

Aus dem Department für Diagnostische Labormedizin der
Universität Tübingen

Institut für Medizinische Genetik und angewandte Genomik

**Analyse putativer Biomarker in der Spinozerebellären Ataxie
Typ 3 (SCA3)**

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

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

vorgelegt von

Gonsior, Kathrin

2020

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. O. Rieß

2. Berichterstatter: Professor Dr. L. Quintanilla Martinez de Fend

Tag der Disputation: 14.01.2020

Für meine Weggefährten

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	ix
Tabellenverzeichnis	xiii
Abkürzungsverzeichnis	xv
1 Einleitung	1
1.1 Spinozerebelläre Ataxie Typ 3	1
1.1.1 Definition	1
1.1.2 Einteilung	1
1.1.3 Epidemiologie.....	3
1.1.4 Das <i>Ataxin-3-Gen</i>	3
1.1.5 Die <i>Ataxin-3-RNA</i>	5
1.1.6 Das <i>Ataxin-3-Protein</i>	6
1.1.7 Klinik.....	13
1.1.8 Diagnostik	15
1.1.9 Therapie	17
1.1.10 Neue mögliche therapeutische Ansätze.....	19
1.2 Die Rolle von Parkin in der SCA3	22
1.2.1 Das <i>Park2-Gen</i>	22
1.2.2 Das <i>Parkin-Protein</i>	23
1.2.3 Die Interaktion des <i>Ataxin-3-Proteins</i> und <i>Parkin</i>	25
1.2.4 Die Rolle von <i>Park2</i> -Polymorphismen in der Interaktion von <i>Parkin</i> und dem <i>Ataxin-3-Protein</i>	27
1.3 Biomarker	30
1.3.1 Allgemeines.....	30
1.3.2 Biomarker in der SCA3	31
1.4 <i>NeurOmics</i>	35
1.5 Zielsetzung	36

2	Material und Methoden	39
2.1	Material	39
2.1.1	Geräteverzeichnis	39
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	41
2.1.3	Blutröhrchensysteme	42
2.1.4	Chemikalien und Biochemikalien	42
2.1.5	Puffer und Lösungen	43
2.1.6	Enzyme und käuflich erworbene Puffer	44
2.1.7	Reagenziensets (Kits)	45
2.1.8	<i>Primer</i>	45
2.1.9	Antikörper	46
2.1.10	Software und Internetressourcen	47
2.2	Methoden	48
2.2.1	Blutentnahme	48
2.2.2	Aufreinigung der Lymphozyten aus Vollblut	48
2.2.3	Lyse der Lymphozyten	50
2.2.4	Verdünnung der Lymphozyten für die Proteinbestimmung	51
2.2.5	Bradford-Proteinbestimmung	51
2.2.6	<i>Time-resolved fluorescence energy transfer-Assay</i>	54
2.2.7	Polymerasekettenreaktion	58
2.2.8	Gelelektrophorese	63
2.2.9	Aufreinigung der PCR-Produkte	65
2.2.10	Sequenzierungsreaktion der Polymorphismen	67
2.2.11	CAG-Wiederholungen-Fragmentlängenanalyse in <i>Ataxin-3</i>	71
2.2.12	Statistische Auswertungen	73
3	Ergebnisse	74
3.1	Etablierung eines hochsensitiven und -spezifischen TR-FRET-Assays für das Gesamt-Ataxin-3-Protein	74
3.1.1	Allgemeiner Ablauf der Etablierung eines TR-FRET-Assays	74

3.1.2	Bestimmung der verwendeten Antikörper und ihrer Mengen zur Bestimmung des Gesamt-Ataxin-3-Protein.....	74
3.2	Kohortenanalyse	76
3.2.1	Klinische Merkmalsausprägungen	76
3.2.2	Genetische Merkmalsausprägungen	78
3.2.3	Korrelationen der CAG-Wiederholungen mit den klinischen Parametern	81
3.2.4	Korrelationen des <i>Ataxin-3</i> -Polymorphismus A ⁶⁶⁹ /G ⁶⁶⁹ mit den klinischen Parametern	83
3.2.5	Korrelationen der Polymorphismen G ⁹⁸⁷ /C ⁹⁸⁷ und C ¹¹¹⁸ /A ¹¹¹⁸ mit den klinischen Parametern.....	85
3.2.6	Korrelationen des <i>Park2</i> -Polymorphismus G ⁶⁰¹ /A ⁶⁰¹ mit den klinischen Parametern	87
3.2.7	Korrelationen des <i>Park2</i> -Polymorphismus G ¹²³⁹ /C ¹²³⁹ mit den klinischen Parametern	90
3.2.8	Korrelationen des <i>Park2</i> -Polymorphismus G ¹²⁸¹ /A ¹²⁸¹ mit den klinischen Parametern	90
3.2.9	Zusammenfassung der Ergebnisse der Etablierung des TR-FRET-Assays zur Bestimmung des Gesamt-Ataxin-3-Proteins und der Kohortenanalyse	92
3.3	Korrelationen des Gesamt-Ataxin-3-Proteins	92
3.3.1	Korrelationen des Gesamt-Ataxin-3-Proteins mit den klinischen Parametern	93
3.3.2	Korrelation des Gesamt-Ataxin-3-Proteins mit den CAG-Wiederholungen	97
3.3.3	Korrelationen des Gesamt-Ataxin-3-Proteins mit den drei untersuchten <i>Ataxin-3</i> -Polymorphismen	98
3.3.4	Korrelationen des Gesamt-Ataxin-3-Proteins mit den drei untersuchten <i>Park2</i> -Polymorphismen.....	99
3.3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse der Korrelationsprüfungen des Gesamt-Ataxin-3-Proteins.....	102
3.4	Korrelationen des expandierten Ataxin-3-Proteins	103

3.4.1	Korrelationen des expandierten Ataxin-3-Proteins mit den klinischen Parametern	104
3.4.2	Korrelation des expandierten Ataxin-3-Proteins mit den CAG-Wiederholungen	108
3.4.3	Korrelationen des expandierten Ataxin-3-Proteins mit den drei untersuchten <i>Ataxin-3</i> -Polymorphismen	109
3.4.4	Korrelationen des expandierten Ataxin-3-Proteins mit den drei untersuchten <i>Park2</i> -Polymorphismen	110
3.4.5	Zusammenfassung der Ergebnisse der Korrelationsprüfungen des expandierten Ataxin-3-Proteins.....	113
3.5	Korrelationen des Parkin-Proteins	114
3.5.1	Korrelationen des Parkin-Proteins mit den klinischen Parametern	115
3.5.2	Korrelation des Parkin-Proteins mit den CAG-Wiederholungen	118
3.5.3	Korrelationen des Parkin-Proteins mit den drei untersuchten <i>Ataxin-3</i> -Polymorphismen	119
3.5.4	Korrelationen des Parkin-Proteins mit den drei untersuchten <i>Park2</i> -Polymorphismen	119
3.5.5	Zusammenfassung der Ergebnisse der Korrelationsprüfungen des Parkin-Proteins.....	122
3.6	Korrelationen der Proteine untereinander	123
3.7	Verlaufsdynamik der Proteine.....	124
3.8	Einflüsse auf die Messungen	127
3.8.1	Entwicklung der Pipettiergenauigkeit	127
3.8.2	Potenzielles Bias durch die verschiedenen Zentren	127
3.8.3	Kontrollstudien zu Blutröhrchensystemen und Blutentnahmezeitpunkten.....	130
3.8.4	Zusammenfassung der Proteinkorrelationen untereinander, der Verlaufspuren und der Einflüsse auf die Messungen	134
4	Diskussion	136
4.1	Die Analyse der CAG-Wiederholungen, <i>Ataxin-3</i>- und <i>Park2</i>-Polymorphismen als genetische Biomarker	136

4.2 Prüfung des Gesamt-Ataxin-3-, des expandierten Ataxin-3- und des Parkin-Proteins als Verlaufsbiomarker	141
4.3 Schwächen dieser Promotion	154
4.4 Ausblick.....	158
5 Zusammenfassung.....	162
Literaturverzeichnis.....	I
Anhang.....	XX
Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	XXIV
Veröffentlichungen: Präsentationen und Poster	XXV
Danksagung	XXVI
Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des Aufbaus des Ataxin-3-Proteins...	7
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Aufbaus des Parkin-Proteins....	23
Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Ubiquitinierung von Parkin und der Interaktion mit dem Ataxin-3-Protein	28
Abbildung 1.4: Darstellung der im ersten Kapitel beschriebenen Thematik zur SCA3 und Parkin und der möglichen Etablierung von Biomarkern	37
Abbildung 2.1: Exemplarische Eichkurve anhand der in Tabelle 2.12 dargestellten Messreihe	53
Abbildung 2.2: Beispielhafte Darstellung des Funktionsprinzips des TR-FRET für das expandierte Ataxin-3-Protein	54
Abbildung 2.3: Intensität der verschiedenen Fluoreszenzsignale bei Messung des FRET-Signals	57
Abbildung 2.4: Bandenmarker <i>peqGOLD DNA-ladder</i> Mix.....	63
Abbildung 2.5: Gelbild einer PCR zum <i>Park2</i> -Polymorphismus G ¹²³⁹ /C ¹²³⁹	64
Abbildung 2.6: Gelbild einer PCR zu den <i>Ataxin-3</i> -Polymorphismen G ⁹⁸⁷ /C ⁹⁸⁷ und C ¹¹¹⁸ /A ¹¹¹⁸	65
Abbildung 2.7: Auswertung der Fragmentlängenbestimmung.....	73
Abbildung 3.1: Messergebnisse der Gesamt-Ataxin-3-Protein-TR-FRET-Assay- Etablierung	75
Abbildung 3.2: Korrelation der CAG-Wiederholungen mit dem AAO.....	81
Abbildung 3.3: Korrelation der CAG-Wiederholungen mit dem SARA-Score....	82
Abbildung 3.4: Korrelation der CAG-Wiederholungen mit der CSDP	83
Abbildung 3.5: Korrelation des Polymorphismus A ⁶⁶⁹ /G ⁶⁶⁹ mit dem AAO	84
Abbildung 3.6: Korrelation des Polymorphismus A ⁶⁶⁹ /G ⁶⁶⁹ mit dem SARA- Score	84
Abbildung 3.7: Korrelation des Polymorphismus A ⁶⁶⁹ /G ⁶⁶⁹ mit der CSDP	85
Abbildung 3.8: Korrelation der Polymorphismen G ⁹⁸⁷ /C ⁹⁸⁷ und C ¹¹¹⁸ /A ¹¹¹⁸ mit dem AAO	86
Abbildung 3.9: Korrelation der Polymorphismen G ⁹⁸⁷ /C ⁹⁸⁷ und C ¹¹¹⁸ /A ¹¹¹⁸ mit dem SARA-Score	86

Abbildung 3.10: Korrelation der Polymorphismen G ⁹⁸⁷ /C ⁹⁸⁷ und C ¹¹¹⁸ /A ¹¹¹⁸ mit der CSDP	87
Abbildung 3.11: Korrelation des Polymorphismus G ⁶⁰¹ /A ⁶⁰¹ mit dem AAO	88
Abbildung 3.12: Korrelation des Polymorphismus G ⁶⁰¹ /A ⁶⁰¹ mit dem SARA-Score	89
Abbildung 3.13: Korrelation des Polymorphismus G ⁶⁰¹ /A ⁶⁰¹ mit der CSDP	89
Abbildung 3.14: Korrelationen des Polymorphismus G ¹²³⁹ /C ¹²³⁹ mit dem AAO, dem SARA-Score und der CSDP	91
Abbildung 3.15: Korrelation des Gesamt-Ataxin-3-Proteins mit dem Erkrankungsstatus	93
Abbildung 3.16: Korrelation des Gesamt-Ataxin-3-Proteins mit dem AAO	94
Abbildung 3.17: Korrelation des Gesamt-Ataxin-3-Proteins mit der Krankheitsdauer	95
Abbildung 3.18: Korrelation des Gesamt-Ataxin-3-Proteins mit dem SARA-Score	96
Abbildung 3.19: Korrelation des Gesamt-Ataxin-3-Proteins mit der CSDP	96
Abbildung 3.20: Korrelation des Gesamt-Ataxin-3-Proteins mit den CAG-Wiederholungen	97
Abbildung 3.21: Korrelationen des Gesamt-Ataxin-3-Proteins mit den <i>Ataxin-3</i> -Polymorphismen A ⁶⁶⁹ /G ⁶⁶⁹ , G ⁹⁸⁷ /C ⁹⁸⁷ und C ¹¹¹⁸ /A ¹¹¹⁸	99
Abbildung 3.22: Korrelationen des Gesamt-Ataxin-3-Proteins mit den <i>Park2</i> -Polymorphismen G ⁶⁰¹ /A ⁶⁰¹ , G ¹²³⁹ /C ¹²³⁹ und G ¹²⁸¹ /A ¹²⁸¹	101
Abbildung 3.23: Korrelation des expandierten Ataxin-3-Proteins mit dem Erkrankungsstatus	104
Abbildung 3.24: Korrelation des expandierten Ataxin-3-Proteins mit dem AAO	105
Abbildung 3.25: Korrelation des expandierten Ataxin-3-Proteins mit der Krankheitsdauer	105
Abbildung 3.26: Korrelation des expandierten Ataxin-3-Proteins mit dem SARA-Score	106
Abbildung 3.27: Korrelation des expandierten Ataxin-3-Proteins mit der CSDP	107

