- und INAS-Score, wider. Dieser ist bei den SCA3-Patienten mit PD-Medikation,

also mit Parkinson-ähnlichem Phänotyp, im Vergleich höher als bei allen anderen Gruppen. Zudem war erkennbar, dass auch ein früheres AAO von durchschnittlich 2 Jahren bei den SCA3-Patienten mit Parkinson-ähnlichem Phänotyp zu erkennen war. Dennoch zeigten sich in unseren Ergebnissen eher ähnliche *Repeat*-Längen zwischen den SCA3-Patienten und den SCA3-Patienten mit parkinson-ähnlichem Phänotyp. Auch Socal et al. konnte in seinen Untersuchungen ähnliche Repeat-Längen zwischen SCA3-Patienten und SCA3-Patienten, die zusätzlich Parkinson-Symptome zeigten, feststellen (Socal et al., 2009). Andere Untersuchungen ließen die Vermutung zu, dass SCA3-Patienten mit PD-Symptomen eher reduzierte CAG-*Repeat*-Längen gegenüber SCA3-Patienten aufweisen (Gwinn-Hardy et al., 2001). In neueren Untersuchungen wurde zudem diskutiert, ob SCA3-Patienten mit PD-Symptomen eher weniger als 70 CAG-Repeats zeigten (Kuo et al., 2022). Daher ist fraglich ob tatsächlich ein Zusammenhang zwischen der *Repeat*-Länge und einer PD-Symptomatik besteht.

Im Vergleich erkennt man, dass die SCA3 Patienten mit PD-Medikation zwar die gleiche CAG-Wiederholungsanzahl hatten wie die atakt. MT, zu denen die SCA3-Patienten mit PD-Medikation gehören, jedoch waren sowohl der SARA- als auch der INAS-Score der SCA3-Patienten mit PD-Medikation im Vergleich eher höher (SARA: 18, INAS: 6) als bei den atakt. MT (SARA: 14, INAS: 5).

Mit einem durchschnittlichen AAO der atakt. MT von 39 Jahren liegt dieser innerhalb des durchschnittlichen AAO in bereits publizierten Daten bei einem durchschnittlichen AAO zwischen 36 und 42 Jahren (Durr et al., 1996; Kieling et al., 2007; Klockgether et al., 1998). Der durchschnittliche SARA-Score der atakt. MT lag bei 14 Punkten und somit bei einer identischen mittleren Punktzahl wie bei den atakt. MT der europäischen EuroSCA-Kohorte (Jacobi et al., 2015). Der durchschnittliche INAS-Score bei den atakt. MT lag bei 5.

In dieser Arbeit zeigte sich im Vergleich des AAO zwischen SCA3-Patienten mit PD-Medikation, dementsprechend Patienten, die einen Parkinson-ähnlichen Phänotyp zeigten und den MT mit anderen Medikamenten ein Unterschied im AAO von 2 Jahren früheren Erkrankungsbeginn ( $p=0,0719$ ). Jedoch lag das AAO

der MT ohne jegliche Medikamenteneinnahme ebenfalls bei 37 Jahren, also dem gleichen AAO wie bei den SCA3-Patienten mit PD-Medikation.

Zur Einteilung der nicht atakt. Symptome sollte der INAS-Score herangezogen werden.

Erkennbar bei der Untersuchung der INAS-Untergruppen war, dass die meisten Probanden Symptome der Areflexie, Harnfunktionsstörungen, sowie Okkulomotorische Störungen zeigten.

Auf die INAS-Untergruppen 10 und 13 wurde ein besonderes Augenmerk gelegt, da diese mit Parkinson'schen Merkmalen assoziiert werden. Die Untergruppe 10 beschreibt den Parkinson-typischen Rigor und Untergruppe 13 den Ruhetremor. Von insgesamt 295 Probanden, für die die INAS-Untergruppen bekannt waren, zeigten lediglich 12 Probanden eine Rigidität und 5 einen Ruhetremor. Darunter waren keine Probanden ohne Medikamenteneinnahme bei der Rigidität, der Ruhetremor zeigte keinen Zusammenhang mit der Medikation der Probanden.

Weitere nicht-motorische Störungen wie Schlafstörungen konnten in der Vergangenheit gehäuft bei SCA3-Patienten festgestellt werden. Diese äußerten sich besonders im *Restless-Leg-Syndrom* (RLS) (Schols et al., 1998). Weitere Untersuchungen zeigten zudem, dass RLS-Symptome gehäuft bei einer Intermediären CAG-Wiederholungszahl vorkam (van Alfen et al., 2001).

In dieser Arbeit konnten bei beinahe 50 % der SCA3-Patienten mit PD-Medikation bei einem geringen SARA-Score von 0-1 RLS-Symptome festgestellt werden. Auch die SCA3-Patienten mit einem SARA-Score von 1,5-2,5 hatten beinahe zu 50 % RLS-Symptome. Patienten, die einen höheren SARA-Score aufwiesen, zeigten deutlich seltener RLS-Symptome.

Bei den klinischen Scores gilt es zu beachten, dass selbst etablierte Bewertungsmaßstäbe wie der INAS- und SARA-Score einerseits von einer nicht zu vermeidenden Subjektivität in der Bewertung des Krankheitsprozesses durch den Behandler und andererseits auch von der Tagesform des Patienten abhängig sind (Weir et al., 2011). Zudem stellen sie eine geringe Sensitivität gegenüber geringfügigen Änderungen im Krankheitsprozess dar.

Im longitudinalen Vergleich ergeben sich zudem Schwierigkeiten bei wechselnden Behandlern und der damit verbundenen subjektiven Einschätzung

des Krankheitsverlaufs auch in Korrelation zur Erfahrung des Behandlers. Auch in Bezug auf die Probanden ist ein Nachteil in der longitudinalen Untersuchung der mögliche Lerneffekt dieser bei Verwendung gleicher Untersuchungsmethoden und Übungen, die den Vergleich zwischen den Untersuchungszeitpunkten darstellen sollen.

Anschließend sollten erneut die *PARK2* SNPs mit einbezogen werden. In Vorstudien unserer Abteilung zeigten sich keine Unterschiede in klinischen Parametern zwischen den verschiedenen Genotypen, daher war es interessant die Genotypen-Verteilung zwischen den Kontrollen, nicht atakt. und atakt. MT zu betrachten, sowie gezielt die 49 beschriebenen SCA3-Patienten mit PD-Medikation. Jedoch hatten die meisten Probanden mit PD-Medikation bei allen SNPs (Bp 601, Bp 1239, Bp 1281) den Genotypen G/G (Vergleich Tabelle 42). Abweichungen zeigten sich in der Betrachtung der zugehörigen Parkin Protein-Level. Die Untersuchungen zeigten bei den atakt. MT die höchsten Parkin Protein-Level bei Exon 4 Bp 601 SNP G/G, Exon 10 Bp 1239 SNP G/C und bei Exon 11 Bp 1281 SNP G/G mit signifikant höheren Werten mit  $p=0,05$  gegenüber dem Genotyp G/A.

Somit lässt sich vermuten, dass der Genotyp G/C des Exon 10 Bp 1239 möglicherweise einen beeinflussenden Faktor auf die Pathogenese der SCA3 darstellt. Auch wenn die ESMI-Kohorte derzeit die größte europäische Kohorte ist, sollte dies in einer größeren Kohorte belegt bzw. weiter untersucht werden.

Die Tatsache, dass jeder Organismus anders auf äußere und innere Gegebenheiten reagiert und auch jeder Patient auf gewisse Medikationen unterschiedlich reagiert, sollte ebenfalls nicht außer Acht gelassen werden. Weiterhin bestehen möglicherweise auch Wechselwirkungen bei Einnahme mehrerer Medikamente, die in dieser Arbeit nicht miterfasst wurden.

Zudem sollen auch weitere klinische Faktoren wie beispielsweise das Körpergewicht einen Einfluss auf die Ausprägung der Erkrankung der SCA3 haben. Untersuchungen zeigten eine signifikante hypothalamische Atrophie mit verringertem tubulären Hypothalamusvolumen der mit dem *Body Mass Index* (BMI) assoziiert werden konnte und bei dem sich außerdem ein indirekter Effekt zur CAG-Wiederholungszahl zeigte (Guo et al., 2022). Diesen Aspekt ebenfalls

anhand der ESMI-Kohorte zu untersuchen, wäre sicherlich interessant gewesen, leider lagen zum Gewicht keine Angaben der Patienten vor.

### 4.3 Fazit und Ausblick

Derzeitig scheint die Forschung mehrere Biomarker in Bezug auf die SCA3 Erkrankung in Betracht zu ziehen, die je nach Fragestellung gezielt eingesetzt werden (Lima & Raposo, 2018). Anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Analyse der Metabolomdaten im Mausmodell ließen sich keine Anhaltspunkte auf Metabolite oder mögliche Biomarker in Bezug auf die Interaktion von Parkin und ATXN3 feststellen. In anderen Maus-Modellen zeigten Analysen des Plasmas zwischen an SCA3 erkrankten und gesunden Tieren jedoch 32 verschiedene Metabolite, die potenzielle Biomarker darstellen könnten (Toonen et al., 2018). Da in dieser Studie zwar das gleiche Mausmodell verwendet wurde, aber die Untersuchungen und Analysen zu unterschiedlichen Zeitpunkten stattfanden, konnte dies möglicherweise nicht validiert werden.

Der Einfluss von Parkin auf die Pathogenese der SCA3 hatte in den durchgeführten Verhaltensanalysen eher einen negativen Effekt auf die phänotypische Ausprägung. Die *double mutant* Mäuse zeigten in den durchgeführten Verhaltensanalysen im Vergleich mit den *single mutant* SCA3 YAC- und PARK2 ko-Mäuse einen ausgeprägteren motorischen Phänotyp.

Daher ist aufgrund der Verhaltensanalysen zu vermuten, dass die Interaktion von Parkin und ATXN3 eher einen verschlechternden Effekt auf die phänotypische Ausprägung der Ataxie bezüglich des Gleichgewichts und des Gangbildes haben könnte.

Leider konnte die Messung der Parkin Protein-Level und die Korrelation dieser zu verschiedenen klinischen Daten in SCA3-Patienten bisher keine Anhaltspunkte liefern, um als Einflussfaktor der SCA3 in seiner Proteinmenge aussagekräftige Ergebnisse zu liefern.

Es zeigten sich in der Messung der Protein-Level noch große Schwankungen, die keinen kausalen Zusammenhängen zugeordnet werden konnten. Zusätzlich

konnte ein Einfluss des Geschlechts auf die Parkin Proteinmenge beschrieben werden.

Es erscheint sinnvoll longitudinale Messungen durchzuführen, um diese Untersuchungen zu verifizieren.

Vielleicht konnte diese Arbeit dennoch einen Grundbaustein für weitere Forschungen der Parkin Protein-Level und den Zusammenhängen zwischen den Proteinen ATXN3 und Parkin liefern, um die Forschung in diesem Bereich voranzutreiben. Sinnvoll erscheint es, um die Korrelation der Parkin Protein-Level und ATXN3 Protein-Level genauer zu analysieren, diese gezielt in Bezug zueinander darzustellen und einen direkten Vergleich der Höhe dieser Level zueinander zu vergleichen. Und zwar ebenfalls in Abgrenzung der verschiedenen Gruppen: Kontrollen, nicht atakt. MT, atakt. MT, sowie SCA3-Patienten mit Parkinson-ähnlichem Phänotyp.

Besonders interessant scheint der Ansatz dies in einem longitudinalen Zeitraum zu untersuchen, um mögliche Veränderungen der Level festzuhalten und daraus weitere interessante Schlüsse bezüglich der Interaktion des Zusammenspiels zwischen den beiden Proteinen ziehen zu können.

Möglicherweise sollte in Betracht gezogen werden die Messung anhand des sensitiven TR-FRETs noch weiter zu verbessern, auch bezüglich der genutzten Bradford-Bestimmung zur Bestimmung der Gesamtproteinmenge, oder eine andere sensitivere Methode für die Messung der Protein-Level zu etablieren.

Alternativen für die Gesamtproteinkonzentration könnten Verfahren wie der BCA-Assay darstellen. Dieser wurde bereits in vergleichbaren Studien genutzt.

Forschungen im Bereich anderer neurodegenerativer Erkrankungen führten daher Protein-Messungen mittels ultra-sensitiven Methoden wie das *Single-molecule-counting* (SMC-Assay, Singulex) durch, wie beispielsweise in der Bestimmung des Huntingtin-Proteins, oder nutzten die Simoa-Technologie zur Messung von Neurofilamenten in einer Vielzahl von neurodegenerativen Erkrankungen wie beispielsweise HD, SCA3, ALS, PD und MS.

Hierbei scheint es auch sinnvoll nicht nur die Messung anhand von PBMC-Proben durchzuführen, sondern auch andere Proben wie beispielsweise CSF in Betracht zu ziehen, um einen näheren Zusammenhang zum Pathogeneseort der SCA3 zu haben. Denn die Ergebnisse der Metabolomanalysen zeigten in dieser Arbeit gravierende Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Entnahme im Cerebellum im Vergleich zum Plasma. Daher liegt die Annahme nahe, dass eine Entnahme im Plasma womöglich zu Ungenauigkeiten in den Ergebnissen führen kann.

Sinnvoll wären zudem weitere Untersuchungen der Probanden, die sich in der ESMI-Kohorte befinden, anhand der APOE SNPs, um diese weiter zu analysieren. Besonders in Bezug zu den 49 SCA3-Patienten mit Parkinson-Medikation, um festzustellen, ob auch diese primär das  $\epsilon 2 / \epsilon 3$  Allel, wie in der Literatur beschrieben, zeigen und diese Kombination möglicherweise als Biomarker dienen kann, um SCA3-Patienten herauszufiltern, die einen Parkinson-ähnlichen Phänotyp entwickeln könnten (Bettencourt, Santos, et al., 2011).

Bei der Suche nach weiteren Biomarkern der SCA3 ergaben sich in Untersuchungen zwischen Kontrollen, nicht atakt. MT und atakt. MT anhand von Blutproben die Expression von SAFB2, SFSWAP und LTBP4, MEG3, TSPOAP1 als mögliche Marker in der Krankheitsprogression der SCA3 (Raposo et al., 2023). Auch der Biomarker NfL schien in Untersuchungen als möglicher sensitiver Biomarker in Betracht zu kommen (Faber et al., 2023). Denn bereits in präataktischen Mutationsträgern zeigte sich eine Erhöhung der Plasma NFL-Werte. Amyloid Marker sollen in der Lage sein Gedächtnis-Dysfunktion und nicht-ataktische Symptome der SCA3 zu identifizieren (Shen et al., 2023).

Eine Therapie mit Coenzym Q10 zeigte in genetisch veränderten Mäusen bereits positive Effekte auf das Gangbild sowie ein gesteigertes Überleben von Purkinje-Zellen (Wu et al., 2022)

Auch andere Möglichkeiten der Diagnostik wie MRT und MRS zur Untersuchung von Biomarkern scheinen einen interessanten Ansatz für weitere Forschungen zu liefern (Miranda et al., 2022).

Weitere Ansätze in der SCA3-Forschung beziehen sich derzeit auf Antisense-Oligonukleotide (ASO), die zur Reduktion des Ataxin-3 Proteins durch Silencing des *ATXN3* Gens dienen sollen, von welchen vielversprechende Ergebnisse in naher Zukunft zu erwarten sind.

Denn diese zeigten im Maus-Modell bereits eine Reduktion des pathologischen Proteins um bis zu 50 % in den betroffenen Gehirnregionen (Moore et al., 2017). Somit lässt sich insgesamt sagen, dass es sinnvoll erscheint in der SCA3-Forschung weiterhin die Forschung in verschiedene Richtungen fortzuführen, da bisher in einigen Gebieten vielversprechende Ansatzpunkte erarbeitet werden konnten. Der Einfluss des Proteins Parkin auf die Pathogenese der SCA3 konnte bisher in den Untersuchungen weder widerlegt noch bestätigt werden. Da Parkin jedoch in zahlreichen neurodegenerativen Erkrankungen Einfluss zu haben scheint, erscheint es sinnvoll diesen Zusammenhang weiter zu analysieren.

## 5 Zusammenfassung

Bei der seltenen Erkrankung der Spinozerebellären Ataxie Typ 3 (SCA3) handelt es sich um eine autosomal dominant vererbte neurodegenerative Erkrankung, welche dem Formenkreis der Polyglutamin-Erkrankungen zugehörig ist. Zur Einschätzung des Krankheitsstadiums und -verlaufs zählen klinische Bewertungsskalen wie beispielsweise der SARA-Score. Dabei existiert jedoch zum aktuellen Zeitpunkt kein heiltherapeutischer Ansatz. Im *Ataxin3*-Gen (*ATXN3*) kommt es ursächlich für diese Erkrankung zu einer Expansion einer CAG-Wiederholungssequenz mit daraus folgendem verlängertem Polyglutaminbereich im Ataxin3-Protein (*ATXN3*) und einhergehend mit dem Untergang von Neuronen durch Proteinaggregation. Unter physiologischen Bedingungen interagieren das *ATXN3*-Protein und das Protein Parkin, welches durch das *PARK2*-Gen codiert wird, miteinander. Parkin ist am Abbau von Proteinen mit expandiertem Polyglutaminbereich beteiligt, während *ATXN3* Parkin deubiquitiniert.

Anhand der Kreuzung eines SCA3 Mausmodells mit einem Parkin *knockout* Modells sollte der Einfluss von Parkin auf die Pathogenese der SCA3 untersucht werden. Dafür wurden Metabolomdaten und Verhaltensanalysen eines doppelt-mutierten Mausmodells, welche das humane *ATXN3* mit 84 CAG-Wiederholungen hemizygot überexprimiert (SCA3 YAC) und parallel das *PARK2*-Gen homozygot ausgeschaltet hat, verglichen und ausgewertet.

Die Untersuchung der Metabolite brachte jedoch keinen Aufschluss auf mögliche bereits in der Literatur beschriebene Biomarker und es konnte kein aussagekräftiger Vergleich zwischen Metaboliten des Cerebellums im Vergleich mit der Probenentnahme im Plasma hergestellt werden.

In den Verhaltensanalysen waren bei den SCA3 YAC-Mäusen alle phänotypischen Merkmale der SCA3 ausgeprägt, die *PARK2* ko-Mäuse zeigten keine negative motorische Beeinflussung in den Untersuchungen. Bei den doppelt mutierten Mäusen (dm-YAC/*PARK2*) konnte eine zunehmende Verschlechterung der motorischen Fähigkeiten im Vergleich zu den anderen Mutanten und dem WT beschrieben werden.

Zudem wurde der Einfluss des Proteins Parkin ebenfalls in SCA3-Patienten in Bezug auf die Parkin Protein-Level und den Phänotyp in SCA3-Patienten anhand von klinischen Parametern untersucht. Die Parkin Protein-Level Bestimmung erfolgte mittels der sensitiven Messmethode des TR-FRETs. Außerdem wurden Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) im *PARK2*-Gen (Bp 601, Bp 1239, Bp 1281) mittels Fragmentlängenanalyse und spezifischen Primer bestimmt und auf klinische Parameter und die Parkin Protein-Level korreliert.

Die Bestimmung der Parkin Protein-Level ließ vermuten, dass Mutationsträger (MT) im Vergleich zu gesunden Kontrollen zwar höhere Parkin Protein-Level aufwiesen, aber auch männliche Probanden schienen höhere Proteinkonzentrationen von Parkin zu haben als weibliche Probanden. Ein Zusammenhang zwischen den Parkin Protein-Leveln und bereits bekannten *PARK2* SNPs (SNP Bp601, Bp1239, Bp1281) konnte in dieser Studie nicht verifiziert werden.

Da sich einige SCA3-Patienten mit klinischem Phänotyp eines Parkinsonismus zeigten, erfolgte eine weitere Einteilung dieser Patienten. Dabei sollten die Patienten, die Parkinson (PD) Medikamente bekamen auch anhand von klinischen Bewertungsskalen (*SARA-Score*, *INAS-Score*) genauer analysiert werden.

Diese SCA3-Patienten mit Einnahme von PD-Medikamenten zeigten im Vergleich zu den ataktischen MT, sowie im Vergleich zu MT mit anderer Medikamenteneinnahme oder ohne Medikamenteneinnahme ein früheres *Age at Onset* (AAO), sowie eine höhere CAG-Wiederholungsanzahl und höhere *Score*-Werte bei den klinischen Bewertungsskalen SARA und INAS.

## 6 Literaturverzeichnis

- Adegbuyiro, A., Sedighi, F., Pilkington, A. W. t., Groover, S., & Legleiter, J. (2017). Proteins Containing Expanded Polyglutamine Tracts and Neurodegenerative Disease. *Biochemistry*, 56(9), 1199-1217. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.6b00936>
- Akcimen, F., Martins, S., Liao, C., Bourassa, C. V., Catoire, H., Nicholson, G. A., Riess, O., Raposo, M., Franca, 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(6), 4742-4756. <https://doi.org/10.18632/aging.102825>
- 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. *Neurobiology of Disease*, 36(2), 280-292. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.020>
- 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. *Human Molecular Genetics*, 20(15), 2928-2941. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr197>
- Armengou, A., Hurtado, O., Leira, R., Obon, M., Pascual, C., Moro, M. A., Lizasoain, I., Castillo, J., & Davalos, A. (2003). L-arginine levels in blood as a marker of nitric oxide-mediated brain damage in acute stroke: a clinical and experimental study. *J Cereb Blood Flow Metab*, 23(8), 978-984. <https://doi.org/10.1097/01.WCB.0000080651.64357.C6>
- Ashizawa, T., Oz, G., & Paulson, H. L. (2018). Spinocerebellar ataxias: prospects and challenges for therapy development. *Nature Reviews Neurology*, 14(10), 590-605. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0051-6>
- 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(7652), 108-111. <https://doi.org/10.1038/nature22078>
- Bai, J. J., Safadi, S. S., Mercier, P., Barber, K. R., & Shaw, G. S. (2013). Ataxin-3 is a multivalent ligand for the parkin Ubl domain. *Biochemistry*, 52(42), 7369-7376. <https://doi.org/10.1021/bi400780v>
- Becanovic, K., Pouladi, M. A., Lim, R. S., Kuhn, A., Pavlidis, P., Luthi-Carter, R., Hayden, M. R., & Leavitt, B. R. (2010). Transcriptional changes in Huntington disease identified using genome-wide expression profiling and cross-platform analysis. *Human Molecular Genetics*, 19(8), 1438-1452. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq018>
- 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., . . . Jones, L. (2016). DNA

- repair pathways underlie a common genetic mechanism modulating onset in polyglutamine diseases. *Annals of Neurology*, 79(6), 983-990. <https://doi.org/10.1002/ana.24656>
- Bettencourt, C., & Lima, M. (2011). Machado-Joseph Disease: from first descriptions to new perspectives. *Orphanet J Rare Dis*, 6, 35. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-6-35>
- Bettencourt, C., Raposo, M., Kazachkova, N., Cymbron, T., Santos, C., Kay, T., Vasconcelos, J., Maciel, P., Donis, K. C., Saraiva-Pereira, M. L., Jardim, L. B., Sequeiros, J., & Lima, M. (2011). The APOE epsilon2 allele increases the risk of earlier age at onset in Machado-Joseph disease. *Arch Neurol*, 68(12), 1580-1583. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2011.636>
- Bettencourt, C., Santos, C., Coutinho, P., Rizzu, P., Vasconcelos, J., Kay, T., Cymbron, T., Raposo, M., Heutink, P., & Lima, M. (2011). Parkinsonian phenotype in Machado-Joseph disease (MJD/SCA3): a two-case report. *BMC Neurol*, 11, 131. <https://doi.org/10.1186/1471-2377-11-131>
- Bettencourt, C., Santos, C., Montiel, R., Costa Mdo, C., Cruz-Morales, P., Santos, L. R., Simoes, N., Kay, T., Vasconcelos, J., Maciel, P., & Lima, M. (2010). Increased transcript diversity: novel splicing variants of Machado-Joseph disease gene (ATXN3). *Neurogenetics*, 11(2), 193-202. <https://doi.org/10.1007/s10048-009-0216-y>
- Biskup, S., Gerlach, M., Kupsch, A., Reichmann, H., Riederer, P., Vieregge, P., Wullner, U., & Gasser, T. (2008). Genes associated with Parkinson syndrome. *Journal of Neurology*, 255 Suppl 5, 8-17. <https://doi.org/10.1007/s00415-008-5005-2>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Brusse, E., Maat-Kievit, J. A., & van Swieten, J. C. (2007). Diagnosis and management of early- and late-onset cerebellar ataxia. *Clin Genet*, 71(1), 12-24. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2006.00722.x>
- Buhmann, C., Bussopulos, A., & Oechsner, M. (2003). Dopaminergic response in Parkinsonian phenotype of Machado-Joseph disease. *Mov Disord*, 18(2), 219-221. <https://doi.org/10.1002/mds.10322>
- Buhmann, C., Glauche, V., Sturenburg, H. J., Oechsner, M., Weiller, C., & Buchel, C. (2003). Pharmacologically modulated fMRI--cortical responsiveness to levodopa in drug-naive hemiparkinsonian patients. *Brain*, 126(Pt 2), 451-461. <https://doi.org/10.1093/brain/awg033>
- 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. *Journal of Neurology*, 246(9), 789-797. <https://doi.org/10.1007/s004150050456>
- Burnett, B., Li, F., & Pittman, R. N. (2003). The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin-3 binds polyubiquitylated proteins and has ubiquitin protease activity. *Human Molecular Genetics*, 12(23), 3195-3205. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg344>

- Burnett, B. G., & Pittman, R. N. (2005). The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin 3 regulates aggresome formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(12), 4330-4335. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407252102>
- Bux, J., Sen, N. E., Klink, I. M., Hauser, S., Synofzik, M., Schols, L., Auburger, G., Riess, O., & Hubener-Schmid, J. (2023). TR-FRET-Based Immunoassay to Measure Ataxin-2 as a Target Engagement Marker in Spinocerebellar Ataxia Type 2. *Mol Neurobiol*, *60*(6), 3553-3567. <https://doi.org/10.1007/s12035-023-03294-y>
- Cancel, G., Abbas, N., Stevanin, G., Durr, A., Chneiweiss, H., Neri, C., Duyckaerts, C., Penet, C., Cann, H. M., Agid, Y., & et al. (1995). Marked phenotypic heterogeneity associated with expansion of a CAG repeat sequence at the spinocerebellar ataxia 3/Machado-Joseph disease locus. *American Journal of Human Genetics*, *57*(4), 809-816. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7573040>
- Cemal, C. K., Carroll, C. J., Lawrence, L., Lowrie, M. B., Ruddle, P., Al-Mahdawi, S., King, R. H., Pook, M. A., Huxley, C., & Chamberlain, S. (2002). YAC transgenic mice carrying pathological alleles of the MJD1 locus exhibit a mild and slowly progressive cerebellar deficit. *Human Molecular Genetics*, *11*(9), 1075-1094. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.9.1075>
- Cerri, S., Mus, L., & Blandini, F. (2019). Parkinson's Disease in Women and Men: What's the Difference? *J Parkinsons Dis*, *9*(3), 501-515. <https://doi.org/10.3233/JPD-191683>
- Chatterjee, A., Saha, S., Chakraborty, A., Silva-Fernandes, A., Mandal, S. M., Neves-Carvalho, A., Liu, Y., Pandita, R. K., Hegde, M. L., Hegde, P. M., Boldogh, I., Ashizawa, T., Koeppen, A. H., Pandita, T. K., Maciel, P., Sarkar, P. S., & Hazra, T. K. (2015). The role of the mammalian DNA end-processing enzyme polynucleotide kinase 3'-phosphatase in spinocerebellar ataxia type 3 pathogenesis. *PLoS Genet*, *11*(1), e1004749. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004749>
- Chen, X., Tang, T. S., Tu, H., Nelson, O., Pook, M., Hammer, R., Nukina, N., & Bezprozvanny, I. (2008). Deranged calcium signaling and neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 3. *J Neurosci*, *28*(48), 12713-12724. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3909-08.2008>
- Cohen, N., Zahavy, E., Zichel, R., & Fisher, M. (2016). An internal standard approach for homogeneous TR-FRET immunoassays facilitates the detection of bacteria, biomarkers, and toxins in complex matrices. *Anal Bioanal Chem*, *408*(19), 5179-5188. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9602-0>
- Cookson, M. R. (2003). Parkin's substrates and the pathways leading to neuronal damage. *Neuromolecular Med*, *3*(1), 1-13. <https://doi.org/10.1385/NMM:3:1:1>
- Cossu, D., Yokoyama, K., Sechi, L. A., & Hattori, N. (2021). Potential of PINK1 and PARKIN Proteins as Biomarkers for Active Multiple Sclerosis: A Japanese Cohort Study. *Front Immunol*, *12*, 681386. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.681386>
- Costa Mdo, C., Luna-Cancelon, K., Fischer, S., Ashraf, N. S., Ouyang, M., Dharia, R. M., Martin-Fishman, L., Yang, Y., Shakkottai, V. G., Davidson, B. L., Rodriguez-Lebron, E., & Paulson, H. L. (2013). Toward RNAi

- therapy for the polyglutamine disease Machado-Joseph disease. *Molecular Therapy*, 21(10), 1898-1908. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.144>
- Costa Mdo, C., & Paulson, H. L. (2012). Toward understanding Machado-Joseph disease. *Prog Neurobiol*, 97(2), 239-257. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.11.006>
- Coutinho, P., & Andrade, C. (1978). Autosomal dominant system degeneration in Portuguese families of the Azores Islands. A new genetic disorder involving cerebellar, pyramidal, extrapyramidal and spinal cord motor functions. *Neurology*, 28(7), 703-709. <https://doi.org/10.1212/wnl.28.7.703>
- Cui, X., Liang, Q., Liang, Y., Lu, M., Ding, Y., & Lu, B. (2014). TR-FRET assays of Huntingtin protein fragments reveal temperature and polyQ length-dependent conformational changes. *Sci Rep*, 4, 5601. <https://doi.org/10.1038/srep05601>
- D'Ascenzo, N., Antonecchia, E., Angiolillo, A., Bender, V., Camerlenghi, M., Xie, Q., & Di Costanzo, A. (2022). Metabolomics of blood reveals age-dependent pathways in Parkinson's Disease. *Cell Biosci*, 12(1), 102. <https://doi.org/10.1186/s13578-022-00831-5>
- 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(1), 65-70. <https://doi.org/10.1038/ng0997-65>
- Dawson, T. M., & Dawson, V. L. (2014). Parkin plays a role in sporadic Parkinson's disease. *Neurodegener Dis*, 13(2-3), 69-71. <https://doi.org/10.1159/000354307>
- Diallo, A., Jacobi, H., Cook, A., Labrum, R., Durr, A., Brice, A., Charles, P., Marelli, C., Mariotti, C., Nanetti, L., Panzeri, M., Rakowicz, M., Sobanska, A., Sulek, A., Schmitz-Hubsch, T., Schols, L., Hengel, H., Melegh, B., Filla, A., . . . Tezenas du Montcel, S. (2018). Survival in patients with spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6 (EUROSCA): a longitudinal cohort study. *Lancet Neurol*, 17(4), 327-334. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30042-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30042-5)
- Donaldson, K. M., Yin, H., Gekakis, N., Supek, F., & Joazeiro, C. A. (2003). Ubiquitin signals protein trafficking via interaction with a novel ubiquitin binding domain in the membrane fusion regulator, Vps9p. *Curr Biol*, 13(3), 258-262. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(03\)00043-5](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(03)00043-5)
- Donis, K. C., Saute, J. A., Krum-Santos, A. C., Furtado, G. V., Mattos, E. P., Saraiva-Pereira, M. L., Torman, V. L., & Jardim, L. B. (2016). Spinocerebellar ataxia type 3/Machado-Joseph disease starting before adolescence. *Neurogenetics*, 17(2), 107-113. <https://doi.org/10.1007/s10048-016-0473-5>
- Durcan, T. M., & Fon, E. A. (2011). Mutant ataxin-3 promotes the autophagic degradation of parkin. *Autophagy*, 7(2), 233-234. <https://doi.org/10.4161/auto.7.2.14224>

- Durcan, T. M., & Fon, E. A. (2013). Ataxin-3 and its e3 partners: implications for machado-joseph disease. *Front Neurol*, 4, 46. <https://doi.org/10.3389/fneur.2013.00046>
- Durcan, T. M., Kontogianna, 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(1), 531-541. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.288449>
- Durcan, T. M., Kontogianna, 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. *Human Molecular Genetics*, 20(1), 141-154. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq452>
- 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. *Annals of Neurology*, 39(4), 490-499. <https://doi.org/10.1002/ana.410390411>
- Evers, M. M., Toonen, L. J., & van Roon-Mom, W. M. (2014). Ataxin-3 protein and RNA toxicity in spinocerebellar ataxia type 3: current insights and emerging therapeutic strategies. *Mol Neurobiol*, 49(3), 1513-1531. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8596-2>
- Faber, J., Berger, M., Carlo, W., Hubener-Schmid, J., Schaprian, T., Santana, M. M., Grobe-Einsler, M., Onder, D., Koyak, B., Giunti, P., Garcia-Moreno, H., Gonzalez-Robles, C., Lima, M., Raposo, M., Vieira Melo, A. R., de Almeida, L. P., Silva, P., Pinto, M. M., van de Warrenburg, B. P., . . . Klockgether, T. (2023). Stage-dependent biomarker changes in spinocerebellar ataxia type 3. *medRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2023.04.21.23287817>
- Giles, P., Elliston, L., Higgs, G. V., Brooks, S. P., Dunnett, S. B., & Jones, L. (2012). Longitudinal analysis of gene expression and behaviour in the HdhQ150 mouse model of Huntington's disease. *Brain Res Bull*, 88(2-3), 199-209. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.10.001>
- Globas, C., du Montcel, S. T., Baliko, L., Boesch, S., Depondt, 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(15), 2232-2238. <https://doi.org/10.1002/mds.22288>
- Gonsior, K., Kaucher, G. A., Pelz, P., Schumann, D., Gansel, M., Kuhs, S., Klockgether, T., Forlani, S., Durr, A., Hauser, S., Rattay, T. W., Synofzik, M., Hengel, H., Schols, L., Riess, O. H., & Hubener-Schmid, J. (2021). PolyQ-expanded ataxin-3 protein levels in peripheral blood mononuclear cells correlate with clinical parameters in SCA3: a pilot study. *Journal of Neurology*, 268(4), 1304-1315. <https://doi.org/10.1007/s00415-020-10274-y>
- Goti, D., Katzen, S. M., Mez, J., Kurtis, N., Kiluk, J., Ben-Haiem, L., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Kakizuka, A., Sharp, A. H., Ross, C. A., Mouton, P.