Abbildung 3.28: Korrelation des expandierten Ataxin-3-Proteins mit den CAG-Wiederholungen	108
Abbildung 3.29: Korrelationen des expandierten Ataxin-3-Proteins mit den <i>Ataxin-3</i> -Polymorphismen A ⁶⁶⁹ /G ⁶⁶⁹ , G ⁹⁸⁷ /C ⁹⁸⁷ und C ¹¹¹⁸ /A ¹¹¹⁸	110
Abbildung 3.30: Korrelationen des expandierten Ataxin-3-Proteins mit den <i>Park2</i> -Polymorphismen G ⁶⁰¹ /A ⁶⁰¹ , G ¹²³⁹ /C ¹²³⁹ und G ¹²⁸¹ /A ¹²⁸¹	112
Abbildung 3.31: Korrelation des Parkin-Proteins mit dem Krankheitsstatus....	114
Abbildung 3.32: Korrelation des Parkin-Proteins mit dem AAO.....	115
Abbildung 3.33: Korrelation des Parkin-Proteins mit der Krankheitsdauer.....	116
Abbildung 3.34: Korrelation des Parkin-Protein mit dem SARA-Score.....	117
Abbildung 3.35: Korrelation des Parkin-Proteins mit der CSDP	117
Abbildung 3.36: Korrelation des Parkin-Proteins und mit den CAG-Wiederholungen	118
Abbildung 3.37: Korrelationen des Parkin-Proteins mit den <i>Ataxin-3</i> -Polymorphismen A ⁶⁶⁹ /G ⁶⁶⁹ , G ⁹⁸⁷ /C ⁹⁸⁷ und C ¹¹¹⁸ /A ¹¹¹⁸	120
Abbildung 3.38: Korrelationen des Parkin-Proteins mit den <i>Park2</i> -Polymorphismen G ⁶⁰¹ /A ⁶⁰¹ , G ¹²³⁹ /C ¹²³⁹ und G ¹²⁸¹ /A ¹²⁸¹	122
Abbildung 3.39: Korrelation der Proteine untereinander.....	124
Abbildung 3.40: Verlaufsdynamik des SARA-Scores und der gemessenen Proteinlevel.....	125
Abbildung 3.41: Wiederholte Messung der Verlaufspuren	126
Abbildung 3.42: Entwicklung der Pipettiergenauigkeit.....	128
Abbildung 3.43: Vergleich der Proteinmessungen in Abhängigkeit der Zentren	129
Abbildung 3.44: Vergleich der Korrelationen des Parkin-Proteins mit dem AAO und der Krankheitsdauer unter Ausschluss der Messwerte aus dem dritten Zentrum	130
Abbildung 3.45: Kontrollstudie des Gesamt-Ataxin-3-Proteins in CPDA- und EDTA-Röhrchen vor und nach Nahrungsaufnahme.....	131
Abbildung 3.46: Kontrollstudie des Parkin-Proteins in CPDA- und EDTA-Röhrchen vor und nach Nahrungsaufnahme.....	132

Abbildung 3.47: Kontrollstudie des Gesamt-Ataxin-3-Proteins in CPDA- und CPT-Röhrchen vor und nach Nahrungsaufnahme	133
Abbildung 3.48: Kontrollstudie des Parkin-Proteins in CPDA- und EDTA-Röhrchen vor und nach Nahrungsaufnahme.....	134
Abbildung 4.1: Einfluss der genetischen Ausprägungen auf die klinischen Parameter.....	141
Abbildung 4.2: Hypothese: Abnahme des löslichen physiologischen Ataxin-3-Proteins durch verstärkte Interaktion mit dem expandierten Ataxin-3-Protein in der SCA3	144
Abbildung 4.3: Hypothese: Das Level des expandierten Ataxin-3-Proteins nimmt im Verlauf der SCA3-Erkrankung zu	148
Abbildung 4.4: Parkin-Protein-Messwerte der SCA3-Patienten mit Parkinsonismus	150
Abbildung 4.5: Hypothese: Erniedrigte Parkin-Protein-Level liegen bei hohem Level des expandierten Ataxin-3-Proteins vor und begünstigen Parkinsonismus bei SCA3-Patienten.....	152
Abbildung 4.6: Dynamik des Signalverlustes nach verzögerter Prozessierung der Lymphozyten aus CPDA-Röhrchen	154
Abbildung 4.7: Zusammenfassung der im Ausblick beschriebenen nächsten Schritte	161
Abbildung A: Korrelation des α -Synuclein-Proteins mit dem Erkrankungsstatus.....	XX
Abbildung B: Korrelation des α -Synuclein-Proteins mit den klinischen Parametern.....	XXII
Abbildung C: Prüfung des Einflusses von Nahrungsaufnahme und Blutröhrchensystemen auf die Level des α -Synuclein-Proteins	XXIII

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Überblick der Einteilung der autosomal-dominant vererbaren Ataxien nach ihrer typischen Klinik (nach Harding 1982; Schols et al. 2004)	2
Tabelle 1.2: Überblick der vier unterschiedlichen Phänotypen der SCA3 (nach Coutinho und Andrade 1978; Rosenberg 1992).....	14
Tabelle 2.1: Verzeichnis der verwendeten Geräte.....	39
Tabelle 2.2: Verzeichnis der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	41
Tabelle 2.3: Verzeichnis der verwendeten Blutröhrchensysteme.....	42
Tabelle 2.4: Verzeichnis der verwendeten Chemikalien und Biochemikalien....	42
Tabelle 2.5: Verzeichnis der verwendeten Puffer und Lösungen	43
Tabelle 2.6: Verzeichnis der verwendeten Enzyme und käuflich erworbenen Puffer	44
Tabelle 2.7: Verzeichnis der verwendete Reagenziensets.....	45
Tabelle 2.8: Verzeichnis der verwendeten <i>Primer</i> für Polymorphismen des <i>Ataxin-3</i> -Gens.....	45
Tabelle 2.9: Verzeichnis der verwendeten <i>Primer</i> für Polymorphismen des <i>Park2</i> -Gens	45
Tabelle 2.10: Verzeichnis der verwendeten Antikörper	46
Tabelle 2.11: Verzeichnis der verwendeten Softwareprogramme und Internetressourcen.....	47
Tabelle 2.12: Exemplarische Messergebnisse einer Standardreihe.....	53
Tabelle 2.13: Zusammensetzung des AK-Mix zur Proteindetektion	55
Tabelle 2.14: TR-FRET Protokoll.....	56
Tabelle 2.15: Inhalte des PCR-Ansatzes pro Probe zur Amplifikation der <i>Park2</i> -Polymorphismen G ⁶⁰¹ /A ⁶⁰¹ , G ¹²³⁹ /C ¹²³⁹ und G ¹²⁸¹ /A ¹²⁸¹	59
Tabelle 2.16: Zyklus-Programm zur PCR der <i>Park2</i> -Polymorphismen G ⁶⁰¹ /A ⁶⁰¹ , G ¹²³⁹ /C ¹²³⁹ und G ¹²⁸¹ /A ¹²⁸¹	59
Tabelle 2.17: Inhalte des PCR-Ansatzes pro Probe zur Amplifikation des <i>Ataxin-3</i> -Polymorphismus A ⁶⁶⁹ /G ⁶⁶⁹	60
Tabelle 2.18: Zyklus-Programm zur PCR des <i>Ataxin-3</i> -Polymorphismus A ⁶⁶⁹ /G ⁶⁶⁹	60

Tabelle 2.19: Inhalte des PCR-Ansatzes pro Probe zur Amplifikation der <i>Ataxin-3</i> -Polymorphismen G ⁹⁸⁷ /C ⁹⁸⁷ und C ¹¹¹⁸ /A ¹¹¹⁸	61
Tabelle 2.20: Zyklus-Programm zur PCR der <i>Ataxin-3</i> -Polymorphismen G ⁹⁸⁷ /C ⁹⁸⁷ und C ¹¹¹⁸ /A ¹¹¹⁸	61
Tabelle 2.21: Inhalte des PCR-Ansatzes pro Probe zur CAG-Wiederholungen-Fragmentlängenbestimmung in <i>Ataxin-3</i>	62
Tabelle 2.22: Zyklus-Programm zur PCR zur CAG-Wiederholungen-Fragmentlängenbestimmung in <i>Ataxin-3</i>	62
Tabelle 2.23: Inhalte des Sequenzierungsansatzes pro Probe der <i>Park2</i> -Polymorphismen G ⁶⁰¹ /A ⁶⁰¹ , G ¹²³⁹ /C ¹²³⁹ und G ¹²⁸¹ /A ¹²⁸¹ sowie des <i>Ataxin-3</i> -Polymorphismus A ⁶⁶⁹ /G ⁶⁶⁹	68
Tabelle 2.24: Inhalte des Sequenzierungsansatzes pro Probe der der <i>Ataxin-3</i> -Polymorphismen der G ⁹⁸⁷ /C ⁹⁸⁷ und C ¹¹¹⁸ /A ¹¹¹⁸	69
Tabelle 2.25: Zyklus-Programm zur Sequenzierungsreaktion	69
Tabelle 2.26: Inhalte des Stopp-Mixes zur Unterbrechung der Sequenzierungsreaktion pro Probe	70
Tabelle 2.27: Sequenzierungsprogramm „LFR-b“	71
Tabelle 2.28: Programm der Fragmentlängenbestimmung „Frag-2“	72
Tabelle 3.1: Überblick der klinischen Merkmale der Gesamtkohorte	78
Tabelle 3.2: Überblick der genetischen Merkmalsausprägungen der untersuchten SCA3-Patienten und RISCA.....	80
Tabelle 3.3: Zusammenfassung der Ergebnisse der Abschnitte 3.1 und 3.2	92
Tabelle 3.4: Zusammenfassung der Korrelationsprüfungen für das Gesamt- <i>Ataxin-3</i> -Protein.....	102
Tabelle 3.5: Zusammenfassung der Korrelationsprüfungen für das expandierte <i>Ataxin-3</i> -Protein.....	113
Tabelle 3.6: Zusammenfassung der Korrelationsprüfungen für das <i>Parkin</i> -Protein	123
Tabelle 3.7: Protokoll des zu sich genommenen Frühstücks der Kontrollen ...	132
Tabelle 3.8: Zusammenfassung der Proteinkorrelationen untereinander, der Dynamik der Verlaufsproben und der Einflüsse auf die Messergebnisse	135

Abkürzungsverzeichnis

AAO	<i>Age at Onset</i> (Erkrankungsbeginn)
ADCA	autosomal-dominant vererbare Ataxien
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
ASIC	<i>acid-sensing ion channel</i>
ASO	allelspezifische Oligonukleotide
ATP	Adenosintriphosphat
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BMI	<i>Body-Mass-Index</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
CAST	Calpastatin
CDCrel	<i>cell division control related protein</i>
CHIP	C-Terminus des Hsc70-interagierenden Proteins
CPDA	Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin
CPT	<i>Cell Preparation Tubes</i>
CSDP	<i>cross-sectional disease progression</i>
D	Aspartat
dd	destilliert
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTPs	Nukleotidmix
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
DRPLA	dentato-rubro-pallido-luysische Atrophie
DUB	Deubiquitinierung
EA	episodische Ataxie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
exp	Expandiertes Allel
FOXO	<i>Forkhead-Box</i> -Transkriptionsfaktor O
G	Glycin