- R., & Colomer, V. (2004). A mutant ataxin-3 putative-cleavage fragment in brains of Machado-Joseph disease patients and transgenic mice is cytotoxic above a critical concentration. *J Neurosci*, *24*(45), 10266-10279. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2734-04.2004>
- Gu, W., Ma, H., Wang, K., Jin, M., Zhou, Y., Liu, X., Wang, G., & Shen, Y. (2004). The shortest expanded allele of the MJD1 gene in a Chinese MJD kindred with autonomic dysfunction. *Eur Neurol*, *52*(2), 107-111. <https://doi.org/10.1159/000080221>
- Guo, J., Jiang, Z., Biswal, B. B., Zhou, B., Xie, D., Gao, Q., Sheng, W., Chen, H., Zhang, Y., Fan, Y., Wang, J., Liu, C., & Chen, H. (2022). Hypothalamic Atrophy, Expanded CAG Repeat, and Low Body Mass Index in Spinocerebellar Ataxia Type 3. *Mov Disord*, *37*(7), 1541-1546. <https://doi.org/10.1002/mds.29029>
- Gusella, J. F., & MacDonald, M. E. (2009). Huntington's disease: the case for genetic modifiers. *Genome Med*, *1*(8), 80. <https://doi.org/10.1186/gm80>
- Gwinn-Hardy, K., Singleton, A., O'Suilleabhain, P., Boss, M., Nicholl, D., Adam, A., Hussey, J., Critchley, P., Hardy, J., & Farrer, M. (2001). Spinocerebellar ataxia type 3 phenotypically resembling parkinson disease in a black family. *Arch Neurol*, *58*(2), 296-299. <https://doi.org/10.1001/archneur.58.2.296>
- 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. *Human Molecular Genetics*, *15*(4), 555-568. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi472>
- Haas, E., Incebacak, R. D., Hentrich, T., Huridou, C., Schmidt, T., Casadei, N., Maringer, Y., Bahl, C., Zimmermann, F., Mills, J. D., Aronica, E., Riess, O., Schulze-Hentrich, J. M., & Hubener-Schmid, J. (2022). A Novel SCA3 Knock-in Mouse Model Mimics the Human SCA3 Disease Phenotype Including Neuropathological, Behavioral, and Transcriptional Abnormalities Especially in Oligodendrocytes. *Mol Neurobiol*, *59*(1), 495-522. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02610-8>
- Hampton, R. Y. (2002). ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation. *Curr Opin Cell Biol*, *14*(4), 476-482. [https://doi.org/10.1016/s0955-0674\(02\)00358-7](https://doi.org/10.1016/s0955-0674(02)00358-7)
- Hanley, R. P., Horvath, S., An, J., Hof, F., & Wulff, J. E. (2016). Salicylates are interference compounds in TR-FRET assays. *Bioorg Med Chem Lett*, *26*(3), 973-977. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.12.050>
- Harding, A. (1987). Degenerative ataxic disorders: still perplexing. *Br Med J (Clin Res Ed)*, *295*(6608), 1223-1224. <https://doi.org/10.1136/bmj.295.6608.1223-a>
- Harmuth, T., Prell-Schicker, C., Weber, J. J., Gellerich, F., Funke, C., Driessen, S., Magg, J. C. D., Krebiehl, G., Wolburg, H., Hayer, S. N., Hauser, S., Kruger, R., Schols, L., Riess, O., & Hubener-Schmid, J. (2018). Mitochondrial Morphology, Function and Homeostasis Are Impaired by Expression of an N-terminal Calpain Cleavage Fragment of Ataxin-3. *Front Mol Neurosci*, *11*, 368. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00368>
- Hebron, M., Chen, W., Miessau, M. J., Lonskaya, I., & Moussa, C. E. (2014). Parkin reverses TDP-43-induced cell death and failure of amino acid

- homeostasis. *J Neurochem*, 129(2), 350-361. <https://doi.org/10.1111/jnc.12630>
- 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(9), 1324-1332. <https://doi.org/10.1002/humu.22132>
- Houlden, H., & Singleton, A. B. (2012). The genetics and neuropathology of Parkinson's disease. *Acta Neuropathol*, 124(3), 325-338. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1013-5>
- 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. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00196>
- Huang, S. R., Wu, Y. T., Jao, C. W., Soong, B. W., Lirng, J. F., Wu, H. M., & Wang, P. S. (2017). CAG repeat length does not associate with the rate of cerebellar degeneration in spinocerebellar ataxia type 3. *Neuroimage Clin*, 13, 97-105. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2016.11.007>
- Huang, X., Chen, P. C., & Poole, C. (2004). APOE-[epsilon]2 allele associated with higher prevalence of sporadic Parkinson disease. *Neurology*, 62(12), 2198-2202. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000130159.28215.6a>
- Hubener, J., Casadei, N., Teismann, P., Seeliger, M. W., Bjorkqvist, M., von Horsten, S., Riess, O., & Nguyen, H. P. (2012). Automated behavioral phenotyping reveals presymptomatic alterations in a SCA3 genetrapp mouse model. *J Genet Genomics*, 39(6), 287-299. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2012.04.009>
- Hubener, J., Vauti, F., Funke, C., Wolburg, H., Ye, Y., Schmidt, T., Wolburg-Buchholz, K., Schmitt, I., Gardyan, A., Driessen, S., Arnold, H. H., Nguyen, H. P., & Riess, O. (2011). N-terminal ataxin-3 causes neurological symptoms with inclusions, endoplasmic reticulum stress and ribosomal dislocation. *Brain*, 134(Pt 7), 1925-1942. <https://doi.org/10.1093/brain/awr118>
- Hwangbo, N., Zhang, X., Raftery, D., Gu, H., Hu, S. C., Montine, T. J., Quinn, J. F., Chung, K. A., Hiller, A. L., Wang, D., Fei, Q., Bettcher, L., Zabetian, C. P., Peskind, E. R., Li, G., Promislow, D. E. L., Davis, M. Y., & Franks, A. (2022). Predictive Modeling of Alzheimer's and Parkinson's Disease Using Metabolomic and Lipidomic Profiles from Cerebrospinal Fluid. *Metabolites*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/metabo12040277>
- 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., . . . 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. *Human Molecular Genetics*, 5(7), 923-932. <https://doi.org/10.1093/hmg/5.7.923>
- Imai, Y., Soda, M., & Takahashi, R. (2000). Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity. *J*

- Biol Chem*, 275(46), 35661-35664.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.C000447200>
- 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(3), 285-291. <https://doi.org/10.1038/ng1196-285>
- Isashiki, Y., Kii, Y., Ohba, N., & Nakagawa, M. (2001). Retinopathy associated with Machado--Joseph disease (spinocerebellar ataxia 3) with CAG trinucleotide repeat expansion. *Am J Ophthalmol*, 131(6), 808-810. [https://doi.org/10.1016/s0002-9394\(00\)00891-6](https://doi.org/10.1016/s0002-9394(00)00891-6)
- Itier, J. M., Ibanez, P., Mena, M. A., Abbas, N., Cohen-Salmon, C., Bohme, G. A., Laville, M., Pratt, J., Corti, O., Pradier, L., Ret, G., Joubert, C., Periquet, M., Araujo, F., Negroni, J., Casarejos, M. J., Canals, S., Solano, R., Serrano, A., . . . Garcia de Yebenes, J. (2003). Parkin gene inactivation alters behaviour and dopamine neurotransmission in the mouse. *Human Molecular Genetics*, 12(18), 2277-2291. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg239>
- Jacobi, H., Bauer, P., Giunti, P., Labrum, R., Sweeney, M. G., Charles, P., Durr, A., Marelli, C., Globas, C., Linnemann, C., Schols, L., Rakowicz, M., Rola, R., Zdzienicka, E., Schmitz-Hubsch, T., Fancellu, R., Mariotti, C., Tomasello, C., Baliko, L., . . . Klockgether, T. (2011). The natural history of spinocerebellar ataxia type 1, 2, 3, and 6: a 2-year follow-up study. *Neurology*, 77(11), 1035-1041. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31822e7ca0>
- Jacobi, H., du Montcel, S. T., Bauer, P., Giunti, P., Cook, A., Labrum, R., Parkinson, M. H., Durr, A., Brice, A., Charles, P., Marelli, C., Mariotti, C., Nanetti, L., Panzeri, M., Rakowicz, M., Sulek, A., Sobanska, A., Schmitz-Hubsch, T., Schols, L., . . . Klockgether, T. (2015). Long-term disease progression in spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6: a longitudinal cohort study. *Lancet Neurol*, 14(11), 1101-1108. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00202-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00202-1)
- 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., Meleggh, B., Kang, J. S., Giunti, P., van de Warrenburg, B. P., . . . Klockgether, T. (2013). Inventory of Non-Ataxia Signs (INAS): validation of a new clinical assessment instrument. *Cerebellum*, 12(3), 418-428. <https://doi.org/10.1007/s12311-012-0421-3>
- Jimenez-Jimenez, F. J., Alonso-Navarro, H., Garcia-Martin, E., & Agundez, J. A. G. (2020). Cerebrospinal and blood levels of amino acids as potential biomarkers for Parkinson's disease: review and meta-analysis. *Eur J Neurol*, 27(11), 2336-2347. <https://doi.org/10.1111/ene.14470>
- Kahns, S., Kalai, M., Jakobsen, L. D., Clark, B. F., Vandenabeele, P., & Jensen, P. H. (2003). Caspase-1 and caspase-8 cleave and inactivate cellular parkin. *J Biol Chem*, 278(26), 23376-23380. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300495200>

- Kahns, S., Lykkebo, S., Jakobsen, L. D., Nielsen, M. S., & Jensen, P. H. (2002). Caspase-mediated parkin cleavage in apoptotic cell death. *J Biol Chem*, 277(18), 15303-15308. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111534200>
- Kawaguchi, Y., Okamoto, T., Taniwaki, M., Aizawa, M., Inoue, M., Katayama, S., Kawakami, H., Nakamura, S., Nishimura, M., Akiguchi, I., & et al. (1994). CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet*, 8(3), 221-228. <https://doi.org/10.1038/ng1194-221>
- Kieling, C., Prestes, P. R., Saraiva-Pereira, M. L., & Jardim, L. B. (2007). Survival estimates for patients with Machado-Joseph disease (SCA3). *Clin Genet*, 72(6), 543-545. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2007.00910.x>
- 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(6676), 605-608. <https://doi.org/10.1038/33416>
- 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(8), 1405-1412. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A4760>
- 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. <https://doi.org/10.1093/brain/121.4.589>
- Klockgether, T., Mariotti, C., & Paulson, H. L. (2019). Spinocerebellar ataxia. *Nat Rev Dis Primers*, 5(1), 24. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0074-3>
- Klockgether, T., & Paulson, H. (2011). Milestones in ataxia. *Mov Disord*, 26(6), 1134-1141. <https://doi.org/10.1002/mds.23559>
- 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(49), 47358-47365. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207783200>
- 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(1), 9-13. <https://doi.org/10.1038/ng0194-9>
- Kuo, M. C., Tai, C. H., Tseng, S. H., & Wu, R. M. (2022). Long-term efficacy of bilateral subthalamic deep brain stimulation in the parkinsonism of SCA 3: A rare case report. *Eur J Neurol*, 29(8), 2544-2547. <https://doi.org/10.1111/ene.15339>
- Kuroda, Y., Mitsui, T., Kunishige, M., & Matsumoto, T. (2006). Parkin affects mitochondrial function and apoptosis in neuronal and myogenic cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 348(3), 787-793. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.06.201>
- 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(6330), 77-79. <https://doi.org/10.1038/352077a0>
- Laco, M. N., Cortes, L., Travis, S. M., Paulson, H. L., & Rego, A. C. (2012). Valosin-containing protein (VCP/p97) is an activator of wild-type ataxin-3. *Plos One*, 7(9), e43563. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043563>
- Lang, A. E., Rogaeva, E. A., Tsuda, T., Hutterer, J., & St George-Hyslop, P. (1994). Homozygous inheritance of the Machado-Joseph disease gene. *Annals of Neurology*, 36(3), 443-447. <https://doi.org/10.1002/ana.410360318>
- Langfelder, P., Cantle, J. P., Chatzopoulou, D., Wang, N., Gao, F., Al-Ramahi, I., Lu, X. H., Ramos, E. M., El-Zein, K., Zhao, Y., Deverasetty, S., Tebbe, A., Schaab, C., Lavery, D. J., Howland, D., Kwak, S., Botas, J., Aaronson, J. S., Rosinski, J., . . . Yang, X. W. (2016). Integrated genomics and proteomics define huntingtin CAG length-dependent networks in mice. *Nat Neurosci*, 19(4), 623-633. <https://doi.org/10.1038/nn.4256>
- Leotti, V. B., de Vries, J. J., Oliveira, C. M., de Mattos, E. P., Te Meerman, G. J., Brunt, E. R., Kampinga, H. H., Jardim, L. B., & Verbeek, D. S. (2021). CAG Repeat Size Influences the Progression Rate of Spinocerebellar Ataxia Type 3. *Annals of Neurology*, 89(1), 66-73. <https://doi.org/10.1002/ana.25919>
- Li, F., Macfarlan, T., Pittman, R. N., & Chakravarti, D. (2002). Ataxin-3 is a histone-binding protein with two independent transcriptional corepressor activities. *J Biol Chem*, 277(47), 45004-45012. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205259200>
- Li, Q. F., Cheng, H. L., Yang, L., Ma, Y., Zhao, J. J., Dong, Y., & Wu, Z. Y. (2020). Clinical features and genetic characteristics of homozygous spinocerebellar ataxia type 3. *Mol Genet Genomic Med*, 8(9), e1314. <https://doi.org/10.1002/mgg3.1314>
- Liang, Y., Yao, Y., Lu, M., Hou, J., Yu, S., & Lu, B. (2014). TR-FRET Assays for Endogenous Huntingtin Protein Level in Mouse Cells. *J Huntingtons Dis*, 3(3), 253-259. <https://doi.org/10.3233/JHD-140104>
- 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. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-71779-1\\_16](https://doi.org/10.1007/978-3-319-71779-1_16)
- Lopes, T. M., D'Abreu, A., Franca, M. C., Jr., Yasuda, C. L., Betting, L. E., Samara, A. B., Castellano, G., Somazz, J. C., Balthazar, M. L., Lopes-Cendes, I., & Cendes, F. (2013). Widespread neuronal damage and cognitive dysfunction in spinocerebellar ataxia type 3. *Journal of Neurology*, 260(9), 2370-2379. <https://doi.org/10.1007/s00415-013-6998-8>
- Lu, C. S., Chang, H. C., Kuo, P. C., Liu, Y. L., Wu, W. S., Weng, Y. H., Yen, T. C., & Chou, Y. H. (2004). The parkinsonian phenotype of spinocerebellar ataxia type 3 in a Taiwanese family. *Parkinsonism Relat Disord*, 10(6), 369-373. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2004.03.009>
- Lu, C. S., Wu Chou, Y. H., Kuo, P. C., Chang, H. C., & Weng, Y. H. (2004). The parkinsonian phenotype of spinocerebellar ataxia type 2. *Arch Neurol*, 61(1), 35-38. <https://doi.org/10.1001/archneur.61.1.35>