GSH-Px	Glutathionperoxidase
HD	Chorea Huntington
HDAC	Histon-Deacetylase
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
Hsp	Hitzeschockprotein
IBR	<i>In-between-RING</i>
ICARS	<i>International Cooperative Ataxia Rating Scale</i>
INAS	<i>Inventory of Non-Ataxia Symptoms</i>
IPS	Induzierte Pluripotente Stammzelle
IQA	Interquartilsabstand
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
KO	<i>Knockout</i>
L	Leucin
M	Methionin
MJD	<i>Machado-Joseph Disease</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRT	Magnetresonanztomogramm
mtDNA	mitochondriale DNA
mTOR	<i>Mechanistic Target of Rapamycin</i>
N	Asparagin
<i>Ncl.</i>	<i>Nucleus</i>
NES	nukleares Exportsignal
NESSCA	<i>Neurological Examination Score for SCA</i>
NLK	negative lineare Korrelation
NLS	nukleares Lokalisierungssignal
nor	physiologisches Allel
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PICK-1	C-Kinase 1
PINK1	PTEN-induzierte putative Kinase 1
PLK	positive lineare Korrelation
PolyQ	Polyglutamin

Q	Glutamin
R	Arginin
RCT	randomisierte-klinische Studie (<i>randomized clinical trial</i>)
RISCA	asymptomatische Angehörige von Indexpatienten, die eventuell Mutationsträger sind
RLS	<i>Restless-Legs-Syndrom</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
S	Serin
SARA	<i>Scale for the assessment and rating ataxia</i>
SBMA	Spinobulbäre Muskelatrophie Typ Kennedy
SCA	Spinozerebelläre Ataxie
SCA3	Spinozerebelläre Ataxie Typ 3
SD	Standardabweichung
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
Singulex	<i>Single Molecule Counting Immunoassay</i>
SMT-TMP	Sulfamethoxazol-Trimethoprim
SOD	Superoxiddismutase
Stopp	Stopp-Codon
<i>Taq</i>	hitze stabile DNA-Polymerase
Tb	Terbiumcryptat
TBE	10x Tris-Borat-EDTA-Puffer
TR-FRET	<i>Time-resolved fluorescence energy transfer</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
Ubl	Ubiquitin- <i>like</i>
UIM	Ubiquitin interagierende Domäne, <i>ubiquitin interacting motif</i>
UPS	Ubiquitin-Proteasom-Signalweg
V	Valin
WES	<i>Next-Generation Whole-Exome Sequencing</i>
Y	Tyrosin
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Spinozerebelläre Ataxie Typ 3

1.1.1 Definition

Die Spinozerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3), auch *Machado-Joseph Disease* (MJD) genannt, ist eine autosomal-dominant vererbte neurodegenerative Erkrankung, die zu einem Neuronenverlust führt. Dieser betrifft vor allem die Purkinje-Zellen des Kleinhirns (Munoz et al. 2002). Ihre monogenetische Mutation beruht auf einer erhöhten Wiederholungszahl des CAG-Tripletts in Exon 10 des *Ataxin-3*-Gens auf Chromosom 14q32.1 und führt konsekutiv zu einem vermehrten Einbau von Glutaminen (Q) in das Ataxin-3-Protein. (Takiyama et al. 1993; Kawaguchi et al. 1994).

1.1.2 Einteilung

SCA3 gehört zu den autosomal-dominant vererbten Ataxien, die sich in die Spinozerebellären Ataxien (SCA), die Dentato-Rubro-Pallido-Luysische Atrophie (DRPLA) und die episodischen Ataxien (EA) aufteilen. Für die SCAs sind knapp 30 verschiedene Subtypen mit ihren eigenen Mutationen bekannt (Klebe 2012). Davon beruhen sechs (SCA1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA17) auf einer Erhöhung der CAG-Wiederholungen in Exons ihrer jeweiligen betroffenen Gene (Schols et al. 2004; Brinkman et al. 1997).

Die SCA3 kann aufgrund der erhöhten Anzahl der CAG-Wiederholungen auch der phänotypisch heterogenen, aber vom Pathomechanismus ähnlichen Krankheitsgruppe der Polyglutaminerkrankungen zugeordnet werden. Zu ihnen gehören neben den oben genannten SCAs, die DRPLA, die Chorea Huntington (*Huntington's Disease*, HD) und die Spinobulbäre Muskelatrophie Typ Kennedy (SBMA). Außer der X-chromosomal vererbten SBMA werden alle Erkrankungen dieser Gruppe autosomal-dominant weitergegeben (Brinkman et al. 1997; Orr und Zoghbi 2007). Dass hier die expandierte Anzahl an Glutaminen die pathologische Ursache sein muss, kann durch die Beteiligung verschiedener Gene mit

ihren dementsprechenden Genprodukte und ausgeprägten neurologischen Störungen aller Krankheitsbilder erschlossen werden (Schols et al. 2004).

Neben der Einteilung nach der zugrunde liegenden Mutation gibt es durch Harding eine klinisch orientierte Einteilung, die zwischen vier verschiedenen Typen der autosomal-dominant vererbten Ataxien (ADCA) unterscheidet. Laut dieser Klassifikation sind die ADCA Typ I Ataxien mit anderen betroffenen neurologischen Funktionssystemen wie extrapyramidalen Symptomen, Ophthalmoplegie oder Demenz. Zu diesem Typ lässt sich die SCA3 einkategorisieren, da diese sehr häufig mit zusätzlichen Symptomen wie einer externen Ophthalmoplegie einhergeht. Die ADCA Typ II sind Ataxien mit retinaler Degeneration, die vor allem Patienten mit einer SCA7 betrifft. Abschließend werden die ADCA Typ III als „reine“ zerebelläre Ataxien ohne eine Limitierung der Lebenserwartung mit einer späten Krankheitsmanifestation (*Age at Onset*, AAO) (60 Jahre oder älter) und die ADCA Typ IV als Ataxie mit zusätzlichen Myoklonien und Taubheit beschrieben (Harding 1982) (Tabelle 1.1). Da die Klinik der verschiedenen ADCA teilweise überlappend ist, ist der Gebrauch dieser Klassifikation rückläufig (persönlich Prof. Dr. med. Rieß).

Tabelle 1.1: Überblick der Einteilung der autosomal-dominant vererbten Ataxien nach ihrer typischen Klinik (nach Harding 1982; Schols et al. 2004)

ADCA Typ	Klinik	Exemplarische Erkrankungen
ADCA Typ I	Zerebelläre Ataxie mit weiteren neurologischen Störungen wie: <ul style="list-style-type: none"> • Ophthalmoplegie • Pyramidale Symptomatik (Spastik) • Extrapyramidale Symptomatik (Dystonie, Parkinsonismus, Tremor) • Demenz • Periphere Neuropathie 	SCA1 SCA2 SCA3 SCA6 (teilweise) SCA10 SCA17
ADCA Typ II	Zerebelläre Ataxie mit retinaler Degeneration	SCA7
ADCA Typ III	„Reine“ zerebelläre Ataxie mit einem späten AAO und unverminderter Lebenserwartung	SCA5 SCA6 (teilweise)
ADCA Typ IV	Zerebelläre Ataxie mit Myoklonien und Taubheit	DRPLA

1.1.3 Epidemiologie

Die SCA3 ist der häufigste Subtyp der autosomal-dominant vererbaren SCAs (Bird 1998). Die höchsten relativen Häufigkeiten finden sich in Brasilien (Jardim, Silveira et al. 2001), Portugal (Vale et al. 2010) und Japan (Shibata-Hamaguchi et al. 2009). Auf den Azoren findet sich die höchste Prävalenz wieder (1:140 auf der Insel Flores) (Sequeiros, Martins und Silveira 2012; Morales Saute und Bannach Jardim 2015), was dem Gründereffekt (Sequeiros und Coutinho 1993), einer Form des *Gendrifts*, zugesprochen wird. Bei diesem wird davon ausgegangen, dass Mitglieder einer Siedlerpopulation durch Zufall mutierte oder seltene Allele häufiger als ihre Ursprungspopulation tragen und es somit zu einer Erhöhung der Allelfrequenz kommt (Kompaktlexikon der Biologie 2019). Die weltweite Verbreitung der Erkrankung wird auf den Gründereffekt, den imperialistischen Bestrebungen der Portugiesen und auf die Tatsache, dass es sich um eine spät ausbrechende dominant vererbare Erkrankung handelt, zurückgeführt (Gaspar et al. 2001).

1.1.4 Das *Ataxin-3-Gen*

Das *Ataxin-3-Gen* liegt auf dem Chromosom 14q32.1 (Kawaguchi et al. 1994; Takiyama et al. 1993) und hat eine Länge von 48.240 Basenpaaren, die auf elf Exons verteilt sind (Ichikawa et al. 2001). Es kodiert das Ataxin-3-Protein, das Polyubiquitine bindet und in verschiedene Proteolysewege involviert ist. Auf diese wird unter 1.1.6 näher eingegangen. Die pathogene Mutation liegt auf Exon 10 (Morales Saute und Bannach Jardim 2015) und besteht in einer erhöhten Anzahl von CAG-Wiederholungen, die wiederum zu einer Erhöhung der Glutamin-Anzahl des Ataxin-3-Proteins führt. In Gesunden beträgt die Anzahl dieser CAG-Wiederholungen zwischen 13 und 41 (Lima et al. 2005). Bei SCA3-Patienten hingegen zwischen 51 (Takiyama et al. 1997; Gu et al. 2004) und 87 Wiederholungen (Maciel et al. 2001). Liegt ein betroffenes, expandiertes Allel vor, bricht die Erkrankung mit einer 100%-igen Penetranz aus (Morales Saute und Bannach Jardim 2015). Der intermediäre Bereich von 44 bis 50 CAG-Wiederholungen ist mit einer inkompletten Penetranz assoziiert (Maciel et al. 2001; Padiath et al. 2005).

Die expandierten CAG-Wiederholungen gehen mit einer Instabilität bei der Mitose und der Meiose einher, was zu dem Effekt der Antizipation führt. Dieser tritt bei Polyglutaminerkrankungen häufig auf (Sasaki et al. 1995; Maciel et al. 1997). Diese Instabilität ist bei der väterlichen Meiose besonders ausgeprägt und führt zu einer Erhöhung der CAG-Wiederholungen in der Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*, DNA) des Spermiums. Da eine erhöhte CAG-Anzahl mit einem früheren AAO und einem schwereren Krankheitsverlauf korreliert (Maciel et al. 1995; Maruyama et al. 1995), kommt es so zu einer stärkeren und früheren Betroffenheit der nachfolgenden Generation (Lexikon der Biologie 2019). Hat eine männliche Person eine intermediäre Länge an CAG-Wiederholungen, kann im Rahmen der meiotischen Instabilität die Häufigkeit dieser in der Folgegeneration eine pathologische Expansion stattfinden und ein Erstauftreten der Erkrankung in der Familie möglich sein (Schols et al. 2004).