- 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(9), 1253-1256. <https://doi.org/10.1001/archneur.60.9.1253>
- Lysenko, L., Grewal, R. P., Ma, W., & Peddareddygar, L. R. (2010). Homozygous Machado Joseph Disease: a case report and review of literature. *Can J Neurol Sci*, 37(4), 521-523. <https://doi.org/10.1017/s0317167100010581>
- MacDonald, M. E., Barnes, G., Srinidhi, J., Duyao, M. P., Ambrose, C. M., Myers, R. H., Gray, J., Conneally, P. M., Young, A., Penney, J., & et al. (1993). Gametic but not somatic instability of CAG repeat length in Huntington's disease. *J Med Genet*, 30(12), 982-986. <https://doi.org/10.1136/jmg.30.12.982>
- 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(11), 1821-1827. <https://doi.org/10.1001/archneur.58.11.1821>
- 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. *American Journal of Human Genetics*, 57(1), 54-61. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7611296>
- Mahley, R. W. (1988). Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*, 240(4852), 622-630. <https://doi.org/10.1126/science.3283935>
- Mally, J., Szalai, G., & Stone, T. W. (1997). Changes in the concentration of amino acids in serum and cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease. *J Neurol Sci*, 151(2), 159-162. [https://doi.org/10.1016/s0022-510x\(97\)00119-6](https://doi.org/10.1016/s0022-510x(97)00119-6)
- Mao, Y., Senic-Matuglia, F., Di Fiore, P. P., Polo, S., Hodsdon, M. E., & De Camilli, P. (2005). Deubiquitinating function of ataxin-3: insights from the solution structure of the Josephin domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(36), 12700-12705. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506344102>
- 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. *Human Molecular Genetics*, 4(5), 807-812. <https://doi.org/10.1093/hmg/4.5.807>
- Masino, L., Musi, V., Menon, R. P., Fusi, P., Kelly, G., Frenkiel, T. A., Trottier, Y., & Pastore, A. (2003). Domain architecture of the polyglutamine protein ataxin-3: a globular domain followed by a flexible tail. *FEBS Lett*, 549(1-3), 21-25. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(03\)00748-8](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)00748-8)
- Matsuda, N., Kitami, T., Suzuki, T., Mizuno, Y., Hattori, N., & Tanaka, K. (2006). Diverse effects of pathogenic mutations of Parkin that catalyze multiple monoubiquitylation in vitro. *J Biol Chem*, 281(6), 3204-3209. <https://doi.org/10.1074/jbc.M510393200>

- McLoughlin, H. S., Moores, L. R., & Paulson, H. L. (2020). Pathogenesis of SCA3 and implications for other polyglutamine diseases. *Neurobiology of Disease*, 134. <https://doi.org/ARTN104635>
- 10.1016/j.nbd.2019.104635
- Miranda, C. O., Nobre, R. J., Paiva, V. H., Duarte, J. V., Castelhana, J., Petrella, L. I., Sereno, J., Santana, M., Afonso, S., Januario, C., Castelo-Branco, M., & de Almeida, L. P. (2022). Cerebellar morphometric and spectroscopic biomarkers for Machado-Joseph Disease. *Acta Neuropathol Commun*, 10(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s40478-022-01329-4>
- Molina, J. A., Jimenez-Jimenez, F. J., Gomez, P., Vargas, C., Navarro, J. A., Orti-Pareja, M., Gasalla, T., Benito-Leon, J., Bermejo, F., & Arenas, J. (1997). Decreased cerebrospinal fluid levels of neutral and basic amino acids in patients with Parkinson's disease. *J Neurol Sci*, 150(2), 123-127. [https://doi.org/10.1016/s0022-510x\(97\)00069-5](https://doi.org/10.1016/s0022-510x(97)00069-5)
- Moore, L. R., Rajpal, G., Dillingham, I. T., Qutob, M., Blumenstein, K. G., Gattis, D., Hung, G., Kordasiewicz, H. B., Paulson, H. L., & McLoughlin, H. S. (2017). Evaluation of Antisense Oligonucleotides Targeting ATXN3 in SCA3 Mouse Models. *Mol Ther Nucleic Acids*, 7, 200-210. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.04.005>
- Nagesh Babu, G., Gupta, M., Paliwal, V. K., Singh, S., Chatterji, T., & Roy, R. (2018). Serum metabolomics study in a group of Parkinson's disease patients from northern India. *Clin Chim Acta*, 480, 214-219. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.02.022>
- Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D. F., & Youle, R. J. (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol*, 183(5), 795-803. <https://doi.org/10.1083/jcb.200809125>
- 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(Pt 5), 1400-1415. <https://doi.org/10.1093/brain/awr047>
- Nicastro, G., Menon, R. P., Masino, L., Knowles, P. P., McDonald, N. Q., & Pastore, A. (2005). The solution structure of the Josephin domain of ataxin-3: structural determinants for molecular recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(30), 10493-10498. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501732102>
- 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(3), 221-226. <https://doi.org/10.1038/ng0793-221>
- 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. *American Journal of Medical Genetics Part B-Neuropsychiatric Genetics*, 133b(1), 124-126. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.30088>

- Palacino, J. J., Sagi, D., Goldberg, M. S., Krauss, S., Motz, C., Wacker, M., Klose, J., & Shen, J. (2004). Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *J Biol Chem*, 279(18), 18614-18622. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401135200>
- Papes, F., Surpili, M. J., Langone, F., Trigo, J. R., & Arruda, P. (2001). The essential amino acid lysine acts as precursor of glutamate in the mammalian central nervous system. *FEBS Lett*, 488(1-2), 34-38. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)02401-7](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)02401-7)
- Park, H., Kim, H. J., & Jeon, B. S. (2015). Parkinsonism in spinocerebellar ataxia. *Biomed Res Int*, 2015, 125273. <https://doi.org/10.1155/2015/125273>
- Pathan, M., Wu, J., Lakso, H. A., Forsgren, L., & Ohman, A. (2021). Plasma Metabolite Markers of Parkinson's Disease and Atypical Parkinsonism. *Metabolites*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/metabo11120860>
- Paulson, H., & Ammache, Z. (2001). Ataxia and hereditary disorders. *Neurol Clin*, 19(3), 759-782, viii. [https://doi.org/10.1016/s0733-8619\(05\)70044-x](https://doi.org/10.1016/s0733-8619(05)70044-x)
- Paulson, H., & Shakkottai, V. (1993). Spinocerebellar Ataxia Type 3. In M. P. Adam, G. M. Mirzaa, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. H. Bean, K. W. Gripp, & A. Amemiya (Eds.), *GeneReviews((R))*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301375>
- Paulson, H. L. (2007). Dominantly inherited ataxias: lessons learned from Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3. *Semin Neurol*, 27(2), 133-142. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971172>
- Paulson, H. L., Das, S. S., Crino, P. B., Perez, M. K., Patel, S. C., Gotsdiner, D., Fischbeck, K. H., & Pittman, R. N. (1997). Machado-Joseph disease gene product is a cytoplasmic protein widely expressed in brain. *Annals of Neurology*, 41(4), 453-462. <https://doi.org/10.1002/ana.410410408>
- 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(2), 333-344. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80943-5](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80943-5)
- Paulson, H. L., Shakkottai, V. G., Clark, H. B., & Orr, H. T. (2017). Polyglutamine spinocerebellar ataxias - from genes to potential treatments. *Nat Rev Neurosci*, 18(10), 613-626. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.92>
- Peng, H., Wang, C., Chen, Z., Sun, Z., Jiao, B., Li, K., Huang, F., Hou, X., Wang, J., Shen, L., Xia, K., Tang, B., & Jiang, H. (2014). APOE epsilon2 allele may decrease the age at onset in patients with spinocerebellar ataxia type 3 or Machado-Joseph disease from the Chinese Han population. *Neurobiol Aging*, 35(9), 2179 e2115-2178. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.020>
- Petrucelli, L., O'Farrell, C., Lockhart, P. J., Baptista, M., Kehoe, K., Vink, L., Choi, P., Wolozin, B., Farrer, M., Hardy, J., & Cookson, M. R. (2002). Parkin protects against the toxicity associated with mutant alpha-synuclein: proteasome dysfunction selectively affects catecholaminergic neurons. *Neuron*, 36(6), 1007-1019. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)01125-X](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)01125-X)
- Phan, J., Hickey, M. A., Zhang, P., Chesselet, M. F., & Reue, K. (2009). Adipose tissue dysfunction tracks disease progression in two Huntington's disease

- mouse models. *Human Molecular Genetics*, 18(6), 1006-1016. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn428>
- Pirkevi, C., Lesage, S., Brice, A., & Basak, A. N. (2009). From genes to proteins in mendelian Parkinson's disease: an overview. *Anat Rec (Hoboken)*, 292(12), 1893-1901. <https://doi.org/10.1002/ar.20968>
- Ramani, B., Panwar, B., Moore, L. R., Wang, B., Huang, R., Guan, Y., & Paulson, H. L. (2017). Comparison of spinocerebellar ataxia type 3 mouse models identifies early gain-of-function, cell-autonomous transcriptional changes in oligodendrocytes. *Human Molecular Genetics*, 26(17), 3362-3374. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx224>
- Raposo, M., Bettencourt, C., Ramos, A., Kazachkova, N., Vasconcelos, J., Kay, T., Bruges-Armas, J., & Lima, M. (2017). Promoter Variation and Expression Levels of Inflammatory Genes IL1A, IL1B, IL6 and TNF in Blood of Spinocerebellar Ataxia Type 3 (SCA3) Patients. *Neuromolecular Med*, 19(1), 41-45. <https://doi.org/10.1007/s12017-016-8416-8>
- Raposo, M., Hubener-Schmid, J., Ferreira, A. F., Vieira Melo, A. R., Vasconcelos, J., Pires, P., Kay, T., Garcia-Moreno, H., Giunti, P., Santana, M. M., Pereira de Almeida, L., Infante, J., van de Warrenburg, B. P., de Vries, J. J., Faber, J., Klockgether, T., Casadei, N., Admard, J., Schols, L., . . . Lima, M. (2023). Blood transcriptome sequencing identifies biomarkers able to track disease stages in spinocerebellar ataxia type 3. *Brain*. <https://doi.org/10.1093/brain/awad128>
- Reina, C. P., Zhong, X., & Pittman, R. N. (2010). Proteotoxic stress increases nuclear localization of ataxin-3. *Human Molecular Genetics*, 19(2), 235-249. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp482>
- Rial, D., Castro, A. A., Machado, N., Garcao, P., Goncalves, F. Q., Silva, H. B., Tome, A. R., Kofalvi, A., Corti, O., Raisman-Vozari, R., Cunha, R. A., & Prediger, R. D. (2014). Behavioral phenotyping of Parkin-deficient mice: looking for early preclinical features of Parkinson's disease. *Plos One*, 9(12), e114216. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114216>
- 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(5), 405-424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
- Riess, O., Rub, U., Pastore, A., Bauer, P., & Schols, L. (2008). SCA3: neurological features, pathogenesis and animal models. *Cerebellum*, 7(2), 125-137. <https://doi.org/10.1007/s12311-008-0013-4>
- Rodrigues, A. J., Coppola, G., Santos, C., Costa Mdo, C., Ailion, M., Sequeiros, J., Geschwind, D. H., & Maciel, P. (2007). Functional genomics and biochemical characterization of the C. elegans orthologue of the Machado-Joseph disease protein ataxin-3. *FASEB J*, 21(4), 1126-1136. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7002com>
- Rogers, D. C., Fisher, E. M., Brown, S. D., Peters, J., Hunter, A. J., & Martin, J. E. (1997). Behavioral and functional analysis of mouse phenotype:

- SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *Mamm Genome*, 8(10), 711-713. <https://doi.org/10.1007/s003359900551>
- 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(10), 985-991. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00201-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00201-X)
- Rosen, K. M., Moussa, C. E., Lee, H. K., Kumar, P., Kitada, T., Qin, G., Fu, Q., & Querfurth, H. W. (2010). Parkin reverses intracellular beta-amyloid accumulation and its negative effects on proteasome function. *J Neurosci Res*, 88(1), 167-178. <https://doi.org/10.1002/jnr.22178>
- Rosenberg, R. N. (1992). Machado-Joseph disease: an autosomal dominant motor system degeneration. *Mov Disord*, 7(3), 193-203. <https://doi.org/10.1002/mds.870070302>
- Ross, C. A., & Poirier, M. A. (2004). Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med*, 10 Suppl, S10-17. <https://doi.org/10.1038/nm1066>
- Rothfuss, O., Fischer, H., Hasegawa, T., Maisel, M., Leitner, P., Miesel, F., Sharma, M., Bornemann, A., Berg, D., Gasser, T., & Patenge, N. (2009). Parkin protects mitochondrial genome integrity and supports mitochondrial DNA repair. *Human Molecular Genetics*, 18(20), 3832-3850. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp327>
- Roy, R. D., Rosenmund, C., & Stefan, M. I. (2017). Cooperative binding mitigates the high-dose hook effect. *BMC Syst Biol*, 11(1), 74. <https://doi.org/10.1186/s12918-017-0447-8>
- 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(3), 174-183. <https://doi.org/10.1159/000358801>
- Rub, U., Brunt, E. R., Gierga, K., Schultz, C., Paulson, H., de Vos, R. A., & Braak, H. (2003). The nucleus raphe interpositus in spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease). *J Chem Neuroanat*, 25(2), 115-127. [https://doi.org/10.1016/s0891-0618\(02\)00099-6](https://doi.org/10.1016/s0891-0618(02)00099-6)
- Rub, U., de Vos, R. A., Brunt, E. R., Schultz, C., Paulson, H., Del Tredici, K., & Braak, H. (2002). Degeneration of the external cuneate nucleus in spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease). *Brain Res*, 953(1-2), 126-134. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(02\)03278-x](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(02)03278-x)
- Rub, U., de Vos, R. A., Schultz, C., Brunt, E. R., Paulson, H., & Braak, H. (2002). Spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease): severe destruction of the lateral reticular nucleus. *Brain*, 125(Pt 9), 2115-2124. <https://doi.org/10.1093/brain/awf208>
- Rubinsztein, D. C. (2002). Lessons from animal models of Huntington's disease. *Trends Genet*, 18(4), 202-209. [https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(01\)02625-7](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(01)02625-7)
- 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., . . . 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. *American Journal of Human Genetics*, 59(1), 16-22. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8659522>
- Sanberg, P. R., Fibiger, H. C., & Mark, R. F. (1981). Body weight and dietary factors in Huntington's disease patients compared with matched controls. *Med J Aust*, 1(8), 407-409. <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.1981.tb135681.x>
- Santana, M. M., Gaspar, L. S., Pinto, M. M., Silva, P., Adao, D., Pereira, D., Ribeiro, J. A., Cunha, I., Huebener-Schmid, J., Raposo, M., Ferreira, A. F., Faber, J., Kuhs, S., Garcia-Moreno, H., Reetz, K., Thieme, A., Infante, J., van de Warrenburg, B. P. C., Giunti, P., . . . European Spinocerebellar Ataxia Type 3/Machado-Joseph Disease Initiative Study, G. (2023). A standardised protocol for blood and cerebrospinal fluid collection and processing for biomarker research in ataxia. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 49(2), e12892. <https://doi.org/10.1111/nan.12892>
- Satoh, J., & Kuroda, Y. (1999). Association of codon 167 Ser/Asn heterozygosity in the parkin gene with sporadic Parkinson's disease. *Neuroreport*, 10(13), 2735-2739. <https://doi.org/10.1097/00001756-199909090-00008>
- Saute, J. A., da Silva, A. C., Muller, A. P., Hansel, G., de Mello, A. S., Maeda, F., Vedolin, L., Saraiva-Pereira, M. L., Souza, D. O., Arpa, J., Torres-Aleman, I., Portela, L. V., & Jardim, L. B. (2011). Serum insulin-like system alterations in patients with spinocerebellar ataxia type 3. *Mov Disord*, 26(4), 731-735. <https://doi.org/10.1002/mds.23428>
- Saute, J. A., Donis, K. C., Serrano-Munuera, C., Genis, D., Ramirez, L. T., Mazzetti, P., Perez, L. V., Latorre, P., Sequeiros, J., Matilla-Duenas, A., Jardim, L. B., & Iberoamerican Multidisciplinary Network for the Study of Movement Disorders Study, G. (2012). Ataxia rating scales--psychometric profiles, natural history and their application in clinical trials. *Cerebellum*, 11(2), 488-504. <https://doi.org/10.1007/s12311-011-0316-8>
- Saute, J. A., Silva, A. C., Souza, G. N., Russo, A. D., Donis, K. C., Vedolin, L., Saraiva-Pereira, M. L., Portela, L. V., & Jardim, L. B. (2012). Body mass index is inversely correlated with the expanded CAG repeat length in SCA3/MJD patients. *Cerebellum*, 11(3), 771-774. <https://doi.org/10.1007/s12311-011-0326-6>
- Scaglione, K. M., Zavodszky, E., Todi, S. V., Patury, S., Xu, P., Rodriguez-Lebron, E., Fischer, S., Konen, J., Djarmati, A., Peng, J., Gestwicki, J. E., & Paulson, H. L. (2011). Ube2w and ataxin-3 coordinately regulate the ubiquitin ligase CHIP. *Mol Cell*, 43(4), 599-612. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.05.036>
- Scheel, H., Tomiuk, S., & Hofmann, K. (2003). Elucidation of ataxin-3 and ataxin-7 function by integrative bioinformatics. *Human Molecular Genetics*, 12(21), 2845-2852. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddg297>
- Schmidt, J., Schmidt, T., Golla, M., Lehmann, L., Weber, J. J., Huebener-Schmid, J., & Riess, O. (2016). In vivo assessment of riluzole as a potential therapeutic drug for spinocerebellar ataxia type 3. *J Neurochem*, 138(1), 150-162. <https://doi.org/10.1111/jnc.13606>