In diesem Zuge sind die drei bekannten intragenischen Polymorphismen des *Ataxin-3*-Gens von Interesse. Sie unterscheiden sich jeweils in einem Basenpaar. Der bei der Identifikation des Gens entdeckte Polymorphismus C⁹⁸⁷GG (Arginin, R)/G⁹⁸⁷GG (Glycin, G), der direkt am 3'-Ende der CAG-Wiederholungen liegt (Kawaguchi et al. 1994) und die beiden später publizierten Polymorphismen A⁶⁶⁹TG (Methionin, M)/G⁶⁶⁹TG (Valin, V) und TAA¹¹¹⁸ (Stopp-Codon, Stopp)/TAC¹¹¹⁸ (Tyrosin, Y) (Goto et al. 1997). Maciel et al. haben geprüft, ob diese Varianten zu einer erhöhten Instabilität der Vererbung der Anzahl an CAG-Wiederholungen beitragen. Keiner der Polymorphismen allein auf dem expandierten Allel hat einen signifikanten Effekt hierauf, jedoch wenn dieser auf dem Allel physiologischer CAG-Wiederholungen liegt. Beim Genotyp physiologisch (nor) G⁹⁸⁷/expandiert (exp) C⁹⁸⁷ liegt eine statistisch signifikante Instabilität vor. Beim Genotyp nor C¹¹¹⁸/ exp A¹¹¹⁸ eine Assoziation, die nicht signifikant ist. Die Autoren vermuten hier eine Interaktion zwischen *cis*- und *trans*-Allel, die sich vor allem bei maternaler Vererbung zeigt. Bei paternaler Vererbung hat der Haplotyp keine Auswirkung. Für den Polymorphismus an Position 669 gibt es keine statistisch relevanten Auswirkungen (Maciel et al. 1999). Der Haplotyp A⁶⁶⁹-C⁹⁸⁷-A¹¹¹⁸ ist der am häufigsten vorkommende Haplotyp des expandierten Allels aller SCA3-Familien, welches durch Gaspar et al. in einer weltweiten Studie

untersucht wurde (Gaspar et al. 2001). Die Autoren gehen davon aus, dass das Mutationsereignis dieses Haplotyps eng mit der Krankheitsentstehung der SCA3 verknüpft sein muss. In ihren Ergebnissen tritt neben diesem noch der Haplotyp G⁶⁶⁹-G⁹⁸⁷-C¹¹¹⁸ signifikant häufig bei Erkrankten (mit einem Maximum auf der azorischen Insel São Miguel) auf. Dieser ist ebenso der häufigste Haplotyp der gesunden Kontrollpersonen und kann nicht durch einfache Rekombination erklärt werden. Es muss von einem unabhängigen, zweiten Mutationsmechanismus ausgegangen werden. Dafür spricht auch, dass auf der azorischen Insel Flores vor allem der A⁶⁶⁹-C⁹⁸⁷-A¹¹¹⁸ Haplotyp auftritt. Die durch den Gründereffekt bedingte isolierte Selektion beider Mutationen auf den Inseln Flores und São Miguel, bei gleichzeitig gleich hohem Vorkommen der beiden Haplotypen auf dem portugiesischen Festland, erhärtet die These eines zweiten Mutationsereignisses. Von diesen beiden Haplotypen können durch Rekombination oder Punktmutation die deutlich seltener vorkommenden Haplotypen A⁶⁶⁹-G⁹⁸⁷-A¹¹¹⁸ und G⁶⁶⁹-G⁹⁸⁷-A¹¹¹⁸ abgeleitet werden (Gaspar et al. 2001). Eine Korrelation der verschiedenen Haplotypen mit der Anzahl der CAG-Wiederholungen liegt nicht vor, so dass zumindest, in Bezug auf die Instabilität der Vererbung der CAG-Wiederholungen, der Genotyp zur genetischen Beratung und Risikoabschätzung herangezogen werden kann (Maciel et al. 1999).

1.1.5 Die *Ataxin-3*-RNA

Die untranslatierte *messenger* RNA (mRNA) des expandierten *Ataxin-3*-Allels hat selbst einen toxischen Effekt auf das Neuron und führt zu Zellverlust und einer Funktionsstörung. Tsoi et al. konnten zeigen, dass die CAG-expandierte Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid*, RNA) ihren toxischen Effekt vor allem auf den Zellkern hat (Tsoi et al. 2011). Hierbei besteht ebenfalls eine positive Korrelation mit der Anzahl der CAG-Wiederholungen, wie Wang et al. in *Caenorhabditis elegans* mit einer verkürzten Lebensspanne und einer reduzierten Motorik darstellen konnten (Wang et al. 2011). Aus der *Ataxin-3*-mRNA können durch alternatives *Splicen* drei Isoformen des *Ataxin-3*-Proteins entstehen, die unterschiedliche biochemische Eigenschaften aufweisen (Weishaupl et al. 2019).

Eine weitere wichtige Rolle in der Pathogenese der SCA3 scheinen MikroRNAs zu spielen. Bilen et al. konnten 2006 zeigen, dass eine extrinsische Blockade der Prozessierung von MikroRNAs und der konsekutiven Konzentrationsabnahme zu einer Zunahme der Toxizität durch das expandierte Ataxin-3-Protein in *Drosophila* führte (Bilen et al. 2006).

Eine erhöhte Expression der MikroRNA-Spezies mir-9, mir-181a und mir-494 führt zu einer Reduktion der expandierten Ataxin-3-Protein-Level, der Aggreganzzahl und der neuronalen Dysfunktion. Ihre Fehlregulation scheint eine entscheidende Rolle in der Pathogenese zu spielen (Carmona et al. 2017).

1.1.6 Das Ataxin-3-Protein

Das Ataxin-3-Protein ist das translatierte Produkt des *Ataxin-3*-Gens mit einem molekularen Gewicht von 40 bis 43 kDa (Costa Mdo und Paulson 2012). Durch alternatives *Splicen* am C-Terminus entstehen zunächst zwei verschiedene Isoformen des Proteins, Ataxin-3a und Ataxin-3c. Aus dem Ataxin-3a-Protein werden durch den Polymorphismus an Aminosäure (AS) 1118 und dem resultierenden Stopp-Codon eine lange (Ataxin-3aL) und eine kurze Isoform (Ataxin-3S) gebildet. (Weishaupt et al. 2019; Bettencourt et al. 2013; Goto et al. 1997; Kawaguchi et al. 1994). Die am häufigsten vorkommende Isoform ist das Ataxin-3c-Protein. Es hat eine Länge von 361 Aminosäuren. Diese und die anderen beiden Isoformen setzen sich folgendermaßen zusammen: Am N-terminalen Ende findet sich die sogenannte Josephin-Domäne, die eine Deubiquitinase-Aktivität vorweist. Dieser Domäne folgen zwei Ubiquitin interagierende-Domänen (*ubiquitin interacting motif*, UIM), welche wiederum vor dem Polyglutamin (PolyQ)-Abschnitt des Proteins stehen. Beim Ataxin-3c-Protein befindet sich nach dem PolyQ-Abschnitt ein drittes UIM (Abbildung 1.1) (Burnett, Li und Pittman 2003; Harris et al. 2010).

Das Ataxin-3-Protein wird ubiquitär im Körper exprimiert. Dennoch kommt es im Falle der Mutation vor allem zu neurologischen Störungen, was bei anderen Polyglutaminerkrankungen ebenso der Fall ist (Cohen-Carmon und Meshorer 2012). Eine Erklärung hierfür kann in dem erhöhten Metabolismus von Nervenzellen liegen, der wiederum die Rolle der Mitochondrien in der Pathogenese der

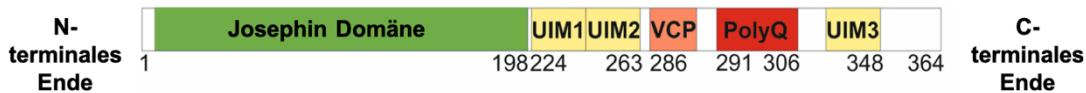


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des Aufbaus des Ataxin-3-Proteins

Am N-terminalen Ende befindet sich bis AS 198 die Josephin-Domäne, die eine Deubiquitinase-Aktivität aufweist. Nachfolgend kommen ab AS 224 bis AS 263 zwei UIMs, die freie Ubiquitine binden können. Ab AS 291 folgt die PolyQ-Domäne, die physiologisch zwischen 13 und 41 Glutaminen enthält. Bei der Isoform Ataxin-3c folgt der PolyQ-Domäne am C-terminalen Ende noch ein drittes UIM, das an AS 348 endet. Modifiziert nach Nguyen et al., 2013.

Erkrankung hervorhebt (Schon und Manfredi 2003). Im zentralen und peripheren Nervengewebe findet sich das Ataxin-3-Protein in seiner physiologischen Form vor allem im Zytoplasma wieder (Schmidt et al. 1998; Trottier et al. 1998). Wie bei den anderen Polyglutaminerkrankungen bilden die expandierten Proteine Aggregate, die sich in den Zellkernen und im Zytoplasma, befinden. Außerdem befinden sie sich in klinisch betroffenen und unbetroffenen Regionen des Nervensystems (Trottier et al. 1998; Paulson, Das et al. 1997; Paulson, Perez et al. 1997).

Aufgrund der UIMs und der Josephin-Domäne wird dem Ataxin-3-Protein eine modifizierende Rolle im Ubiquitin-Proteasom-Signalweg (UPS) zugesprochen, indem es ubiquitinierte Moleküle so anpasst, dass eine priorisierte Degradation dieser stattfindet (Wang, Ying und Wang 2012). Es sind diverse Signalwege mit Interaktionsmolekülen beschrieben, wie zum Beispiel der Schutz der proteasomalen Degradation von Beclin-1 durch die Deubiquitinase-Aktivität des Ataxin-3-Proteins (Ashkenazi et al. 2017) (1.1.6) oder die Deubiquitinierung (DUB) von Parkin (Durcan et al. 2011) (1.2.4) sowie des C-Terminus des Hsc70-interagierenden Proteins (CHIP), einem Hitzeschockprotein (Hsp) (Scaglione et al. 2011). Ein weiterer Hinweis der Involvierung des Ataxin-3-Proteins in das UPS ist das Vorhandensein von Ubiquitin, Hitzeschockproteinen und Proteasom-Untereinheiten in den Aggregaten (Chai et al. 1999).

Die Rolle des Ataxin-3-Proteins in zellulären Signalwegen

In den folgenden Abschnitten erfolgt nach der allgemeinen Einleitung ein fokussierter Blick auf die verschiedenen Signalwege, in denen das Ataxin-3-Protein involviert ist. Momentanes Forschungsziel vieler Arbeitsgruppen ist die

Entwicklung krankheitsmodifizierender Therapien, die in diese Signalwege eingreifen. Diese werden analog zum folgenden Aufbau unter 1.1.10 aufgezeigt.

Proteolytische Prozessierung

Wie für die Proteine anderer Polyglutaminerkrankungen gilt beim Ataxin-3-Protein die „*toxic fragment hypothesis*“ (Yoshizawa et al. 2000; Warrick et al. 1998). Diese beschreibt, dass Fragmente des Ataxin-3-Proteins, welche den PolyQ-Abschnitt enthalten, nochmals toxischer sind als das gesamte Protein (Ikeda et al. 1996). Diese Hypothese wird durch die früher einsetzende Apoptose *in vitro* und durch einen schweren verlaufenden Phänotyp im Mausmodell (Ikeda et al. 1996) gestützt. Die Toxizität resultiert aus einer erhöhten Tendenz der Fragmente zur intranukleären Aggregation und Akkumulation, ihrer Möglichkeit Aggregate mit Ataxin-3-Proteinen der Gesamtlänge zu bilden und einer Veränderung der Proteinfunktion selbst (Matos, Almeida und Nobrega 2017). Hieraus wird angenommen, dass die proteolytische Spaltung des Ataxin-3-Proteins ein früher, wenn nicht sogar der initiale Schritt der Pathogenese der Erkrankung ist (Weber et al. 2014). Die abgespaltenen Fragmente bilden selbst Aggregate, die anteilig das gesamte expandierte Protein enthalten können (Paulson, Perez et al. 1997; Haacke et al. 2006; Wellington et al. 1998). Gespalten wird das Ataxin-3-Protein durch die Caspasen 1 und 3 (Wellington et al. 1998), die ein Teil des Apoptose-Mechanismus der Zelle sind und die eine erhöhte Aktivität bei Vorliegen des expandierten Ataxin-3-Proteins vorweisen (Chou et al. 2006; Weber et al. 2014). Neben der Spaltung durch Caspasen wird das Ataxin-3-Protein Protein durch Calpaine prozessiert. Es wurden einige Calpain-Spaltungsstellen identifiziert (Hubener et al. 2013; Simoes et al. 2012; Weber et al. 2017). Bei Calpainen handelt es sich um Calcium-abhängige Cystein-Proteasen, die multiplen zellulären Regulationsprozessen angehören und ihre Substrate in ihrer Struktur, Lokalisation und Aktivität anpassen (Weber et al. 2014). Die Fragmente, die durch die Calpaine abgespalten werden, enthalten das C-terminale Ende mit dem PolyQ-Abschnitt (Haacke et al. 2006). In einem doppelten *Knockout* (KO)-Mausmodell wurde der endogene Calpain-Inhibitor Calpastatin (CAST) ausgeschaltet, was zu

einer höheren Ataxin-3-Protein-Fragmentierung und einem schwereren Phänotyp führte (Hubener et al. 2013).