- Schmidt, M. H. M., & Pearson, C. E. (2016). Disease-associated repeat instability and mismatch repair. *DNA Repair (Amst)*, 38, 117-126. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.11.008>
- Schmitt, I., Brattig, T., Gossen, M., & Riess, O. (1997). Characterization of the rat spinocerebellar ataxia type 3 gene. *Neurogenetics*, 1(2), 103-112. <https://doi.org/10.1007/s100480050015>
- Schmitt, I., Linden, M., Khazneh, H., Evert, B. O., Breuer, P., Klockgether, T., & Wuellner, U. (2007). Inactivation of the mouse *Atxn3* (ataxin-3) gene increases protein ubiquitination. *Biochem Biophys Res Commun*, 362(3), 734-739. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.08.062>
- Schmitz-Hubsch, T., Coudert, M., Bauer, P., Giunti, P., Globas, C., Baliko, L., Filla, A., Mariotti, C., Rakowicz, M., Charles, P., Ribai, P., Szymanski, S., Infante, J., van de Warrenburg, B. P., Durr, A., Timmann, D., Boesch, S., Fancellu, R., Rola, R., . . . Klockgether, T. (2008). Spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6: disease severity and nonataxia symptoms. *Neurology*, 71(13), 982-989. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000325057.33666.72>
- Schmitz-Hubsch, T., Coudert, M., Tezenas du Montcel, S., Giunti, P., Labrum, R., Durr, A., Ribai, P., Charles, P., Linnemann, C., Schols, L., Rakowicz, M., Rola, R., Zdzienicka, E., Fancellu, R., Mariotti, C., Baliko, L., Melegh, B., Filla, A., Salvatore, E., . . . Klockgether, T. (2011). Depression comorbidity in spinocerebellar ataxia. *Mov Disord*, 26(5), 870-876. <https://doi.org/10.1002/mds.23698>
- Schols, L., Amoiridis, G., Epplen, J. T., Langkafel, M., Przuntek, H., & Riess, O. (1996). Relations between genotype and phenotype in German patients with the Machado-Joseph disease mutation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 61(5), 466-470. <https://doi.org/10.1136/jnnp.61.5.466>
- Schols, L., Bauer, P., Schmidt, T., Schulte, T., & Riess, O. (2004). Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurol*, 3(5), 291-304. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(04\)00737-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(04)00737-9)
- Schols, L., Haan, J., Riess, O., Amoiridis, G., & Przuntek, H. (1998). Sleep disturbance in spinocerebellar ataxias: is the SCA3 mutation a cause of restless legs syndrome? *Neurology*, 51(6), 1603-1607. <https://doi.org/10.1212/wnl.51.6.1603>
- Schols, L., Reimold, M., Seidel, K., Globas, C., Brockmann, K., Hauser, T. K., Auburger, G., Burk, K., den Dunnen, W., Reischl, G., Korf, H. W., Brunt, E. R., & Rub, U. (2015). No parkinsonism in SCA2 and SCA3 despite severe neurodegeneration of the dopaminergic substantia nigra. *Brain*, 138(Pt 11), 3316-3326. <https://doi.org/10.1093/brain/awv255>
- Serrano, A., Menendez, J., Casarejos, M. J., Solano, R. M., Gallego, E., Sanchez, M., Mena, M. A., & Garcia de Yebenes, J. (2005). Effects of cinnarizine, a calcium antagonist that produces human parkinsonism, in parkin knock out mice. *Neuropharmacology*, 49(2), 208-219. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2005.03.003>
- Shen, X. N., Wu, K. M., Huang, Y. Y., Guo, Y., Huang, S. Y., Zhang, Y. R., Chen, S. F., Wang, H. F., Zhang, W., Cheng, W., Cui, M., Dong, Q., & Yu, J. T. (2023). Systematic assessment of plasma biomarkers in spinocerebellar

- ataxia. *Neurobiology of Disease*, 181, 106112. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2023.106112>
- 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(3), 302-305. <https://doi.org/10.1038/77060>
- Silberbauer, J., Schidl, S., Diermayr, G., Schmitz-Hubsch, T., & Greisberger, A. (2023). [Scale for the assessment and rating of ataxia (SARA): translation and cultural adaptation to German-speaking areas]. *Wien Med Wochenschr.* <https://doi.org/10.1007/s10354-023-01014-8> (Scale for the assessment and rating of ataxia (SARA): Übersetzung und kulturelle Anpassung an den deutschsprachigen Raum.)
- Socal, M. P., Emmel, V. E., Rieder, C. R., Hilbig, A., Saraiva-Pereira, M. L., & Jardim, L. B. (2009). Intrafamilial variability of Parkinson phenotype in SCAs: novel cases due to SCA2 and SCA3 expansions. *Parkinsonism Relat Disord*, 15(5), 374-378. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2008.09.005>
- Soong, B. W., & Paulson, H. L. (2007). Spinocerebellar ataxias: an update. *Curr Opin Neurol*, 20(4), 438-446. <https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e3281fbd3dd>
- Staropoli, J. F., McDermott, C., Martinat, C., Schulman, B., Demireva, E., & Abeliovich, A. (2003). Parkin is a component of an SCF-like ubiquitin ligase complex and protects postmitotic neurons from kainate excitotoxicity. *Neuron*, 37(5), 735-749. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00084-9](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00084-9)
- Stevanin, G., & Brice, A. (2008). Spinocerebellar ataxia 17 (SCA17) and Huntington's disease-like 4 (HDL4). *Cerebellum*, 7(2), 170-178. <https://doi.org/10.1007/s12311-008-0016-1>
- 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(12), 4181-4194. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11122330>
- Subramony, S. H. (2007). SARA--a new clinical scale for the assessment and rating of ataxia. *Nat Clin Pract Neurol*, 3(3), 136-137. <https://doi.org/10.1038/ncpneuro0426>
- Subramony, S. H., & Currier, R. D. (1996). Intrafamilial variability in Machado-Joseph disease. *Mov Disord*, 11(6), 741-743. <https://doi.org/10.1002/mds.870110625>
- Subramony, S. H., Hernandez, D., Adam, A., Smith-Jefferson, S., Hussey, J., Gwinn-Hardy, K., Lynch, T., McDaniel, O., Hardy, J., Farrer, M., & Singleton, A. (2002). Ethnic differences in the expression of neurodegenerative disease: Machado-Joseph disease in Africans and Caucasians. *Movement Disorders*, 17(5), 1068-1071. <https://doi.org/10.1002/mds.10241>
- Sudarsky, L., & Coutinho, P. (1995). Machado-Joseph disease. *Clin Neurosci*, 3(1), 17-22. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7614089>
- Sweigart, B., Andersen, S. L., Gurinovich, A., Cosentino, S., Schupf, N., Perls, T. T., & Sebastiani, P. (2021). APOE E2/E2 Is Associated with Slower Rate

- of Cognitive Decline with Age. *J Alzheimers Dis*, 83(2), 853-860. <https://doi.org/10.3233/JAD-201205>
- Switonski, P. M., Fiszler, A., Kazmierska, K., Kurpisz, M., Krzyzosiak, W. J., & Figiel, M. (2011). Mouse ataxin-3 functional knock-out model. *Neuromolecular Med*, 13(1), 54-65. <https://doi.org/10.1007/s12017-010-8137-3>
- 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. *Human Molecular Genetics*, 4(7), 1137-1146. <https://doi.org/10.1093/hmg/4.7.1137>
- Tan, D., Wei, C., Chen, Z., Huang, Y., Deng, J., Li, J., Liu, Y., Bao, X., Xu, J., Hu, Z., Wang, S., Fan, Y., Jiang, Y., Wu, Y., Wu, Y., Wang, S., Liu, P., Zhang, Y., Yang, Z., . . . Xiong, H. (2023). CAG Repeat Expansion in THAP11 Is Associated with a Novel Spinocerebellar Ataxia. *Mov Disord*, 38(7), 1282-1293. <https://doi.org/10.1002/mds.29412>
- Tang, B., Liu, C., Shen, L., Dai, H., Pan, Q., Jing, L., Ouyang, S., & Xia, J. (2000). Frequency of SCA1, SCA2, SCA3/MJD, SCA6, SCA7, and DRPLA CAG trinucleotide repeat expansion in patients with hereditary spinocerebellar ataxia from Chinese kindreds. *Arch Neurol*, 57(4), 540-544. <https://doi.org/10.1001/archneur.57.4.540>
- Tezenas du Montcel, S., Durr, A., Rakowicz, M., Nanetti, L., Charles, P., Sulek, A., Mariotti, C., Rola, R., Schols, L., Bauer, P., Dufaure-Gare, I., Jacobi, H., Forlani, S., Schmitz-Hubsch, T., Filla, A., Timmann, D., van de Warrenburg, B. P., Marelli, C., Kang, J. S., . . . Golmard, J. L. (2014). Prediction of the age at onset in spinocerebellar ataxia type 1, 2, 3 and 6. *J Med Genet*, 51(7), 479-486. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2013-102200>
- Toczyłowska, B., Zieminska, E., Michalowska, M., Chalimoniuk, M., & Fiszler, U. (2020). Changes in the metabolic profiles of the serum and putamen in Parkinson's disease patients - In vitro and in vivo NMR spectroscopy studies. *Brain Res*, 1748, 147118. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2020.147118>
- Todi, S. V., Scaglione, K. M., Blount, J. R., Basrur, V., Conlon, K. P., Pastore, A., Elenitoba-Johnson, K., & Paulson, H. L. (2010). Activity and cellular functions of the deubiquitinating enzyme and polyglutamine disease protein ataxin-3 are regulated by ubiquitination at lysine 117. *J Biol Chem*, 285(50), 39303-39313. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.181610>
- Toonen, L. J. A., Nobre, R., Haas, E., Hubener-Schmid, J., Martier, R., Valles, A., Higgins, J. J., van Deventer, S., Nguyen, H. P., de Almeida, L. P., Konstantinova, P., & Evers, M. M. (2019). A novel AAV-based miQURE gene therapy for SCA3. *Human Gene Therapy*, 30(11), A91-A92. <Go to ISI>://WOS:000495173100259
- Toonen, L. J. A., Overzier, M., Evers, M. M., Leon, L. G., van der Zeeuw, S. A. J., Mei, H., Kielbasa, S. M., Goeman, J. J., Hettne, K. M., Magnusson, O. T., Poirel, M., Seyer, A., t Hoen, P. A. C., & van Roon-Mom, W. M. C. (2018). Transcriptional profiling and biomarker identification reveal tissue

- specific effects of expanded ataxin-3 in a spinocerebellar ataxia type 3 mouse model. *Mol Neurodegener*, 13(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s13024-018-0261-9>
- 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(24), 22044-22055. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212235200>
- Tuite, P. J., Rogaeva, E. A., St George-Hyslop, P. H., & Lang, A. E. (1995). Dopamine-responsive parkinsonism phenotype of Machado-Joseph disease: confirmation of 14q CAG expansion. *Annals of Neurology*, 38(4), 684-687. <https://doi.org/10.1002/ana.410380422>
- Turner, A. D., Locklear, C. E., Oruru, D., Briggs, A. Q., Bubu, O. M., & Seixas, A. (2022). Exploring the combined effects of sleep apnea and APOE-e4 on biomarkers of Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci*, 14, 1017521. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.1017521>
- 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. *Annals of Neurology*, 49(6), 805-807. <https://doi.org/10.1002/ana.1089>
- 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. *Annals of Neurology*, 57(4), 505-512. <https://doi.org/10.1002/ana.20424>
- van de Warrenburg, B. P., van Gaalen, J., Boesch, S., Burgunder, J. M., Durr, A., Giunti, P., Klockgether, T., Mariotti, C., Pandolfo, M., & Riess, O. (2014). EFNS/ENS Consensus on the diagnosis and management of chronic ataxias in adulthood. *Eur J Neurol*, 21(4), 552-562. <https://doi.org/10.1111/ene.12341>
- van de Warrenburg, B. P. C., Steijns, J. A. G., Munneke, M., Kremer, B. P. H., & Bloem, B. R. (2005). Falls in degenerative cerebellar ataxias. *Mov Disord*, 20(4), 497-500. <https://doi.org/10.1002/mds.20375>
- Velez, J. I., Lopera, F., Sepulveda-Falla, D., Patel, H. R., Johar, A. S., Chuah, A., Tobon, C., Rivera, D., Villegas, A., Cai, Y., Peng, K., Arkell, R., Castellanos, F. X., Andrews, S. J., Silva Lara, M. F., Creagh, P. K., Easteal, S., de Leon, J., Wong, M. L., . . . Arcos-Burgos, M. (2016). APOE\*E2 allele delays age of onset in PSEN1 E280A Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry*, 21(7), 916-924. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.177>
- Virarkar, M., Alappat, L., Bradford, P. G., & Awad, A. B. (2013). L-arginine and nitric oxide in CNS function and neurodegenerative diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 53(11), 1157-1167. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.573885>
- 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. *Human Molecular Genetics*, 9(12), 1795-1803. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.12.1795>

- Wang, Z. (2018). Experimental and Clinical Strategies for Treating Spinocerebellar Ataxia Type 3. *Neuroscience*, 371, 138-154. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.11.051>
- Weber, J. J., Haas, E., Maringer, Y., Hauser, S., Casadei, N. L. P., Chishti, A. H., Riess, O., & Hubener-Schmid, J. (2020). Calpain-1 ablation partially rescues disease-associated hallmarks in models of Machado-Joseph disease. *Human Molecular Genetics*, 29(6), 892-906. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddaa010>
- Weir, D. W., Sturrock, A., & Leavitt, B. R. (2011). Development of biomarkers for Huntington's disease. *Lancet Neurol*, 10(6), 573-590. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70070-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70070-9)
- Weishaupl, D., Schneider, J., Peixoto Pinheiro, B., Ruess, C., Dold, S. M., von Zweydford, F., Gloeckner, C. J., Schmidt, J., Riess, O., & Schmidt, T. (2019). Physiological and pathophysiological characteristics of ataxin-3 isoforms. *J Biol Chem*, 294(2), 644-661. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005801>
- Weiss, A., Trager, U., Wild, E. J., Grueninger, S., Farmer, R., Landles, C., Scahill, R. I., Lahiri, N., Haider, S., Macdonald, D., Frost, C., Bates, G. P., Bilbe, G., Kuhn, R., Andre, R., & Tabrizi, S. J. (2012). Mutant huntingtin fragmentation in immune cells tracks Huntington's disease progression. *J Clin Invest*, 122(10), 3731-3736. <https://doi.org/10.1172/JCI64565>
- Whaley, N. R., Fujioka, S., & Wszolek, Z. K. (2011). Autosomal dominant cerebellar ataxia type I: a review of the phenotypic and genotypic characteristics. *Orphanet J Rare Dis*, 6, 33. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-6-33>
- Wild, E. J., Boggio, R., Langbehn, D., Robertson, N., Haider, S., Miller, J. R., Zetterberg, H., Leavitt, B. R., Kuhn, R., Tabrizi, S. J., Macdonald, D., & Weiss, A. (2015). Quantification of mutant huntingtin protein in cerebrospinal fluid from Huntington's disease patients. *J Clin Invest*, 125(5), 1979-1986. <https://doi.org/10.1172/JCI80743>
- Wilke, C., Reich, S., van Swieten, J. C., Borroni, B., Sanchez-Valle, R., Moreno, F., Laforce, R., Graff, C., Galimberti, D., Rowe, J. B., Masellis, M., Tartaglia, M. C., Finger, E., Vandenberghe, R., de Mendonca, A., Tagliavini, F., Santana, I., Ducharme, S., Butler, C. R., . . . Synofzik, M. (2022). Stratifying the Presymptomatic Phase of Genetic Frontotemporal Dementia by Serum NfL and pNfH: A Longitudinal Multicentre Study. *Annals of Neurology*, 91(1), 33-47. <https://doi.org/10.1002/ana.26265>
- Winborn, B. J., Travis, S. M., Todi, S. V., Scaglione, K. M., Xu, P., Williams, A. J., Cohen, R. E., Peng, J., & Paulson, H. L. (2008). The deubiquitinating enzyme ataxin-3, a polyglutamine disease protein, edits Lys63 linkages in mixed linkage ubiquitin chains. *J Biol Chem*, 283(39), 26436-26443. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803692200>
- Wu, Y. L., Chang, J. C., Sun, H. L., Cheng, W. L., Yen, Y. P., Lin, Y. S., Chao, Y. C., Liu, K. H., Huang, C. S., Liu, K. L., & Liu, C. S. (2022). Coenzyme Q10 Supplementation Increases Removal of the ATXN3 Polyglutamine Repeat, Reducing Cerebellar Degeneration and Improving Motor Dysfunction in Murine Spinocerebellar Ataxia Type 3. *Nutrients*, 14(17). <https://doi.org/10.3390/nu14173593>

- Wu, Y. R., Lin, H. Y., Chen, C. M., Gwinn-Hardy, K., Ro, L. S., Wang, Y. C., Li, S. H., Hwang, J. C., Fang, K., Hsieh-Li, H. M., Li, M. L., Tung, L. C., Su, M. T., Lu, K. T., & Lee-Chen, G. J. (2004). Genetic testing in spinocerebellar ataxia in Taiwan: expansions of trinucleotide repeats in SCA8 and SCA17 are associated with typical Parkinson's disease. *Clin Genet*, 65(3), 209-214. <https://doi.org/10.1111/j.0009-9163.2004.00213.x>
- Yang, Z. H., Shi, C. H., Zhou, L. N., Li, Y. S., Yang, J., Liu, Y. T., Mao, C. Y., Luo, H. Y., Xu, G. W., & Xu, Y. M. (2019). Metabolic Profiling Reveals Biochemical Pathways and Potential Biomarkers of Spinocerebellar Ataxia 3. *Front Mol Neurosci*, 12, 159. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00159>
- 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(4), 241-244. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1999.tb07354.x>
- 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. *Human Molecular Genetics*, 9(1), 69-78. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.1.69>
- 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(3-4), 349-352. [https://doi.org/10.1016/s0361-9230\(01\)00578-0](https://doi.org/10.1016/s0361-9230(01)00578-0)
- Youssef, P., Hughes, L., Kim, W. S., Halliday, G. M., Lewis, S. J. G., Cooper, A., & Dzamko, N. (2023). Evaluation of plasma levels of NFL, GFAP, UCHL1 and tau as Parkinson's disease biomarkers using multiplexed single molecule counting. *Sci Rep*, 13(1), 5217. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-32480-0>
- 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. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00110>
- Zhang, C. W., Hang, L., Yao, T. P., & Lim, K. L. (2015). Parkin Regulation and Neurodegenerative Disorders. *Front Aging Neurosci*, 7, 248. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00248>
- Zhang, X. L., Li, X. B., Cheng, F. F., Liu, S. L., Ni, W. C., Tang, F. F., Wang, Q. G., & Wang, X. Q. (2021). Spinocerebellar ataxia type 3 with dopamine-responsive dystonia: A case report. *World J Clin Cases*, 9(28), 8552-8556. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v9.i28.8552>
- 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(1), 62-69. <https://doi.org/10.1038/ng0197-62>
- Zoghbi, H. Y., & Orr, H. T. (2000). Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annu Rev Neurosci*, 23, 217-247. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.23.1.217>

## 7 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

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

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Dr. rer. nat. Jeannette Hübener-Schmid.

Sämtliche Versuche mit menschlichem Biomaterial wurden nach Einarbeitung durch Dr. rer. nat. Jeannette Hübener-Schmid von mir selbst persönlich durchgeführt. Einige Ergebnisse, welche im Verlauf der Arbeit deutlich gekennzeichnet sind, wurden bereits in vorherigen Versuchen im Institut durchgeführt.

Durch mich wurden eigenständig aus 137 Proben Homogenate hergestellt. 75 % der Gesamt-Proteinbestimmungen der Proben aus der ESMI-Kohorte mittels Bradford wurden durch mich selbst durchgeführt. Teilweise dienten aber auch Ergebnisse von Bradford-Analysen anderer Mitarbeiter des Instituts (zu 25 %) als Grundlage. Die Bestimmung der Parkin Protein-Level wurde größtenteils durch mich durchgeführt (80 %). Einige wenige Parkin Protein-Level wurden schon in der vorherigen MD-Promotion von Dr. Patrik Pelz (20 %) durchgeführt. Darunter waren die Parkin Protein-Level Bestimmungen der Nachvisiten, die allein durch mich durchgeführt wurden. Zur Vervollständigung der Daten erfolgten alle noch nicht durch vorherige Mitarbeiter des Instituts durchgeführten *PARK2* SNP Bestimmung der SNPs Bp301, Bp1239, Bp1281 durch mich. Dabei wurden 60 DNA-Proben für den SNP Bp 601, 57 DNA-Proben des SNP Bp 1239 und 43 DNA-Proben des SNP Bp 1281 durch mich bestimmt.

Im Rahmen dieses Projekts war es mir möglich das Protokoll für die *APOE* SNP Bestimmung im Labor des Instituts für medizinische Genetik und angewandte Genomik einzuführen und zu etablieren, weitere Auswertungen konnten aufgrund zeitlicher Begrenzungen und der Schwierigkeit der Etablierung der Methode nicht durchgeführt werden.

Die Auswertung der durch die Firma *MedDay Pharmaceuticals* durchgeführten statistischen Analysen der Metabolomdaten erfolgte ausschließlich durch mich. Alle in dieser Arbeit erwähnten Versuche an Mäusen wurden bereits im Vorfeld dieser Arbeit im Labor durchgeführt und ausschließlich von mir ausgewertet. Die Entnahme der Proben der ESMI-Probanden erfolgte bereits im Vorfeld dieser Arbeit, doch die statistische Auswertung der Patientendaten erfolgte ausschließlich und eigenständig durch mich.

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

Attendorn, den

Kira Roth

[Unterschrift]

## 8 Danksagung

Ich möchte allen danken, die mich während der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben.

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Olaf Rieß, der mir diese Arbeit ermöglicht hat und mir die Gelegenheit gab, an einem so interessanten und auch internationalen Projekt mitzuwirken.

Mein Dank gilt ebenfalls dem 2. Prüfer Prof. Dr. Christoph Laske für die Übernahme der Begutachtung meiner Dissertation.

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

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

Ein riesengroßes Dankeschön geht an den Arbeitskreis Biomarker und alle anderen Labormitarbeitern und Labormitarbeiterinnen im Institut für medizinische Genetik und Angewandte Genomik, sowie Studierende, die immer ein offenes Ohr für Fragen hatten, mir bei technischen Problemen eine Hilfe waren und mir die Zeit im Labor verschönert haben.

Ein weiterer Dank geht an alle, die bereits an diesem Projekt gearbeitet haben und die Daten für eine Auswertung und meine Arbeit überhaupt erst möglich gemacht haben.

Des weiteren möchte ich in diesem Zuge dem Zahnarztteam in Lennestadt, allen Mitarbeitenden und natürlich meinen größten Vorbildern Dr. Markus Kirchhoff und Dr. Ludger Hanfland danken, die immer meine größte Inspiration, Faszination und Motivation waren. Ihr alle habt meine medizinische Laufbahn ins Rollen gebracht und mit eurer Unterstützung und Anteilnahme dafür gesorgt, dass mir niemals die Puste auf dem Weg ausging und ich immer ein Ziel vor Augen hatte, auf das ich mich freuen konnte.

Ich danke meinen wunderbaren Freunden, die immer an mich geglaubt haben und jederzeit für mich da waren. Vor allem aber Johanna, die von einer Mitbewohnerin zu einer Freundin wurde und dafür gesorgt hat, dass ich in stressigen Zeiten immer etwas zu essen bekommen habe und mich auf Zuhause freuen konnte.

Der größte Dank gilt meiner Familie, die mich durchgehend unterstützt hat und dafür gesorgt hat, dass ich das Ziel am Ende des Weges nicht aus den Augen verliere. Ohne euch und eure Unterstützung wäre das alles niemals möglich gewesen.

Ich danke meinem Partner Carl von ganzem Herzen für seine immerwährende Unterstützung, dem kein Weg zu steinig (oder zu weit) war und dessen Durchhaltevermögen und Motivation täglich dafür gesorgt hat, dass ich über mich hinauswachsen konnte und niemals den Mut in mich und meine Ziele verloren habe. Dank dir habe ich jede noch so große Herausforderung meistern können. Weiterhin danke ich besonders Dr. rer. nat. Jeannette Hübener-Schmid für all die investierten Stunden und Gedanken, die du dir gemacht hast. Deine außergewöhnliche Unterstützung, deine überragende Geduld und dein besonderes Engagement durch schnelle Korrekturen und eine umfangreiche Betreuung. Danke, dass du immer an mich und das Entstehen dieser Arbeit geglaubt hast. Aller Anfang ist schwer und durch deine durchgehenden Motivationsschübe hast du mich immer angetrieben nicht aufzugeben und den Glauben in mich selbst zu finden.

# 9 Anlagen im Anhang

Rater: _____ date: _____ patient: _____	
<b>5) Finger chase</b> Rated separately for each side Proband sits comfortably. If necessary, support of feet and trunk is allowed. Examiner sits in front of proband and performs 5 consecutive sudden and fast pointing movements in unpredictable directions in a frontal plane at about 30 % of proband's reach. Movements have an amplitude of 30 cm and a frequency of 1 movement every 2 s. Proband is asked to follow the movements with his index finger, as fast and precisely as possible. Average performance of last 3 movements is rated.	<b>6) Nose-finger test</b> Rated separately for each side Proband sits comfortably. If necessary, support of feet and trunk is allowed. Proband is asked to point repeatedly with his index finger from his nose to examiner's finger, which is in front of the proband at about 90 % of proband's reach. Movements are performed at moderate speed. Average performance of movements is rated according to the amplitude of the kinetic tremor.
<ul style="list-style-type: none"> <li>0 No dysmetria</li> <li>1 Dysmetria, under/ overshooting target &lt; 5 cm</li> <li>2 Dysmetria, under/ overshooting target &gt; 5 cm</li> <li>3 Dysmetria, under/ overshooting target &gt; 15 cm</li> <li>4 Unable to perform 5 pointing movements</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>0 No tremor</li> <li>1 Tremor with an amplitude &lt; 2 cm</li> <li>2 Tremor with an amplitude &lt; 5 cm</li> <li>3 Tremor with an amplitude &gt; 5 cm</li> <li>4 Unable to perform 5 pointing movements</li> </ul>
<b>Score</b>	<b>Score</b>
mean of both sides (R+L)/2	mean of both sides (R+L)/2
<b>7) Fast alternating hand movements</b> Rated separately for each side Proband sits comfortably. If necessary, support of feet and trunk is allowed. Proband is asked to perform 10 cycles of repetitive alternation of pro- and supinations of the hand on his/her thigh as fast and as precise as possible. Movement is demonstrated by examiner at a speed of approx. 10 cycles within 7 s. Exact times for movement execution have to be taken.	<b>8) Heel-shin slide</b> Rated separately for each side Proband lies on examination bed, without sight of his legs. Proband is asked to lift one leg, point with the heel to the opposite knee, slide down along the shin to the ankle, and lay the leg back on the examination bed. The task is performed 3 times. Slide-down movements should be performed within 1 s. If proband slides down without contact to shin in all three trials, rate 4.
<ul style="list-style-type: none"> <li>0 Normal, no irregularities (performs &lt; 10s)</li> <li>1 Slightly irregular (performs &lt; 10s)</li> <li>2 Clearly irregular, single movements difficult to distinguish or relevant interruptions, but performs &lt; 10s</li> <li>3 Very irregular, single movements difficult to distinguish or relevant interruptions, performs &gt; 10s</li> <li>4 Unable to complete 10 cycles</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>0 Normal</li> <li>1 Slightly abnormal, contact to shin maintained</li> <li>2 Clearly abnormal, goes off shin up to 3 times during 3 cycles</li> <li>3 Severely abnormal, goes off shin 4 or more times during 3 cycles</li> <li>4 Unable to perform the task</li> </ul>
<b>Score</b>	<b>Score</b>
mean of both sides (R+L)/2	mean of both sides (R+L) / 2

Rater: _____ date: _____ patient: _____	
<b>Scale for the assessment and rating of ataxia (SARA)</b>	
<b>1) Gait</b> Proband is asked (1) to walk at a safe distance parallel to a wall including a half-turn (turn around to face the opposite direction of gait) and (2) to walk in tandem (heels to toes) without support.	<b>2) Stance</b> Proband is asked to stand (1) in natural position, (2) with feet together in parallel (big toes touching each other) and (3) in tandem (both feet on one line, no space between heel and toe). Proband does not wear shoes, eyes are open. For each condition, three trials are allowed. Best trial is rated.
<ul style="list-style-type: none"> <li>0 Normal, no difficulties in walking, turning and walking tandem (up to one misstep allowed)</li> <li>1 Slight difficulties, only visible when walking 10 consecutive steps in tandem</li> <li>2 Clearly abnormal, tandem walking &gt; 10 steps not possible</li> <li>3 Considerable staggering, difficulties in half-turn, but without support</li> <li>4 Marked staggering, intermittent support of the wall required</li> <li>5 Severe staggering, permanent support of one stick or light support by one arm required</li> <li>6 Walking &gt; 10 m only with strong support (two special sticks or stroller or accompanying person)</li> <li>7 Walking &lt; 10 m only with strong support (two special sticks or stroller or accompanying person)</li> <li>8 Unable to walk, even supported</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>0 Normal, able to stand in tandem for &gt; 10 s</li> <li>1 Able to stand with feet together without sway, but not in tandem for &gt; 10s</li> <li>2 Able to stand with feet together for &gt; 10 s, but only with sway</li> <li>3 Able to stand for &gt; 10s without support in natural position, but not with feet together</li> <li>4 Able to stand for &gt; 10 s in natural position only with intermittent support</li> <li>5 Able to stand &gt; 10 s in natural position only with constant support of one arm</li> <li>6 Unable to stand for &gt; 10 s even with constant support of one arm</li> </ul>
<b>Score</b>	<b>Score</b>
<b>3) Sitting</b> Proband is asked to sit on an examination bed without support of feet, eyes open and arms outstretched to the front.	<b>4) Speech disturbance</b> Speech is assessed during normal conversation.
<ul style="list-style-type: none"> <li>0 Normal, no difficulties sitting &gt; 10 sec</li> <li>1 Slight difficulties, intermittent sway</li> <li>2 Constant sway, but able to sit &gt; 10 s without support</li> <li>3 Able to sit for &gt; 10 s only with intermittent support</li> <li>4 Unable to sit for &gt; 10 s without continuous support</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>0 Normal</li> <li>1 Suggestion of speech disturbance</li> <li>2 Impaired speech, but easy to understand</li> <li>3 Occasional words difficult to understand</li> <li>4 Many words difficult to understand</li> <li>5 Only single words understandable</li> <li>6 Speech unintelligible / anarthria</li> </ul>
<b>Score</b>	<b>Score</b>

Anhang 1: Scale of the assessment and rating of ataxia (SARA)

Rate: \_\_\_\_\_ date: \_\_\_\_\_ Patient code: \_\_\_\_\_

### Inventory of Non-Ataxia Signs (INAS)

NA: not assessed / no information available Mod: moderate

#### Part one: clinical findings

Please report the (undoubtedly) occurrence of signs also if abnormal findings occur only on one side

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

### Sensory symptoms

14. Impaired vibration sense (tested at malleolus ext)

Right foot  None (8/8)  Mild (<5/8)  Mod (2-5/8)  Severe NA

Left foot  None (8/8)  Mild (<5/8)  Mod (2-5/8)  Severe NA

### Ophthalmological findings

#### Testing of fixation and smooth pursuit

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

#### Testing of fast saccades

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

#### Testing of visual function

25. Impaired visual acuity (loss of visual acuity <0.6 for binocular sight in distance testing)	<input type="radio"/> No	<input type="radio"/> Yes	<input type="radio"/> NA
---	--------------------------	---------------------------	--------------------------

### Part Two: reported abnormalities

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

Anhang 2: Inventory of Non-Ataxia Signs (INAS)

Anhang 3: Zusammenfassung aller assoziierten metabolischen Pathways im Plasma

Plasma	Anzahl	In %
<i>Associated Metabolic Pathways</i>	Gesamt 365 = 100%	
<i>Xenobiotics</i>	7	1,97
<i>Methionine Metabolism</i>	2	0,56
<i>Arginine and Proline Metabolism</i>	11	3,09
<i>Fatty Acid Biosynthesis   Unassigned   Unassigned   Unassigned</i>	8	2,25
<i>Amino Sugar Metabolism</i>	8	2,25
<i>Taurine and Hypotaurine Metabolism</i>	2	0,56
<i>Aspartate Metabolism   Dipeptide</i>	23	6,46
<i>Glutathione Metabolism</i>	7	1,97
<i>Selenoamino Acid Metabolism</i>	7	1,97
<i>Beta-Alanine Metabolism</i>	13	3,65
<i>Alanine Metabolism   Bile Acid Biosynthesis</i>	10	2,81
<i>Unassigned</i>	77	21,63
<i>Valine, Leucine and Isoleucine Metabolism</i>	9	2,53
<i>Amino sugar and nucleotide sugar metabolism</i>	2	0,56
<i>C5-Branched dibasic acid metabolism   Unassigned   Valine, Leucine and Isoleucine Metabolism</i>	2	0,56
<i>Pentose Phosphate Pathway</i>	5	1,40
<i>Inositol Metabolism</i>	5	1,40
<i>Citrate cycle (TCA cycle)   Unassigned</i>	6	1,69
<i>Ascorbate and Aldarate Metabolism</i>	6	1,69
<i>Glutamate Metabolism</i>	9	2,53
<i>Glycerol Phosphate Shuttle</i>	2	0,56
<i>Nicotinate and Nicotinamide Metabolism</i>	9	2,53
<i>Cysteine Metabolism</i>	4	1,12
<i>Inositol Metabolism   Unassigned   Unassigned</i>	3	0,84
<i>Fructose and Mannose Degradation</i>	4	1,12
<i>Sphingolipid Metabolism</i>	2	0,56
<i>Lactose Synthesis</i>	2	0,56
<i>Lysine Metabolism</i>	13	3,65
<i>Dipeptide</i>	4	1,12
<i>Phenylalanine and Tyrosine Metabolism</i>	13	3,65
<i>Pyrimidine Metabolism</i>	14	3,93
<i>Steroidogenesis</i>	3	0,84
<i>Purine Metabolism</i>	17	4,78
<i>Glycine, serine and threonine metabolism</i>	7	1,97
<i>Betaine Metabolism</i>	8	2,25
<i>Tryptophan Metabolism</i>	10	2,81
<i>Histidine Metabolism</i>	14	3,93