Neben diesen beiden extrinsischen Fragmentierungen besteht noch die intrinsische autolytische Degradation des Ataxin-3-Proteins durch seine Josephin-Domäne (Mauri et al. 2006).

Proteinaggregation

Als Kennzeichen aller Polyglutaminerkrankungen kommt es auch bei der SCA3 zu einer Aggregation des expandierten Ataxin-3-Proteins (Paulson, Perez et al. 1997; Schmidt et al. 1998). Die Aggregation verläuft in mehreren Schritten. Zunächst schließen sich mehrere monomere Filamente zusammen, die sich in einem zweiten Schritt in oligomeren Strukturen und Fibrillen transformieren (Kodali und Wetzel 2007). Der erste Schritt erfolgt unabhängig von der Länge der PolyQ-Domäne, während der zweite Schritt mit der Bildung Amyloid-artiger Aggregate nur bei expandierter PolyQ-Länge erfolgt (Ellisdon, Thomas und Bottomley 2006). Im weiteren Verlauf nimmt die Größe der Aggregate weiter zu. Es sind jedoch die intermediären oligomeren Aggregate, die vermehrt bei Auftreten der ersten Symptome vorliegen, sodass ihnen eine höhere Toxizität zugesprochen wird (Bucciantini et al. 2002). Neben dem Ataxin-3-Protein liegen proteasomale Untereinheiten und Ubiquitin in den Aggregaten vor, sodass hieraus zusammen mit der Funktion des physiologischen Ataxin-3-Proteins im UPS auf eine Dysregulation dessen zu schließen ist (Weber et al. 2014). Ein weiteres in den Aggregaten eingeschlossenes Protein ist Ataxin-2 (Uchihara et al. 2001), welches bei SCA3 insgesamt in verminderter Konzentration vorliegt. Dies stellt einen relevanten Fakt für die Pathogenese dar, da eine Anhebung des Ataxin-2-Levels mit einer relevanten Verminderung des expandierten Ataxin-3-Proteins einhergeht (Nobrega et al. 2015).

Nukleärer Transport

Ataxin-3-Protein-Aggregate kommen sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern vor, wobei sich die Aggregate mit dem expandiertem Ataxin-3-Protein vermehrt im Zellkern befinden (Riess et al. 2008). Dort ist ihre Toxizität verstärkt,

möglicherweise da sie dort dem UPS entgehen und andere zelluläre Prozesse wie die Transkription stören (Bichelmeier et al. 2007). Aus diesem Grund ist der nukleäre Transport streng durch den Kernporenkomplex reguliert (Ribbeck und Gorlich 2002), der an Karyopherin gebundene Proteine erkennt und passieren lässt. Das Ataxin-3-Protein kann über seine Struktur seine Lokalisation in der Zelle regulieren, da es ein nukleäres Lokalisierungssignal (NLS) vor seiner PolyQ-Region hat (Aminosäure 282-285) (Tait et al. 1998; Macedo-Ribeiro et al. 2009). In der Josephin-Domäne befinden sich zwei nukleäre Exportsignale (NES) (Aminosäure 77-99 und Aminosäure 141-158) (Antony et al. 2009), sodass das Ataxin-3-Protein durch Karyopherin-Alpha-3 unter zellulären Stressbedingungen in den Zellkern transportiert werden kann (Reina, Zhong und Pittman 2010). Eine Runterregulierung von Karyopherin-Alpha-3 in SCA3-*Drosophila*- und SCA3-Mausmodellen führte zu einem abgeschwächten Phänotyp bei der Maus und einer Verminderung der Ataxin-3-Protein-induzierten Auffälligkeiten bei *Drosophila* (Sowa et al. 2018).

Zelluläre Proteolyse

Einer Zelle stehen zwei verschiedene Signalwege zu der Degradation und dem Abbau von Zellorganellen und Proteinen zur Verfügung: das UPS (Ciechanover 2006) und die über Lysosomen ablaufende Autophagozytose (Yorimitsu und Klionsky 2005).

Das UPS interagiert mit Chaperonen, die bei vermehrtem Zellstress hochreguliert werden. Sie versuchen fehlgefaltete Proteine zunächst wieder in ihre physiologische Form zurück zu falten und markieren diese, falls eine Rekonstitution nicht möglich ist, für eine Degradation durch das UPS (Kastle und Grune 2012).

Der Hauptanteil aller zellulären Proteine, die eine Fehlfaltung oder Beschädigung vorweisen, wird über das UPS abgebaut. Es ist somit an der Regulation des zellulären Proteinniveaus beteiligt. Es besteht eine indirekte Involvierung des Ataxin-3-Proteins in diesen Signalweg, da es Ubiquitin-markierte Proteine mittels seiner UIMs rekrutiert (Burnett, Li und Pittman 2003; Doss-Pepe et al. 2003; Chai et al. 2004).

Die E3-Ubiquitin-Ligasen CHIP und Parkin schützen Zellen physiologisch vor toxischem Stress. Hierbei nimmt CHIP, neben seiner Funktion als E3-Ubiquitin-Ligase, eine zentrale Rolle in der Überprüfung der korrekten Faltung von Proteinen ein (Rosser et al. 2007). Darüber hinaus hat es eine direkte Rolle in der Ubiquitinierung und Degradation der physiologischen und expandierten Form des Ataxin-3-Proteins (Jana et al. 2005; Todi et al. 2010), als erster beschriebener DUB-Partner des Ataxin-3-Proteins (Winborn et al. 2008). Anders als bei anderen DUB-Partnern reguliert das Ataxin-3-Protein nicht das Niveau von CHIP (Scaglione et al. 2011), sondern nimmt Einfluss auf seine E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität. Mit der E2-Ubiquitin-Konjugase Ube2W kann CHIP sich an Lys² monoubiquitinieren, was seine Ligaseaktivität und die Bindung zum Ataxin-3-Protein stärkt. Die DUB durch das Ataxin-3-Protein kann erst ab einer gewissen Polyubiquitinierung von CHIP und seines Substrates erfolgen. Es wird angenommen, dass die Trimmung der Polyubiquitinketten der Regulation einer effizienten Degradation dient. Durch die DUB inaktiviert das Ataxin-3-Protein CHIP, sodass dieses seine Kontrollfunktion der Proteinqualität nur noch mit verminderter Aktivität nachgehen kann. Dies gilt für das expandierte Ataxin-3-Protein in einem noch stärkeren Ausmaß (Scaglione et al. 2011). Die fehlgefalteten Proteine werden durch das Ataxin-3-Protein vermittelt in Fragmente zerteilt und ordnen sich in Aggresomen zusammen. In diesen haben sie einen geringeren toxischen Effekt auf die Zelle (Ouyang et al. 2012). Parkin als E3-Ubiquitin-Ligase wird sowohl vom physiologischen Ataxin-3-Protein und seiner expandierten Form deubiquitiniert. Bei Parkin ist bislang nur die Ubiquitinierung des fragmentierten expandierten Ataxin-3-Proteins beobachtet worden, die zu einer Förderung seines proteasomalen Abbaus geführt hat (Durcan et al. 2011; Tsai et al. 2003). Mit dem expandierten Ataxin-3-Protein und dem Proteasom bildet Parkin außerdem einen Komplex, der die Zytotoxizität durch die fehlende proteasomale Beteiligung an der Aggregatbildung verringert (Tsai et al. 2003).

Für die genaue molekulare Beschreibung der Interaktion von Parkin und dem Ataxin-3-Protein sowie ihrer regulatorischen Aspekte siehe 1.2.3.

Für CHIP und Parkin zeigen sich in SCA3-Mausmodellen verminderte Niveaus, die bei längerer PolyQ-Domäne noch ausgeprägter ausfallen. Aufgrund der

physiologischen neuroprotektiven Funktion der beiden Enzyme kann von einer Störung der physiologischen zellulären Homöostase und einer Förderung des Neuronenverlustes durch das expandierte Ataxin-3-Protein ausgegangen werden (Durcan und Fon 2013).

In der Regel wird das Ataxin-3-Protein selbst durch das UPS abgebaut (Todi et al. 2010). Da das katalytische Zentrum des Proteasoms nur Proteine einer bestimmten Größe prozessieren kann, sind vor allem die Größe, Fehlfaltung und Aggregation des expandierten Ataxin-3-Proteins ein Grund für seinen reduzierten Abbau durch das UPS (Verhoef et al. 2002).

Dieses Problem führt dazu, dass die expandierte Form des Ataxin-3-Proteins und seine Aggregate über den zweiten Signalweg, der Autophagozytose, prozessiert werden muss (Ravikumar, Duden und Rubinsztein 2002).

Die Autophagozytose spielt eine zentrale Rolle in allen Erkrankungen, die mit einer Neurodegeneration einhergehen (vor allem bei Polyglutaminerkrankungen; (Cortes und La Spada 2015)). Sie wird über verschiedene Moleküle und Signalwege reguliert. Zu degradierende Aggregate werden über einen p62-Rezeptor markiert (Pankiv et al. 2007). Die Regulation der Autophagozytose erfolgt beispielsweise über eine *Mechanistic Target of Rapamycin* (mTOR)-abhängige Inhibition, die bei Überaktivität mit einer zunehmenden zellulären Toxizität einhergeht (Menzies et al. 2010). Die Autophagozytose spielt also eine Rolle zur Verminderung des Zellschadens wie in einem SCA3-*Drosophila*-Modell durch ihre komplette Blockierung verdeutlicht werden konnte. Hier nahm die Degeneration der Augenzellen deutlich zu (Bilen und Bonini 2007). Eine andere Regulierung erfolgt über das Autophagozytose-Protein Beclin-1. Die expandierte PolyQ-Domäne blockiert die Interaktion, die Beclin-1 normalerweise mit dem physiologischen Ataxin-3-Protein hat. Dies hat einen Abfall des Beclin-1-Niveaus zur Folge und führt zu einer fehlregulierten Autophagozytose (Ashkenazi et al. 2017).

Mitochondriale Dysfunktion

Mitochondrien stellen durch oxidative Phosphorylierung der Zelle den Energieträger Adenosintriphosphat (ATP) bereit und regulieren den gesteuerten Zelltod, die Apoptose (Matos, de Almeida und Nobrega 2019). Störungen ihrer

Funktionen spielen in vielen neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, HD und auch in der SCA3 eine Rolle, deren genauer Umfang noch unbekannt ist (Weber et al. 2014). Für eine Beteiligung der Mitochondrien in der Pathogenese spricht der Gewichtsverlust und andere metabolische Störungen der SCA3-Patienten in der Frühphase ihrer Erkrankung. Je größer das Ausmaß der Glutaminexpansion, desto stärker fällt der Gewichtsverlust aus (Saute, Silva et al. 2012; Diallo et al. 2017). Sowohl das nicht expandierte als auch das expandierte Ataxin-3-Protein können sich in den Mitochondrien aufhalten (Pozzi et al. 2008). Eine fragmentierte Variante des Ataxin-3-Proteins stört ihre Dynamik, was zu einem Anstieg der Sauerstoffradikale führt (Hsu et al. 2017). Hier spielt auch eine verminderte Aktivität von antioxidativen Enzymen wie Katalasen, Glutathionreduktasen und Superoxiddismutasen (SOD) eine Rolle. Sie führt zu einer Schädigung und einem Verlust mitochondrialer DNA (mtDNA) (Yu et al. 2009; de Assis et al. 2017). Über die Interaktion des Ataxin-3-Proteins mit dem *Forkhead-Box*-Transkriptionsfaktor O (FOXO) FOXO4 wird die SOD2-Aktivität reguliert. Liegt eine expandierte PolyQ-Domäne vor, nimmt die Aktivierung von SOD2 ab, so dass eine adäquate Reaktion auf oxidativen Stress nicht mehr möglich ist (Araujo et al. 2011).

1.1.7 Klinik

Patienten der SCA3 haben insgesamt ein mittleres AAO von 34 bis 40 Jahren (Morales Saute und Bannach Jardim 2015) und unterliegen dem progressiven Verlauf der Erkrankung. Zuerst manifestiert sich eine Gangataxie, der Doppelbilder, Dysarthrie und ein spastisches Gangbild folgen können (Taroni und DiDonato 2004; Jardim, Pereira et al. 2001). Möglich ist auch eine ausgeprägte Parkinson-ähnliche Symptomatik, die in vielen Fällen ein gutes Ansprechen auf Levodopa hat (Subramony und Currier 1996). Gewöhnlich treten bei SCA3-Patienten auch Schlafstörungen, insbesondere das *Restless-Legs-Syndrom* (RLS), auf (Schols et al. 1998). Auch neuropsychiatrisch sind SCA3-Patienten durch kognitive Einbußen, depressive Verstimmungen und Persönlichkeitsveränderungen betroffen (Leroi et al. 2002; Klinka et al. 2010). SCA3-Patienten präsentieren ein buntes Bild an unspezifischen Symptomen, die zu einer ADCA Typ I der

Klassifikation nach Harding passt (Harding 1982). Die Phänotypen der einzelnen SCAs sind oft überlappend, sodass diese Einteilung lediglich als Hinweis für eine primäre Auswahl des verwendeten *Panels* einer genetischen Testung dient (Schols et al. 2004; Klebe 2012).

Die SCA3 selbst lässt sich ebenso in vier klinisch diverse Verlaufsformen einteilen, die zum ersten Mal durch Coutinho und Andrade beschrieben und durch Rosenberg ergänzt wurden. Typ 1 hat ein sehr frühes AAO (< 20 Jahre) mit einem sich schnell verschlechterndem Krankheitszustand. Dieser wird neben der Ataxie sowohl von pyramidalen Symptomen wie Spastik und extrapyramidalen Störungen wie Dystonien geprägt. Typ 2 entspricht der am häufigsten vorliegenden Form mit einem AAO von 20 bis 50 Jahren, der charakteristischerweise neben der zerebellären Ataxie eine externe Ophthalmoplegie und Pyramidenbahnzeichen zeigt. Ein spätes AAO von >50 Jahren kennzeichnet den Typ 3, bei dem zusätzlich eine periphere Neuropathie und Muskelatrophien vorliegen können. Parkinsonismus ist entscheidend für ein die Einteilung der SCA3 in ihren Typ 4, der am seltensten vorkommt (Rosenberg 1992; Coutinho und Andrade 1978) (Tabelle 1.2).

Tabelle 1.2: Überblick der vier unterschiedlichen Phänotypen der SCA3 (nach Coutinho und Andrade 1978; Rosenberg 1992)

Bezeichnung	AAO	Zusätzliche Symptome/Verlauf
Typ 1	< 20 Jahren	<ul style="list-style-type: none"> • Schneller Krankheitsprogress • Pyramidale Symptome (Spastik) • Extrapyramidale Symptome (Dystonie, kein Parkinsonismus)
Typ 2	Zwischen 20 und 50 Jahren	<ul style="list-style-type: none"> • Häufigste Form • externe Ophthalmoplegie • Spastik
Typ 3	> 50 Jahren	<ul style="list-style-type: none"> • Periphere Neuropathie • Muskelatrophien
Typ 4	Unabhängig	<ul style="list-style-type: none"> • Parkinsonismus, evtl. mit Symptomen der anderen Typen

Durch die Progredienz der Koordinationsstörung und Dysphagie ist die Lebenserwartung der SCA3-Patienten eingeschränkt und beträgt nach Diagnosestellung etwa 21 Jahre (Kieling et al. 2007). Die häufigste Todesursache ist eine aspirationsbedingte fulminante Pneumonie (Rub et al. 2013).

1.1.8 Diagnostik

Anamnese

Zunächst sollte die Möglichkeit einer hereditär bedingten Erkrankung evaluiert und andere Differentialdiagnosen, die möglicherweise kurativ therapiert werden können, ausgeschlossen werden. Ein Hauptaugenmerk soll neben der Symptomatik auf die Familienanamnese mit Stammbaumerhebung gelegt werden (van de Warrenburg et al. 2014).

Klinische Untersuchung

Wird eine Gangataxie mit Symptomen einer Beteiligung anderer neurologischer Systeme festgestellt, kann eine spinocerebelläre Ataxie vermutet werden. Zur Klassifikation der Krankheitsschwere wird in der ersten und in allen weiteren Untersuchungen ein Ataxie-spezifischer Score erhoben, wie beispielsweise die *Scale for the assessment and rating ataxia* (SARA) (Schmitz-Hubsch et al. 2006; Schmitz-Hubsch et al. 2010). Er beinhaltet das Testen von acht zerebellären Funktionen wie Gang, Stand, Sitzen, Sprachstörung, Fingerfolge, den Finger-Nase-Versuch, Diadochokinese und den Knie-Hacke-Versuch. Es können maximal 40 Punkte erreicht werden, was gleichbedeutend mit einer sehr schwer vorliegenden Ataxie ist (Schmitz-Hubsch et al. 2006; Prabhu 2015). Daneben gibt es noch die *International Cooperative Ataxia Rating Scale* (ICARS) (Trouillas et al. 1997), den *Neurological Examination Score for SCA* (NESSCA) (Kieling et al. 2008) und die *Inventory of Non-Ataxia Symptoms* (INAS) (Schmitz-Hubsch et al. 2008). Der SARA-Score gilt als die geeignetste diagnostische Skala und wird meist in Kombination mit der NESSCA oder dem INAS zur Erfassung nicht ataktischer Symptome verwendet (Saute, Donis et al. 2012).

Bildgebende Diagnostik

Um die je nach Symptomatik möglichen Differentialdiagnosen (wie ein neuro-vasculäres Ereignis, multiple Sklerose oder einen malignen Prozess) auszuschließen, sollte bei der Erstvorstellung eine magnetresonanztomographische Untersuchung des Gehirns veranlasst werden. Das Magnetresonanztomogramm (MRT) kann nicht direkt zu der Diagnose SCA3 beitragen, da erste Veränderungen oft erst Jahre nach Auftreten der Symptome vorliegen. Es kann jedoch hilfreich sein (Schols et al. 2004). Im weiteren Krankheitsverlauf zeigen sich eine milde olivopontozerebelläre Atrophie, eine Atrophie des oberen Rückenmarks und eine Erweiterung des vierten Ventrikels. In volumetrischen Studien konnte eine Atrophie des *Putamen* und *Nucleus (Ncl.) caudatus* gezeigt werden. Anders als der Krankheitsverlauf korreliert die Anzahl der CAG-Wiederholungen nicht mit der Schwere der Atrophie (Klockgether et al. 1998; Rub, Brunt und Deller 2008; Schols et al. 1997).

In funktionellen bildgebenden Analysen wie der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) zeigt sich bei SCA3-Patienten ein verminderter Glukoseverbrauch im Kleinhirn, Hirnstamm und im Okzipitalkortex. Dieser tritt bereits bei asymptomatischen Mutationsträgern im Gegensatz zu gesunden Kontrollen auf. Auffallend bei den asymptomatischen Genträgern ist ein erhöhter Glukosestoffwechsel im Temporal- sowie Parietalkortex, der möglicherweise einen Kompensationsmechanismus darstellt, da dieser bei den SCA3-Patienten nicht mehr zu detektieren ist (Soong und Liu 1998).

Neuropathologische Untersuchung

Es gibt wenige neuropathologische Untersuchungen von SCA3-Patienten. Die meisten erfolgten nach deren Exitus als Autopsie und somit in einem sehr fortgeschrittenem Krankheitsstadium (Schols et al. 2004). Besonders schwer von einer Atrophie sind der *Ncl. Dentatus* des Kleinhirns, die *Substantia Nigra*, die Vorderhörner des Rückenmarks und der Hirnstamm betroffen (Durr et al. 1996; Rub, Brunt und Deller 2008). Der Kleinhirnkortex ist in der Regel gut erhalten (Yamada et al. 2008; Durr et al. 1996), wohingegen die Purkinje-Zellen und Körnerzellen des Kleinhirnwurms stark vermindert sind (Munoz et al. 2002).

Wie für Polyglutaminerkrankungen typisch zeigen sich auch in den Neuronen der SCA3-Patienten intraneuronale Aggregate, die das expandierte Ataxin-3-Protein zusammen mit weiteren Proteinen (1.1.6) enthalten. Diese finden sich fast im gesamten Nervengewebe wieder, sodass auch neurologische Systeme, die klinisch nicht betroffen sind, diese vorweisen (Paulson, Perez et al. 1997; Schmidt et al. 1998). Sie finden sich im Zytoplasma, im Zellkern und in den Axonen wieder (Seidel et al. 2010; Hayashi, Kobayashi und Furuta 2003). Die Rolle der Aggregate in der Pathologie der Erkrankung ist noch unklar (Matos, de Almeida und Nobrega 2019).

Genetische Testung

Goldstandard der Diagnostik der SCA3 ist die molekulargenetische Bestimmung der Anzahl der CAG-Wiederholungen auf dem *Ataxin-3*-Gen. Liegt auf mindestens einem Allel eine Wiederholungsanzahl von 51 vor (Takiyama et al. 1997; Gu et al. 2004) und einer Penetranz von 100% (Morales Saute und Bannach Jardim 2015), ist die Diagnose gesichert. Ist eine SCA3 familiär nicht vorbekannt, soll vor dem Hintergrund der ethnischen Herkunft und der präsentierten klinischen Symptome ein *Panel* mit den häufigsten Ataxie-Genen zur Abklärung genutzt werden (Sequeiros, Seneca und Martindale 2010). Zusammen mit dieser Diagnostik muss dringend eine genetische Beratung zu der Erkrankung selbst und der Wahrscheinlichkeit der Vererbung an Nachkommen von 50% erfolgen (Schuler-Faccini et al. 2014).

1.1.9 Therapie

Kausale Therapien

Nach dem Entdecken der genetischen Ursache der SCA3 im Jahr 1993 liefen 1995 zeitlich bereits zwei randomisierte-klinische Studien (*randomized clinical trial*, RCT) mit dem Wirkstoff Sulfamethoxazol-Trimethoprim (SMT-TMP), die einen positiven Effekt auf die Erkrankung nach einer Therapiedauer von vier Wochen aufwiesen (Correia et al. 1995; Sakai et al. 1995). Den Therapieerfolg machten sie bei noch fehlenden klinischen Skalen zur Ermittlung der Schwere der Ataxie allerdings nur nach subjektivem Empfinden aus, sodass diese

Therapie nach einer Folgestudie wieder verlassen wurde (Schulte et al. 2001). Seither konnte keine krankheitsmodifizierende Therapie etabliert werden (Morales Saute und Bannach Jardim 2015).

Mögliche Therapieansätze, die momentaner Stand der Forschung sind, werden unter 1.1.10 nach dem molekularen Signalweg, in den eingegriffen werden soll, erläutert.

Symptomatische Therapien

Da es bislang nicht möglich ist in den Krankheitsverlauf einzugreifen, diesen zu verlangsamen, zu stoppen oder gar eine Rekonvaleszenz zu erreichen, steht Patienten mit einer SCA3 bislang nur eine Reihe an symptomatischen Therapiemöglichkeiten zur Verfügung.

Für die pathognomonische Ataxie der Erkrankung ist keine medikamentöse Therapie etabliert, auch wenn mit Riluzol behandelte Probanden in einer ersten RCT eine signifikante Verbesserung um fünf Punkte auf der ICARS im Vergleich zur Placebo-Gruppe zeigten (Ristori et al. 2010). Die Standardtherapie der Ataxie ist die physiotherapeutische Beübung der SCA3-Patienten, zu der die Studienlage gering ausfällt. Kurzzeitstudien über fünf Wochen zeigten Verbesserungen des SARA-Scores (Morales Saute und Bannach Jardim 2015).