<i>Caffeine Metabolism   Unassigned</i>	1	0,28
<i>Pantothenate and CoA Biosynthesis</i>	1	0,28
<i>Spermidine and Spermine Biosynthesis</i>	1	0,28
<i>Oxidation of Branched Chain Fatty Acids</i>	1	0,28
<i>Ammonia Recycling</i>	3	0,84
<i>Retinol Metabolism</i>	1	0,28
<b>Total</b>	<b>365</b>	<b>100</b>

Anhang 4: Zusammenfassung aller signifikanten Pathways im Plasma

Plasma	Anzahl insgesamt	davon signifikant (p≤0,05)	Nah an Signifikanz (p≤0,08)	nicht signifikant (p>0,08)
<i>Xenobiotics</i>	7	1	0	6
<i>Arginine and Proline Metabolism</i>	11	1	1	9
<i>Fatty Acid Biosynthesis   Unassigned   Unassigned   Unassigned</i>	8	1	0	7
<i>Amino Sugar Metabolism</i>	8	1	0	7
<i>Taurine and Hypotaurine Metabolism</i>	2	1	0	1
<i>Aspartate Metabolism   Dipeptide</i>	23	8	0	15
<i>Glutathione Metabolism</i>	7	0	1	6
<i>Selenoamino Acid Metabolism</i>	7	1	0	6
<i>Beta-Alanine Metabolism</i>	13	3	0	10
<i>Alanine Metabolism   Bile Acid Biosynthesis</i>	10	4	0	6
<i>Unassigned</i>	77	5	3	69
<i>Valine, Leucine and Isoleucine Metabolism 4x</i>	9	1	0	8
<i>Pentose Phosphate Pathway</i>	5	1	0	4
<i>Glutamate Metabolism</i>	9	0	1	8
<i>Nicotinate and Nicotinamide Metabolism</i>	9	0	1	8
<i>Cysteine Metabolism</i>	4	1	0	3
<i>Inositol Metabolism   Unassigned   Unassigned</i>	3	1	0	2
<i>Sphingolipid Metabolism</i>	2	1	0	1
<i>Lactose Synthesis</i>	2	2	0	0
<i>Lysine Metabolism</i>	13	3	0	10
<i>Phenylalanine and Tyrosine Metabolism</i>	13	4	0	9
<i>Pyrimidine Metabolism</i>	14	3	2	9
<i>Betaine Metabolism</i>	8	1	0	7
<i>Histidine Metabolism</i>	14	2	0	12
<i>Pantothenate and CoA Biosynthesis</i>	1	1	0	0

<i>Spermidine and Spermine Biosynthesis</i>	1	1	0	0
<i>Ammonia Recycling</i>	3	3	0	0
Total	283	51	9	223
Total (%)	100	18,02	3,18	78,80

Anhang 5: Zusammenfassung aller assoziierten metabolischen Pathways im Cerebellum (NA= nicht analysiert)

Cerebellum		
<i>Associated Metabolic Pathways</i>	338 gesamt als 100%	
<i>Xenobiotics</i>	11	3,25
<i>Aspartate Metabolism   Dipeptide</i>	4	1,18
NA	39	11,54
<i>Glycerol Phosphate Shuttle</i>	4	1,18
<i>Pentose Phosphate Pathway</i>	7	2,07
<i>Glycogen Metabolism   Starch and Sucrose Metabolism</i>	1	0,30
<i>Amino Sugar Metabolism</i>	15	4,44
<i>Glutamate Metabolism</i>	16	4,73
<i>Arginine and Proline Metabolism   Arginine and Proline Metabolism   Arginine and Proline Metabolism</i>	2	0,59
<i>Aspartate Metabolism</i>	22	6,51
<i>Alanine Metabolism</i>	17	5,03
<i>Citrate cycle (TCA cycle)   Fatty Acid Biosynthesis</i>	11	3,25
<i>Glutathione Metabolism</i>	2	0,59
<i>Glycine and Serine Metabolism</i>	2	0,59
<i>Ascorbate and Aldarate Metabolism</i>	5	1,48
<i>Nucleotide Sugars Metabolism</i>	6	1,78
<i>C5-Branched dibasic acid metabolism   NA   NA   Valine, Leucine and Isoleucine Metabolism</i>	2	0,59
<i>Vitamin B6 Metabolism</i>	2	0,59
<i>Citrate cycle (TCA cycle)   NA   NA   Vitamin K Metabolism</i>	8	2,37
<i>Fatty Acid Biosynthesis</i>	5	1,48
<i>Cysteine Metabolism</i>	4	1,18
<i>Fructose and Mannose Degradation</i>	12	3,55
<i>Homocysteine Degradation</i>	2	0,59
<i>Sphingolipid Metabolism</i>	2	0,59
<i>Phospholipid Biosynthesis</i>	2	0,59
<i>Inositol Metabolism</i>	3	0,89
<i>Galactose Metabolism   Glycogen Metabolism   Lactose Synthesis   Trehalose Degradation</i>	4	1,18
<i>Dipeptide</i>	6	1,78
<i>Arginine and Proline Metabolism</i>	12	3,55
<i>Spermidine and Spermine Biosynthesis</i>	4	1,18
<i>Nicotinate and Nicotinamide Metabolism</i>	7	2,07

<i>Phenylalanine and Tyrosine Metabolism</i>	8	2,37
<i>Pantothenate and CoA Biosynthesis</i>	2	0,59
<i>Pyrimidine Metabolism</i>	12	3,55
<i>Tryptophan Metabolism</i>	6	1,78
<i>Purine Metabolism 2x</i>	29	8,58
<i>Steroid Biosynthesis</i>	1	0,30
<i>Valine, Leucine and Isoleucine Metabolism</i>	10	2,96
<i>Betaine Metabolism</i>	5	1,48
<i>Histidine Metabolism</i>	8	2,37
<i>Glycine, serine and threonine metabolism</i>	5	1,48
<i>Carnitine Synthesis</i>	2	0,59
<i>Methionine Metabolism</i>	3	0,89
<i>Ammonia Recycling</i>	4	1,18
<i>Bile Acid Biosynthesis</i>	2	0,59
<i>Taurine and Hypotaurine Metabolism</i>	2	0,59
Total	338	100

Anhang 6: Zusammenfassung aller signifikanten Pathways im Cerebellum (NA=nicht analysiert)

Cerebellum	Anzahl insgesamt	davon signifikant (p≤0,05)	Nah an Signifikanz (p≤0,08)	nicht signifikant (p>0,08)
NA	39	1	0	38
<i>Glycerol Phosphate Shuttle</i>	4	1	0	3
<i>Amino Sugar Metabolism</i>	15	2	0	13
<i>Purine Metabolism</i>	29	2	1	26
<i>Valine, Leucine and Isoleucine Metabolism</i>	10	1	0	9
<i>Methionine Metabolism</i>	3	1	0	2
Total	100	8	1	91

Anhang 7: Zusammenfassung der im Diagramm dargestellten Signifikanzen

Diagramm	Plasma		Diagramm	Cerebellum	
Metabolite Gesamt	365	100%	Metabolite Gesamt	338	100%
Signifikant	51	13,97	Signifikant	8	2,37
Nah an Signifikanz (p≤0,08)	9	2,47	Nah an Signifikanz (p≤0,08)	1	0,30
Nicht signifikant	305	83,56	Nicht signifikant	329	97,33
Diagramm			Diagramm		
Pathways Gesamt	43	100%	Pathways Gesamt	45	100%
Signifikant	27	62,79	Signifikant	6	13,33
Nah an Signifikanz (p≤0,08)	3	6,98	Nah an Signifikanz (p≤0,08)	0	0

Nicht signifikant	13	30,23	Nicht signifikant	39	86,67
Diagramm			Diagramm		
Metabolite	283	100%	Metabolite	100	100%
Signifikant	51	18,02	Signifikant	8	8
Nah an Signifikanz (p≤0,08)	9	3,18	Nah an Signifikanz (p≤0,08)	1	1
Nicht signifikant	223	78,80	Nicht signifikant	91	91

Anhang 8: Metabolite des Plasmas mit Pathways, FoldChanges (FC) und Signifikanzen für den Vergleich der WT jeweils mit den Mutanten SCA3 YAC, PARK2 ko und dm-YAC/PARK. Die grau hinterlegten Zahlen markieren die Signifikanzen (NA=nicht analysiert)

Metabolit	Pathway	WT vs. SCA3 YAC				WT vs. PARK2 ko				WT vs. dm-YAC/PARK			
		FC 2 Monate	FC 12 Monate	p= 2 Monate	p= 12 Monate	FC 2 Monate	FC 12 Monate	p= 2 Monate	p= 12 Monate	FC 2 Monate	FC 12 Monate	p= 2 Monate	p= 12 Monate
3-Hydroxypicolinic-acid	NA	0,46	1,75	0,0203	0,515	0,59	1,17	0,0984	0,9998	0,67	1,56	0,4075	0,8862
Creatinine	Arginine and Proline Metabolism	0,92	0,68	0,9821	0,0362	1,12	0,83	0,7403	0,9916	0,99	0,82	0,9996	0,3185
3-Hydroxybutyric-acid	Valine, Leucine and Isoleucine Metabolism	2,03	0,73	0,0325	0,6511	1,65	0,60	0,1581	0,2272	2,13	0,96	0,0504	0,9860
Thymidine	Pyrimidine Metabolism	1,35	0,86	0,8536	0,6314	2,38	0,68	0,0378	0,2100	1,55	0,74	0,4075	0,2893
5-AMP   dGMP	Alanine Metabolism   Purine Metabolism	1,41	0,49	0,8991	0,3556	2,84	0,93	0,0203	0,9385	2,30	0,91	0,2407	0,9703
L-Citrulline	Aspartate Metabolism	1,23	1,37	0,9886	0,6281	1,16	1,46	0,9186	0,4957	1,50	1,80	0,1411	0,0234
L-Aspartic-acid	Aspartate Metabolism	0,94	1,30	0,9933	0,5084	1,06	1,27	0,9933	0,5746	1,58	1,37	0,0378	0,3185
D-Glucuronic-acid   D-Galacturonic-acid   Unassigned	Inositol Metabolism   Unassigned	1,37	1,65	0,4075	0,0666	1,11	1,56	0,9633	0,1375	1,48	1,85	0,0279	0,0209

<i>Galacturonic-acid</i>	<i>Unassigned</i>												
<i>5-AMP   dGMP</i>	<i>Alanine Metabolism   Purine Metabolism</i>	1,53	0,65	0,9186	0,6528	2,21	1,11	0,1964	0,9999	2,86	1,25	0,0061	0,9993
<i>UMP</i>	<i>Lactose Synthesis</i>	1,32	0,77	0,8991	0,9019	1,71	0,87	0,1255	0,9984	1,98	0,98	0,0073	0,9999
<i>Malonic-acid</i>	<i>Fatty Acid Biosynthesis</i>	4,06	10,50	0,2178	0,5915	2,27	2,58	0,4395	0,4699	11,22	7,16	0,0203	0,0497
<i>Argininosuccinic-acid</i>	<i>Aspartate Metabolism</i>	1,36	0,77	0,5739	0,4373	1,60	0,77	0,3181	0,5746	2,05	1,24	0,0203	0,9770
<i>Lysine</i>	<i>Lysine Metabolism</i>	1,62	1,68	0,9985	0,4855	1,27	1,63	0,8774	0,5746	2,19	1,96	0,0437	0,1338
<i>L-Cysteine-S-sulfate</i>	<i>Cysteine Metabolism</i>	1,98	0,72	0,0665	0,8789	1,17	1,68	0,9821	0,8417	1,90	2,12	0,0239	0,6353
<i>Lysine</i>	<i>Lysine Metabolism</i>	1,35	1,40	0,9965	0,6380	1,18	1,39	0,8278	0,7048	1,78	1,49	0,0378	0,2064
<i>Cinnamic-acid</i>	NA	1,26	0,99	0,7403	1,0000	1,34	0,77	0,6421	0,5482	2,48	1,37	0,0124	0,9398
<i>Nicotinamide</i>	<i>Nicotinate and Nicotinamide Metabolism</i>	0,94	0,82	0,9933	0,7959	1,20	0,98	0,8278	0,9969	1,74	1,31	0,0437	0,4112
<i>Dihydrouracil   1-Methylhydantoin</i>	<i>Beta-Alanine Metabolism   Unassigned</i>	2,12	1,20	0,1113	0,9241	1,81	0,73	0,2407	0,4699	1,88	1,26	0,0437	0,9999
<i>2-Oxobutyric-acid</i>	<i>Selenoamino Acid Metabolism</i>	1,80	0,93	0,1411	0,9977	1,36	0,75	0,5739	0,8792	2,00	1,22	0,0104	0,4851
<i>3-Methylcrotonyl-glycine   N-Tiglylglycine</i>	<i>Unassigned   Unassigned</i>	2,52	0,92	0,1581	0,9820	1,64	0,52	0,5058	0,2452	2,17	1,08	0,0437	0,9987
<i>Biotin</i>	<i>Alanine Metabolism</i>	1,05	0,95	0,9933	0,9402	1,35	0,90	0,5739	0,9257	1,72	1,35	0,0437	0,8700
<i>Phenylalanine</i>	<i>Phenylalanine and</i>	1,06	1,03	0,9358	0,9680	1,18	0,98	0,6421	0,9946	1,46	1,21	0,0437	0,6232

	<i>Tyrosine Metabolism</i>												
3-Hydroxybutyric-acid	<i>Valine, Leucine and Isoleucine Metabolism</i>	2,55	1,31	0,1581	0,8854	2,45	0,81	0,6421	0,6795	3,69	1,00	0,0437	0,9703
N-Acetyl-L-alanine	NA	0,98	1,31	0,9886	0,9460	1,39	1,13	0,6421	0,9687	1,75	1,12	0,0378	1,0000
Isoleucine   Leucine   L-Norleucine	<i>Valine, Leucine and Isoleucine Metabolism Xenobiotics</i>	1,12	1,20	0,9358	0,6148	1,18	1,14	0,7710	0,9115	1,54	1,42	0,0437	0,2302
N-N-Dimethylglycine	<i>Betaine Metabolism</i>	1,54	1,25	0,1964	0,8257	1,46	0,82	0,4723	0,8960	2,30	1,48	0,0051	0,3999
3-Amino-3-4-hydroxyphenyl-propanoic-acid   Tyrosine	<i>Phenylalanine and Tyrosine Metabolism   Phenylalanine and Tyrosine Metabolism</i>	1,17	1,15	0,8991	0,9927	1,38	0,99	0,6081	0,9984	1,79	1,44	0,0378	0,5213
2-Aminoisobutyric-acid   Aminobutyric-acid	<i>Pyrimidine Metabolism   Unassigned</i>	6,85	1,70	0,0665	0,8486	2,77	0,85	0,4395	1,0000	8,31	2,34	0,0073	0,3021
Histidine	<i>Ammonia Recycling</i>	1,02	1,10	0,9933	0,8854	1,08	1,03	0,8774	0,9946	1,40	1,23	0,0173	0,2646
UMP	<i>Lactose Synthesis</i>	1,29	0,72	0,9186	0,5348	1,68	0,81	0,1411	0,8792	1,99	0,97	0,0203	0,9978
Lysine	<i>Lysine Metabolism</i>	1,32	1,28	0,9738	0,7613	1,24	1,35	0,6756	0,6011	1,82	1,55	0,0239	0,2248
Arginine	<i>Aspartate Metabolism</i>	1,10	1,11	0,9738	0,9566	1,41	1,21	0,2909	0,6795	1,63	1,30	0,0239	0,2988
Panthenol	<i>Pantothenate and</i>	0,26	1,46	0,2178	0,9710	0,19	0,47	0,0504	0,5746	0,10	1,17	0,0203	1,0000