Gute Ergebnisse für einen Rückgang der Spastik zeigen Physiotherapie und Botulinum-Injektionen (Freeman und Wszolek 2005). Liegt ein Parkinsonismus oder ein RLS bei den SCA3-Patienten vor, kann ein Therapieversuch mit L-Dopa unternommen werden. Dafür ist ein gutes Ansprechen beschrieben worden (Subramony und Currier 1996; Morales Saute und Bannach Jardim 2015). Bei Schluck- und Sprachstörungen wird von einer logopädischen Betreuung positiv berichtet. Außerdem soll bei einer ausgeprägten Schluckstörung über die Anlage einer Magensonde über eine perkutane endoskopische Gastrostomie zum Aspirationsschutz nachgedacht werden (Morales Saute und Bannach Jardim 2015). Treten krankheitsbegleitende Depressionen auf, können diese gut mit Antidepressiva der verschiedenen Wirkstoffklassen behandelt werden. Morales Saute und Bannach Jardim berichten außerdem von einem positiven Effekt auf die Lebensqualität und Einstellung der SCA3-Patienten zu ihrer Erkrankung durch eine

zweimal im Monat stattfindende Teilnahme an einer Gesprächsgruppentherapie (Morales Saute und Bannach Jardim 2015).

1.1.10 Neue mögliche therapeutische Ansätze

Mutierte *Ataxin-3*-RNA

In Abschnitt 1.1.5 wurde unter anderem die Toxizität der untranslatierten RNA-Transkripte des expandierten *Ataxin-3*-Allels beschrieben. Dieser Effekt konnte durch Li et al. abgemildert werden, indem sie die CAG-Wiederholungen durch ein CAA-Triplet unterbrachen (Li et al. 2008). Alves demonstrierte 2008 eine Allel-spezifische Stummschaltung der expandierten *Ataxin-3*-RNA mittels *short hairpin* RNA (shRNA), indem er seinen Vektor gezielt auf den Polymorphismus G⁹⁸⁷GG/C⁹⁸⁷GG (Maciel et al. 1999) anpasste. Dies führte zu einer signifikanten Reduktion der neuropathologischen Auffälligkeiten und zu einer verminderten Expression des Ataxin-3-Proteins im *Striatum* der Ratte (Alves, Nascimento-Ferreira et al. 2008; Alves, Regulier et al. 2008). 2013 konnte dieses Ergebnis in einem SCA3-Mausmodell mit ausgeprägtem Phänotyp bestätigt werden. Der Einbau der shRNA führte hier zu einer Verbesserung des Phänotyps (Nobrega et al. 2013).

Ein anderer therapeutischer Ansatz ist die Verwendung von Allel-spezifischen Oligonukleotiden (ASO), mit welchen ein Exon-*Skipping* durchgeführt wird. Evers et al. konnten auf diese Weise die PolyQ-Domäne bei der Translation ausschalten. Die physiologische Funktion des translatierten Ataxin-3-Proteins ist laut dieser Studie nicht beeinträchtigt und es zeigt keinerlei Toxizität (Evers et al. 2013). Dieses Ergebnis konnte durch Toonen et al. in einem SCA3-YAC-Mausmodell, das ein komplettes humanes *Ataxin-3*-Gen enthielt, durch verringertes Vorkommen von löslichem Ataxin-3-Protein und verminderter Anzahl von Aggregaten bestätigt werden (Toonen et al. 2017).

Auch die veränderte Regulation der MikroRNA bietet Möglichkeiten einer therapeutischen Intervention. Beispielsweise konnte der protektive Effekt der MikroRNA durch ihre Hochregulierung in der Zellkultur, einem SCA3-*Drosophila*- und einem SCA3-Mausmodell demonstriert werden (Bilen et al. 2006; Huang et al. 2014; Carmona et al. 2017).

Proteolytische Spaltung

Das Ataxin-3-Protein wird durch Caspasen und Calpaine in toxische Fragmente gespalten, die selbst Aggregate bilden (Haacke et al. 2006). Diesem frühen Zeitpunkt der Pathogenese konnte in Modellen bereits erfolgreich modulierend entgegen gewirkt werden. Als Angriffspunkt bei der Ataxin-3-Protein-Spaltung durch Caspase-1 und Caspase-3 konnten *in vitro* Caspase-Inhibitoren erfolgreich zur Verhinderung einer Aggregat-Bildung eingesetzt werden (Berke et al. 2004).

In induzierten pluripotenten Stammzellen (IPS) konnte unter exzitotoxischen Bedingungen eine Verringerung der Aggregatzahl durch Hemmung der Calpainaktivität, nicht aber durch spezifische Caspase-1-, Caspase-3- oder Pancaspaseinhibitoren, erzielt werden (Koch et al. 2011). In einer aktuelleren Studie von Hansen et al. konnte dieser Effekt nicht bestätigt werden. Die Autoren verwendeten ein anderes Protokoll zur neuronalen Differenzierung der Stammzellen. Dies führte vermutlich zu einer anderen Population an Nervenzellen, die anders auf die induzierte Exzitotoxizität reagierte (Hansen et al. 2016).

Ebenso zeigen Zell- und Tiermodelle, dass eine Inhibition von Calpainen zu einer verminderten Anzahl intranukleärer Einschlüsse und einem milderem Phänotyp führen. Um Nebenwirkungen durch eine extrinsisch zugeführte Substanz zu vermindern, ist bei den Calpainen die endogene Induktion von CAST ein interessanter therapeutischer Ansatzpunkt (Haacke, Hartl und Breuer 2007).

Methodisch völlig anders gehen Toonen et al. vor, die ASOs für ein Exon-Skip-ping nutzen, bei dem einige Calpain-Spaltungsstellen des Proteins entfernt werden. In diesem Protein kann keine Zytotoxizität mehr festgestellt werden (Toonen et al. 2016).

Proteinaggregation

Aufgrund der angenommenen Toxizität der Ataxin-3-Protein-Aggregate ist ein weiterer therapeutischer Ansatz in die Bildung dieser einzugreifen beziehungsweise (bzw.) die Zahl der bereits gebildeten Aggregate zu verringern (Weber et al. 2014). Wie unter 1.1.6 beschrieben, erfolgt die Bildung der Aggregate in mehreren Schritten (Ellisdon, Thomas und Bottomley 2006), sodass eine Möglichkeit

darin besteht, die Gesamtrate der Aggregation zu erhöhen. Den toxischen intermediären oligomeren Aggregaten bleibt so weniger Zeit die Neurone zu schädigen.

In diversen Modellen wurden chemische und natürliche Substanzen zur Blockierung der Aggregation und somit verminderter Toxizität getestet. Beispielsweise kann eine Behandlung mit Epigallocatechin-3-gallate und Tetrazyklin im Zell- und *C. elegans*-Modell eine Reduktion der gebildeten Ataxin-3-Protein-Aggregate herbeiführen (Bonanomi et al. 2014).

Auch molekulare Strukturen wie Chaperone können die Proteinaggregation reduzieren. Yoshida et al. demonstrierten dies in einem Zellkulturmodell bei Nutzung von exogen zugeführten Chaperonen (Yoshida et al. 2002). Bisher sind die wenigsten dieser Substanzen bzw. Strukturen in Säugermodellen getestet worden, sodass diese vor klinischen Studien in solchen etabliert werden müssen (Matos, de Almeida und Nobrega 2019).

Zelluläre Proteolyse

Durch die in 1.1.6 beschriebene Involvierung des Ataxin-3-Proteins in das UPS als Polyubiquitin-bindendes Protein (Burnett, Li und Pittman 2003) und seiner UPS-Degradation (Todi et al. 2007), sind in Studien einige Strategien zur Regulierung dieses Signalweges untersucht worden. Hierbei ist die Rolle von CHIP von besonderem Interesse. So zeigten Jana et al. in der Zellkultur, dass die Überexpression von CHIP mit einer erhöhten Ubiquitinierung und Degradation von expandiertem Ataxin-3-Protein und folglich Rückgang des Zelltodes einherging (Jana et al. 2005). Dies konnte durch Williams et al. in einem SCA3-Mausmodell durch einen schnelleren Krankheitsfortschritt bei Runterregulierung von CHIP invers bestätigt werden (Williams et al. 2009).

Ein weiterer Ansatzpunkt in den molekularen Weg des proteolytischen Abbaus einzugreifen, ist die Regulierung der Chaperone durch Histon-Deacetylase (HDAC)-Inhibitoren. Hier konnten Studien mit Einsatz von Valproat und Natriumbutyrat eine deutliche Verringerung der Toxizität, eine Verbesserung des Phänotyps und ein längeres Überleben in SCA3-*Drosophila*- und SCA3-Mausmodellen aufzeigen (Yi et al. 2013; Chou et al. 2011).

Auch die Autophagozytose dient als therapeutischer Ansatzpunkt, werden doch das expandierte Ataxin-3-Protein und die Aggregate vor allem über diesen Weg abgebaut (Ravikumar, Duden und Rubinsztein 2002). Durch Rapamycin, einem mTOR-Inhibitor, konnten Menzies et al. die Autophagozytose in ihrem SCA3-Mausmodell hochregulieren, wobei sich die Zahl der Aggregate erfolgreich verringerte (Menzies et al. 2010). Eine weitere Substanz, die die Autophagozytose hochreguliert, ist Lithium. Unter seiner Anwendung konnte ebenfalls in SCA3-*Drosophila*-Modellen eine Reduktion von Aggregaten beobachtet werden (Jia et al. 2013). Einen anderen methodischen Ansatz verfolgten Nascimento-Ferreira et al., indem sie Beclin-1 in ihrem SCA3-Rattenmodell überexprimierten. Sie beobachteten eine Abnahme des löslichen expandierten Ataxin-3-Proteins und eine Verbesserung des Phänotyps (Nascimento-Ferreira et al. 2011). In präsymptomatischen SCA3-Mausmodellen hat die Hochregulierung einen präventiven Effekt auf die Ausbildung ataktischer Symptome (Nascimento-Ferreira et al. 2013).

1.2 Die Rolle von Parkin in der SCA3

1.2.1 Das *Park2*-Gen

Das *Park2*-Gen befindet sich auf Chromosom 6q25.2-q27 und umfasst 1 380 kp und zwölf Exons (Kitada et al. 1998; Asakawa et al. 2001). Es kodiert die E3-Ubiquitin-Ligase Parkin, der als Bestandteil des UPS ein neuroprotektiver Effekt zugesprochen wird (Shimura et al. 2000).

In dem Gen sind über 100 Mutationen bekannt (Hedrich et al. 2004), die die Entstehung einer autosomal-rezessiven Form eines juvenilen Parkinson-Syndroms begünstigen (Khandelwal und Moussa 2010). Dieses ist durch einen Krankheitsbeginn zwischen dem zwanzigsten und vierzigsten Lebensalter gekennzeichnet (Biskup et al. 2008) und zeigt klinisch einen Parkinson-Phänotyp mit vermehrten Dyskinesien (Kitada et al. 1998). Mutationen im *Park2*-Gen sind für den Ausbruch von etwa 50% der juvenilen Parkinson-Syndrome verantwortlich (Klein, Schneider und Lang 2009).

1.2.2 Das Parkin-Protein

Parkin wird durch *Park2* kodiert und ist eine E3-Ubiquitin-Ligase, die über das UPS abzubauen Proteine mittels Ubiquitin markiert (Shimura et al. 2000). Es besteht aus 465 Aminosäuren (Huynh et al. 2000) und wird ubiquitär exprimiert, wobei sich besonders hohe Expressionsraten in neuronalen Geweben und Muskulatur (Herz- und Skelettmuskulatur) zeigen (Kitada et al. 1998; Biskup et al. 2008). Parkin umfasst am N-terminalen Ende eine Ubiquitin-*like* (Ubl)-Domäne, eine nachfolgende Linker-Domäne und zwei C-terminale RING-Finger Domänen, die durch eine *In-between*-RING (IBR)-Domäne überbrückt werden. Die RING1-IBR-RING2-Domäne wird auch als RING-Box bezeichnet (Beasley, Hristova und Shaw 2007) (Abbildung 1.2).



Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Aufbaus des Parkin-Proteins

Am N-terminalen Ende findet sich von AS 3 bis 71 eine Ubl-Domäne, die Interaktionen mit Ubiquitin-Molekülen durchführen kann. Ihr folgt direkt eine Linker-Domäne. Am C-terminalen Ende findet sich eine RING-Box, die den Aufbau RING1-IBR-RING2 aufweist. Modifiziert nach Fr. Dr. rer. nat. Hübener-Schmid (unveröffentlicht).