	CoA Biosynthesis												
5-Deoxy-5-methylthio-adenosine	Spermidine and Spermine Biosynthesis	1,02	0,53	0,9985	0,1690	1,26	0,75	0,5058	0,9762	1,62	0,64	0,0437	0,7106
Triethanolamine	NA	0,63	1,08	0,2407	0,9998	0,59	1,25	0,3181	0,8611	0,46	2,26	0,0173	0,9827
Cytidine	Pyrimidine Metabolism	1,06	0,98	0,9933	0,9554	1,25	0,90	0,7084	0,8792	1,63	1,29	0,0437	0,9240
Phenylalanine	Phenylalanine and Tyrosine Metabolism	1,10	1,04	0,9633	0,9968	1,15	0,94	0,7403	0,7997	1,48	1,20	0,0378	0,8248
Leucine   L-Norleucine	Valine, Leucine and Isoleucine Metabolism   Xenobiotics	1,27	1,15	0,7403	0,8070	1,14	1,03	0,6756	0,9993	1,72	1,56	0,0104	0,5132
Tyrosine	Phenylalanine and Tyrosine Metabolism	1,09	1,13	0,8991	0,9690	1,30	1,05	0,3765	0,9946	1,64	1,42	0,0325	0,2617
3-Ureidopropionic-acid	Beta-Alanine Metabolism	4,22	1,38	0,2178	0,9934	1,34	0,55	0,9738	0,3047	3,44	1,73	0,0378	0,9727
Histidine	Ammonia Recycling	1,04	1,10	0,9358	0,7123	1,09	1,05	0,8002	0,9115	1,42	1,29	0,0203	0,1576
L-Glutamine   D-Glutamine	Aspartate Metabolism   Glutamate Metabolism	1,08	1,08	0,7084	0,8630	1,18	0,99	0,3181	0,9993	1,28	1,11	0,0378	0,7373
L-Citrulline	Aspartate Metabolism	1,40	1,18	0,4723	0,8699	1,30	1,16	0,4395	0,8213	1,75	1,63	0,0173	0,0434
L-Citrulline	Aspartate Metabolism	1,24	0,93	0,7084	0,9995	1,29	1,04	0,6756	0,9257	1,68	1,44	0,0239	0,1640

O-Phosphoryle thanolamine	Sphingolipid Metabolism	1,01	0,57	0,9358	0,2399	1,57	0,70	0,1765	0,6275	1,74	0,81	0,0437	0,7429
---------------------------	-------------------------	------	------	--------	--------	------	------	--------	--------	------	------	--------	--------

Anhang 9: Metabolite des Cerebellums mit Pathways, FoldChanges (FC) und Signifikanzen für den Vergleich der WT jeweils mit den Mutanten SCA3 YAC, PARK2 ko und dm-YAC/PARK. Die grau hinterlegten Zahlen markieren die Signifikanzen

Metabolit	Pathway	WT vs SCA3 YAC				WT vs PARK2 ko				WT vs dm-YAC/PARK			
		FC	FC	p=	p=	FC	FC	p=	p=	FC	FC	p=	p=
		2	12	2	12	2	12	2	12	2	12	2	12
		Mo	Mo	Mo	Mo	Mo	Mo	Mo	Mo	Mo	Mo	Mo	Mo
		nat	nat	nat	nat	nat	nat	nat	nat	nat	nat	nat	nat
		e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e	e
3-Hydroxy-3-methylglutaric-acid	Valine, Leucine and Isoleucine Metabolism	1,06	0,96	0,6756	0,6853	1,08	1,01	0,0325	0,6666	1,06	0,93	0,0866	0,6990
Glycerol-3-phosphate	Glycerol Phosphate Shuttle	0,85	1,05	0,8991	0,2208	0,96	0,96	0,4889	0,8316	1,03	0,93	0,0258	0,9164
N-Acetyl-D-glucosamine   N-Acetylmannosamine   N-Acetylgalactosamine	Amino Sugar Metabolism   Amino Sugar Metabolism   NA	0,47	0,82	0,3615	0,8322	0,72	0,76	0,9912	0,1092	0,85	0,66	0,8774	0,0441
Aspartylglycosamine	Amino Sugar Metabolism	1,29	1,08	0,6756	0,3865	1,33	1,18	0,0665	0,6795	1,29	1,32	0,0437	0,4831

Anhang 10: Metabolite im Plasma im Vergleich zwischen dm-YAC/PARK und SCA3 YAC mit Höhe der FoldChanges (FC) und Angabe der Signifikanz in p zu den Zeitpunkten 2 und 12 Monate. Die grau hinterlegten Zahlen markieren die Signifikanzen

Metabolite Plasma dm-YAC/PARK vs SCA3 YAC	FC 2 Monate	FC 12 Monate	p= 2 Monate	p= 12 Monate
Taurine	1,25	1,03	0,0147	0,9809
L-Aspartic-acid	1,68	1,05	0,0173	0,9691
N-Acetyl-a-D-glucosamine-1-phosphate   N-Acetyl-D-glucosamine-6-phosphate	1,72	1,16	0,0203	0,7861
L-Cysteine	2,07	1,17	0,0147	0,4207
D-Ribulose-5-phosphate   D-Xylulose-5-phosphate   D-Ribose-1-phosphate   D-Ribose-5-phosphate	1,80	1,21	0,0437	0,9536
5-AMP   dGMP	1,87	1,94	0,0437	0,4799
Nicotinamide	1,84	1,60	0,0866	0,0256
N-Acetyl-L-alanine	1,79	0,86	0,0147	0,9461
Methylimidazoleacetic-acid	0,15	2,11	0,0088	0,2542
Imidazolelactic-acid	0,88	1,65	0,8278	0,0310
Histidine	1,38	1,13	0,0378	0,5594
Lysine Metabolism	1,61	1,62	0,1255	0,0325
N-Acetyl-L-asparagine	0,84	1,61	0,9186	0,0272

Anhang 11: Metabolite im Plasma im Vergleich zwischen dm-YAC/PARK und PARK2 ko mit Höhe der FoldChanges (FC) und Angabe der Signifikanz in p zu den Zeitpunkten 2 und 12 Monat. Die grau hinterlegten Zahlen markieren die signifikanten Bereiche

Metabolite Plasma dm-YAC/PARK vs. PARK2 ko	FC 2 Monate	FC 12 Monate	p= 2 Monate	p= 12 Monate
Carnosine	0,70	0,21	0,4395	0,0391
Alanine	1,41	1,09	0,0437	1,0000

Anhang 12: Metabolite im Cerebellum im Vergleich zwischen dm-YAC/PARK und SCA3 YAC mit Höhe der FoldChanges (FC) und Angabe der Signifikanz in p zu den Zeitpunkten 2 und 12 Monate. Die grau hinterlegten Zahlen markieren die Signifikanzen

Metabolite Cerebellum dm-YAC/PARK vs. SCA3 YAC	FC 2 Monate	FC 12 Monate	p= 2 Monate	p= 12 Monate
Adenosine	0,98	1,10	0,0239	0,6174
Guanine	1,68	1,12	0,7858	0,0442

Anhang 13: Patienten (MT) mit PD-Medikation. Aufgelistet ist die jeweilige Patienten ID, Geschlecht, Alter zum Zeitpunkt der Probenentnahme, eingenommene PD-Medikament(e), SARA 7, INAS 10

Pat. ID	Geschlecht	Alter	PD-Medikation	SARA ITEM 7	INAS 10 Rigor
Lo59	m	59	Levodopa	Rechts 1 Links 2 Insg. 1,5	unbekannt
Lo26	m	48	Trihexyphenidyl	Rechts 3 Links 3 Insg. 3	unbekannt

Tü5	w	46	<i>Ropinirol, Levodopa, Rotigotin, Amantadine, Madopa</i>	Rechts 1 Links 2 Insg. 1,5	unbekannt
Co1	m	68	<i>Amantadine</i>	Nur follow up Rechts 1 Links 0 Insg. 0,5	unbekannt
Co4	m	73	<i>Amantadine</i>	Rechts 1 Links 1 Insg. 1	nein
Co6	w	63	<i>Parkadina</i>	Rechts 0 Links 0 Insg. 0	nein
Co7	m	59	<i>Parmipexole</i>	Rechts 2 Links 3 Insg. 2,5	unbekannt
Co8	m	56	<i>Amantadine, Pramipexol</i>	Rechts 0 Links 1 Insg. 0,5	unbekannt
Co9	w	44	<i>Amantadine</i>	Rechts 1 Links 1 Insg. 1	nein
Co11	w	37	<i>Trihexyphenidyl, Biperiden</i>	Rechts 4 Links 4 Insg. 4	unbekannt
Co13	w	60	<i>Amantadine</i>	Rechts 2 Links 2 Insg. 2	nein
Co15	m	27	<i>Amantadine, Levodopa, Carbidopa, Trhexyphenidyl</i>	Rechts 4 Links 4 Insg. 4	ja
Co16	m	48	<i>Amantadine</i>	Rechts 2 Links 2 Insg. 2	nein
Co17	w	37	<i>Parkadina, Pramipexole</i>	Rechts 1 Links 2 Insg. 1,5	ja
Co18	m	54	<i>Amantadine</i>	Rechts 4 Links 4 Insg. 4	nein
Co20	m	39	<i>Ropinirole</i>	Rechts 0 Links 1 Insg. 0,5	nein
Co22	m	40	<i>Amantadine, Trihexyphenidyl</i>	Rechts 1 Links 2 Insg. 1,5	nein
Co24	w	46	<i>Amantadine</i>	Nur follow up Rechts 1 Links 1 Insg. 1	nein
Lo7	w	32	<i>Levodopa/Benserazide hydrochlorid</i>	Rechts 3 Links 3 Insg. 3	nein
Lo9	w	41	<i>Ropinirol</i>	Rechts 3 Links 3 Insg. 3	nein
Lo11	m	53	<i>Pramipexole</i>	Rechts 0 Links 2 Insg. 1	nein
Lo16	w	53	<i>Pramipexole</i>	Rechts 1 Links 3 Insg. 2	nein
Lo18	w	57	<i>Amantadin</i>	Rechts 1	nein

				Links 1 Insg. 1	
Lo31	w	48	<i>Ropirinole</i>	Rechts 1 Links 1 Insg. 1	nein
Bo1	w	61	<i>Levodopa/B-Neurax, Prampipexole</i>	Rechts 2 Links 1 Insg. 1,5	nein
Bo12	m	56	<i>Levodopa/Benserazid</i>	Rechts 2 Links 2 Insg. 2	ja
Bo14	w	46	<i>Prampipexole</i>	Rechts 0 Links 1 Insg. 0,5	nein
Bo17	w	52	<i>Rotigotine</i>	Rechts 1 Links 1 Insg. 1	nein
Bo27	w	52	<i>Prampipexole, Metodura</i>	Rechts 1 Links 0 Insg. 0,5	nein
Bo30	w	60	<i>Isicom</i>	Rechts 0 Links 1 Insg. 0,5	nein
Lo55	m	53	<i>Ropirinole</i>	Rechts 4 Links 4 Insg. 4	unbekannt
Co33	w	56	<i>Amantadine</i>	Rechts 1 Links 2 Insg. 1,5	ja
Co35	m	33	<i>Amantadine</i>	Rechts 0 Links 1 Insg. 0,5	ja
Co37	m	63	<i>Prampipexole</i>	Rechts 0 Links 1 Insg. 0,5	ja
Co38	w	53	<i>Amantadine</i>	Rechts 1 Links 2 Insg. 1,5	ja
Co39	m	39	<i>Levodopa, Carbidopa, Selegiline</i>	Rechts 3 Links 3 Insg. 3	ja
Co50	w	56	<i>Rotigotin, Levodopa</i>	Rechts 1 Links 1 Insg. 1	nein
Co51	w	55	<i>Amantadine</i>	Rechts 1 Links 1 Insg. 1	nein
Co52	m	55	<i>Levodopa, Tryhexiphenidyl</i>	Rechts 2 Links 3 Insg. 2,5	nein
Az2	w	38	<i>Carbidopa/Levodopa, Trihexyphenidyl</i>	Rechts 0 Links 0 Insg. 0	nein
Az43	w	49	<i>Carbidopa/Levodopa, Ropinirol</i>	Rechts 0 Links 0 Insg. 0	nein
Az59	m	46	<i>Carbidopa/Levodopa, Trihexyphenidyl</i>	Rechts 3 Links 3 Insg. 3	unbekannt
Tü32	m	51	<i>Pregubalin, Tramadol, Madopa</i>	Rechts 2 Links 2 Insg. 2	unbekannt
Bo43	m	52	<i>Levodopa</i>	Rechts 0	nein

				Links 2 Insg. 1	
Lo72	w	62	<i>Levodopa/Benserazid</i>	Rechts 3 Links 3 Insg. 3	unbekannt
Bo52	m	72	<i>Pramipexole</i>	Rechts 1 Links 1 Insg. 1	nein
Bo68/Bo10	m	58	<i>Pramipexole (Sifrol)</i>	Rechts 2 Links 2 Insg. 2	nein
Co70	w	58	<i>Levodopa</i>	Rechts 3 Links 3 Insg. 3	unbekannt
Co72	unbekannt	unbekannt	<i>Ropirinole</i>	Rechts 0 Links 1 Insg. 0,5	nein

Anhang 14: Patienten (MT) mit PD-Medikation. Aufgelistet sind die zugehörigen Pat. ID, INAS 13, RLS ja/nein und Medikation ja/nein, Parkinlevel, SNPs für PARK2

Pat. ID	INAS 13 Ruhetremor	RLS Ja/nein	RLS Medikation ja/nein	Parkin Proteinlevel	SNPs PARK2 Exon 4	SNPs PARK2 Exon 10	SNPs PARK2 Exon 11
Lo59	Unbekannt	nein	nein	385,53	G/G	C/G	G/G
Lo26	Unbekannt	nein	nein	20,14	G/G	G/G	G/G
Tü5	Unbekannt	ja	ja	27,60	G/G	G/G	G/G
Co1	unbekannt	nein	nein	12,81	G/G	C/G	G/G
Co4	nein	nein	nein	15,50	G/G	G/G	G/G
Co6	nein	nein	nein	17,68	G/G	C/G	G/G
Co7	unbekannt	nein	nein	2,99	G/G	G/G	G/G
Co8	unbekannt	ja	ja	3,17	A/G	G/G	G/G
Co9	nein	ja	nein	8,03	G/G	G/G	G/G
Co11	unbekannt	nein	nein	-	G/G	G/G	G/G
Co13	nein	ja	nein	29,22	G/G	C/G	G/G
Co15	nein	nein	nein	-	G/G	G/G	G/G
Co16	nein	unbekannt	nein	16,83	G/G	G/G	G/G
Co17	nein	ja	ja	43,04	G/G	G/G	G/G
Co18	ja	nein	nein	128,92	G/G	G/G	G/G
Co20	nein	ja	ja	93,63	G/G	C/G	G/G
Co22	nein	nein	nein	1,48	G/G	G/G	G/G
Co24	nein	unbekannt	nein	-	G/G	G/G	G/G
Lo7	nein	nein	nein	22,18	G/G	G/G	G/G
Lo9	nein	ja	ja	-	G/G	C/G	G/G
Lo11	nein	ja	nein	0,64	A/G	C/G	G/G
Lo16	nein	ja	ja	68,84	G/G	G/G	G/G
Lo18	nein	ja	ja	37,14	G/G	C/G	G/G
Lo31	nein	ja	ja	21,01	G/G	C/G	G/G
Bo1	nein	ja	ja	125,05	G/G	G/G	G/G
Bo12	nein	nein	nein	15,12	G/G	G/G	G/G
Bo14	nein	ja	ja	102,26	G/G	C/G	G/G
Bo17	nein	ja	ja	31,00	G/G	G/G	G/G
Bo27	nein	nein	nein	1,90	G/G	C/G	G/G
Bo30	nein	nein	nein	7,53	G/G	G/G	G/G
Lo55	unbekannt	nein	nein	2999,61	-	-	G/G
Co33	nein	nein	nein	13,25	G/G	C/G	G/G
Co35	nein	nein	nein	43,42	G/G	G/G	G/G
Co37	nein	Ja	ja	409,45	G/G	C/C	G/G
Co38	nein	nein	nein	86,48	G/G	G/G	G/G
Co39	nein	nein	nein	823,93	G/G	G/G	G/G
Co50	nein	nein	nein	48,81	G/G	C/G	G/G
Co51	nein	nein	nein	6,79	G/G	C/G	A/G

Co52	nein	nein	nein	-	G/G	C/G	G/G
Az2	nein	nein	nein	-	G/G	G/G	G/G
Az43	nein	nein	nein	27,91	-	-	G/G
Az59	unbekannt	nein	nein	-	G/G	G/G	G/G
Tü32	unbekannt	ja	ja	27,14	G/G	C/G	A/G
Bo43	nein	ja	ja	40,01	G/G	G/G	G/G
Lo72	unbekannt	nein	nein	16,63	G/A	G/G	G/G
Bo52	nein	ja	ja	4,17	G/G	G/G	A/G
Bo68/ Bo10	ja	nein	nein	3,68	G/G	G/G	G/G
Co70	unbekannt	nein	nein	2,53	G/G	G/G	G/G
Co72	nein	nein	nein	1,66	G/G	G/G	G/G