Die RING2-Domäne ist ausschlaggebend für die E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität und stellt auch das katalytische Zentrum der durch Parkin vorgenommenen Monoubiquitinierungen dar (Matsuda et al. 2006). Die IBR-Domäne verstärkt die Bindung zu E2-Ubiquitin-Konjugasen wie UbcH7 und UbcH8 im Rahmen der Ubiquitinierung eines Proteins und nimmt typischerweise Lys48-verlinkte Polyubiquitinierungen vor (Beasley, Hristova und Shaw 2007). Der Ablauf einer Ubiquitinierung ist unter 1.2.3 erläutert.

Durch die Fähigkeit sich selbst zu ubiquitinieren, kann Parkin seinen Abbau durch das Proteasom selbst steuern (Zhang et al. 2000).

Indem Parkin das Chaperon Hsp70 monoubiquitiniert und hierdurch einen Komplex zusammen mit diesem und dem Proteasom bildet, spielt es eine wichtige Rolle im Abbau von fehlgefalteten, aggregierten und PolyQ-expandierten Proteinen. Dies spielt in der Pathogenese der sporadischen Form des Morbus Parkinson und einer autosomal-dominant vererbten Variante

eine Rolle (Lees, Hardy und Revesz 2009; Moore et al. 2008). Die Interaktion von Parkin als E3-Ubiquitin-Ligase führt zu multiplen zellulären Regulierungsfunktionen durch die Ubiquitinierung seiner Substrate, von denen exemplarisch einige dargelegt werden. In der Pathogenese des Morbus Parkinson ist die Abnahme der Parkin-Protein-Level mit einer Vielzahl von pathologisch veränderten Zellfunktionen verbunden. So werden fehlgefaltete Dopaminrezeptoren durch Parkin ubiquitiniert und konsekutiv vermehrt abgebaut, was sich in einer effektiveren Dopaminaufnahme widerschlägt (Jiang, Jiang und Feng 2004). Indirekte Effekte auf den Dopaminspiegel ergeben sich durch die Polyubiquitinierung und dem daraus folgenden Abbau von *cell division control related protein* (CDCrel)-1 und -2a (Zhang et al. 2000). Diese hemmen bei niedrigen Parkin-Protein-Leveln über eine Interaktion mit Syntaxin die Exozytose der Neurotransmittervesikel an der präsynaptischen Membran. Dies trägt zu einem relativen Dopaminmangel im *Striatum* und neuronalen Zellverlust bei (Beites et al. 1999; Dong et al. 2003). Für die Pathogenese des autosomal-rezessiven juvenilen Parkinsonsyndroms ist die Monoubiquitinierung der C-Kinase 1 (PICK-1) relevant, die als präsynaptisches Protein mit verschiedenen Ionen-Kanälen und Rezeptoren interagiert. PICK-1 wirkt auf die exzitatorische Aktivität der 2a-Untereinheit des *acid-sensing ion channel* (ASIC) hemmend, was sich durch die Monoubiquitinierung durch Parkin verstärkt. Im Parkin-KO-Mausmodell konnten Joch et al. eine Zunahme der ASIC-Aktivität im Sinne einer erhöhten Exzitotoxizität feststellen, die für den neuronalen Zelluntergang eine Rolle spielt (Joch et al. 2007).

Eine Schlüsselrolle von Parkin ist eine protektive Wirkung auf funktionale und ein regulatorischer bzw. abbauender Effekt auf dysfunktionale Mitochondrien (Narendra et al. 2008). Parkin interagiert mit mtDNA und es konnten bei Überexpression von Parkin positive Effekte auf die Replikation und Transkription dieser gezeigt werden (Kuroda et al. 2006). Parkin ubiquitiniert selektiv Mitofusin-1 und -2 dysfunktionaler Mitochondrien, die an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert sind. Dies führt zu einem Abbau der Mitochondrien über das UPS (Tanaka et al. 2010). Narendra et al. zeigten außerdem, dass Parkin bei Verlust des Membranpotenzials der Mitochondrien in diese rekrutiert wird und eine autophagosomale Degradation, Mitophagie, initiiert (Narendra et al. 2008). Dies

passiert zusammen mit der Parkinson-relevanten PTEN-induzierten putativen Kinase 1 (PINK1), die an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist und bei Abfall des Membranpotenzials die Translokation von Parkin einleitet (Greene et al. 2012). Die Mitophagie wird über Zusammenlagerung der Mitochondrien, die durch die von Parkin gebildeten Polyubiquitin-Ketten bedingt ist, ausgelöst (Geisler et al. 2010).

1.2.3 Die Interaktion des Ataxin-3-Proteins und Parkin

Das Ataxin-3-Protein und Parkin interagieren im Rahmen des UPS, bei dem Parkin als E3-Ubiquitin-Ligase die Zelle vor proteotoxischem Stress schützt.

Parkin geht einen Komplex mit Hsp70 und dem Proteasom ein und degradiert auf diese Weise expandierte Polyglutaminproteine. Tsai et al. zeigten dies für ein 149 Aminosäuren umfassendes Ataxin-3-Protein-Fragment mit 79 Glutaminen, das durch Parkin ubiquitiniert und in einem weiteren Schritt abgebaut wurde (Tsai et al. 2003).

Für die Ubiquitinierung eines Proteins ist die reibungslose Interaktion aller beteiligten Enzyme von Bedeutung. Zunächst wird das Ubiquitin über ein E1-Ubiquitin-Ligase Enzym aktiviert, anschließend über eine E2-Ubiquitin-Konjugase modifiziert und auf diese aufgeladen. Abschließend erfolgt der Transfer des Ubiquitin-Moleküls auf eine E3-Ubiquitin-Ligase, die das Molekül an exponierte Lysin-Enden des zu markierenden Proteins bindet (Hershko und Ciechanover 1998) (Abbildung 1.3a).

Das Ubiquitin hat freie Lysinenden, die so modifiziert werden können, dass ein weiteres Ubiquitin binden kann. Es kommt zur Ausbildung von Polyubiquitinketten. Lys⁴⁸-verlinkte Ketten werden normalerweise über das UPS degradiert, Verlinkungen über Lys²⁷, Lys²⁹ und Lys⁶³ über lysosomale Abbauprozesse oder Autophagozytose (Durcan et al. 2011). Regulierend zu den Ubiquitinierungen von Proteinen gibt es eine Reihe von Deubiquitinasen, die in den meisten Fällen für ein regulatorisches Gleichgewicht sorgen, indem sie die Selbstubiquitinierung ihres Partnerenzymen antagonisieren und dieses vor seiner proteasomalen Degradation schützen (Nijman et al. 2005).

Durcan und Fon zeigten in diesem Signalweg eine Interaktion von Parkin, als E3-Ubiquitin-Ligase und das Ataxin-3-Protein auf drei verschiedenen Ebenen. Zunächst beobachteten sie eine Bindung zwischen der Ubl-Domäne von Parkin und den UIMs des Ataxin-3-Proteins, die verstärkt wird, wenn Parkin sich selbst ubiquitiniert (Matsuda et al. 2006). Auf diese Weise können die UIMs mit den an Parkin konjugierten Polyubiquitinketten wechselwirken (Durcan et al. 2011). Eine zweite Bindungsstelle besteht zwischen der IBR-RING2-Domäne und der Josephin-Domäne. Bai et al. konzentrierten sich in ihrer Studie auf die Bindungen der UIMs zu der Ubl-Domäne von Parkin und spezifizierten diese. Sie konnten zeigen, dass, im Vergleich zu anderen Substraten von Parkin wie Eps15 oder S5a (Safadi und Shaw 2010), alle UIMs des Ataxin-3-Proteins eine spezifische gleichstarke Bindung mit der Ubl-Domäne eingehen (Bai et al. 2013). Hierbei handelt es sich um eine polyvalente Ligandenbindung an einer Bindungsstelle im Sinne einer kooperativen Bindung, die von einer hohen Wechselrate und hoher Affinität der Einheiten zur Bindungsstelle charakterisiert ist (Kießling, Gestwicki und Strong 2000). Die von Tsai beobachtete Ubiquitinierung des Ataxin-3-Proteins durch Parkin konnte durch Durcan et al. nicht nachgewiesen werden (Tsai et al. 2003; Durcan et al. 2011).

Stattdessen identifizierten sie das Ataxin-3-Protein als erste Deubiquitinase von Parkin. In der expandierten Form führt es diese Funktion noch effektiver durch (Durcan et al. 2011). Die Autoren vermuten eine höhere Affinität der expandierten Form zu den Lys27- und Lys29-verlinkten Ubiquitinen an Parkin. Damit verbunden wiesen sie *in vitro* und *in vivo* erniedrigte Parkin-Protein-Level nach. Sie konnten zeigen, dass die DUB-Aktivität des Ataxin-3-Proteins spezifisch für Parkin besteht und dass nicht das UPS die Degradation von Parkin vornimmt. Es wird durch Autophagozytose abgebaut (Durcan und Fon 2011). Normalerweise werden die E3-Ubiquitin-Ligase-Enzym-Level durch ihre Deubiquitinasen stabilisiert. Dies gilt nicht für das expandierte Ataxin-3-Protein (Murray, Jolly und Wood 2004).

2013 identifizierten Durcan et al. eine mögliche Erklärung für diese Form der Interaktion. Die konventionelle chemische Reaktion einer DUB besteht in der Hydrolyse der Ubiquitin-Bindungen, wozu das expandierte Ataxin-3-Protein nicht in

der Lage ist. Sie konnten zeigen, dass feste bestehende Ubiquitin-Bindungen von Parkin nicht mehr durch das Ataxin-3-Protein gelöst werden können. In Anwesenheit des Ataxin-3-Proteins kann Parkin sich, wenn auch in reduziertem Ausmaß, selbst ubiquitinieren. Dies führte zu der Vermutung, dass keine direkte Interaktion von Parkin und dem Ataxin-3-Protein besteht, sondern die DUB über einen anderen Interaktionspartner vermittelt wird. Die DUB von Parkin muss an dessen aktive Ubiquitinierung gekoppelt sein, da vorher bestehende Bindungen durch das Ataxin-3-Protein nicht gelöst werden können. Diese Thesen konnten Durcan et al. bestätigen, indem sie zeigten, dass das Ataxin-3-Protein mit seinem aktiven Zentrum an die E2-Ubiquitin-Konjugase bindet. Hierdurch wird die Bindung zwischen Parkin und dieser verstärkt. Durch die stabilisierte Bindung von Parkin und der E2-Ubiquitin-Konjugase wird der Transfer des modifizierten Ubiquitins erschwert und auf das Ataxin-3-Protein umgeleitet, sodass monoubiquitinierte Ataxin-3-Protein-Moleküle vorliegen (Abbildung 1.3b). Dieser Prozess ist nach einer gewissen Zeit gesättigt, sodass die Parkinubiquitinierung im Verlauf wieder zunimmt. Da die Selbstubiquitinierung von Parkin im Rahmen seiner Interaktion mit den Mitochondrien und deren Mitophagie steht (Narendra et al. 2008), erscheint die DUB durch das Ataxin-3-Protein als regulatorischer Schritt um einen voreiligen toxischen Zellschaden zu verhindern. Durcan et al. vermuten, dass das verlängerte PolyQ der Möglichkeit der Parkin-Regulation entgegenwirkt und es zu einer Störung der Interaktion von Parkin und den Mitochondrien kommt. Diese mögliche Ursache für einen neuronalen Zelluntergang kann einen therapeutischen Ansatz ergeben (Durcan et al. 2012).

1.2.4 Die Rolle der *Park2*-Polymorphismen in der Interaktion von Parkin und dem Ataxin-3-Protein

Neben den vielen krankheitsauslösenden Mutationen im *Park2*-Gen gibt es Polymorphismen, die als nicht pathogen, aber eventuell krankheitsmodulierend angesehen werden.

Dies wurde für drei Polymorphismen, die Teil der Analysen dieser Promotion sind, in der Diplomarbeit von Herrn Dr. rer. nat. Weber (Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik, Universität Tübingen) untersucht. Dabei

Einleitung

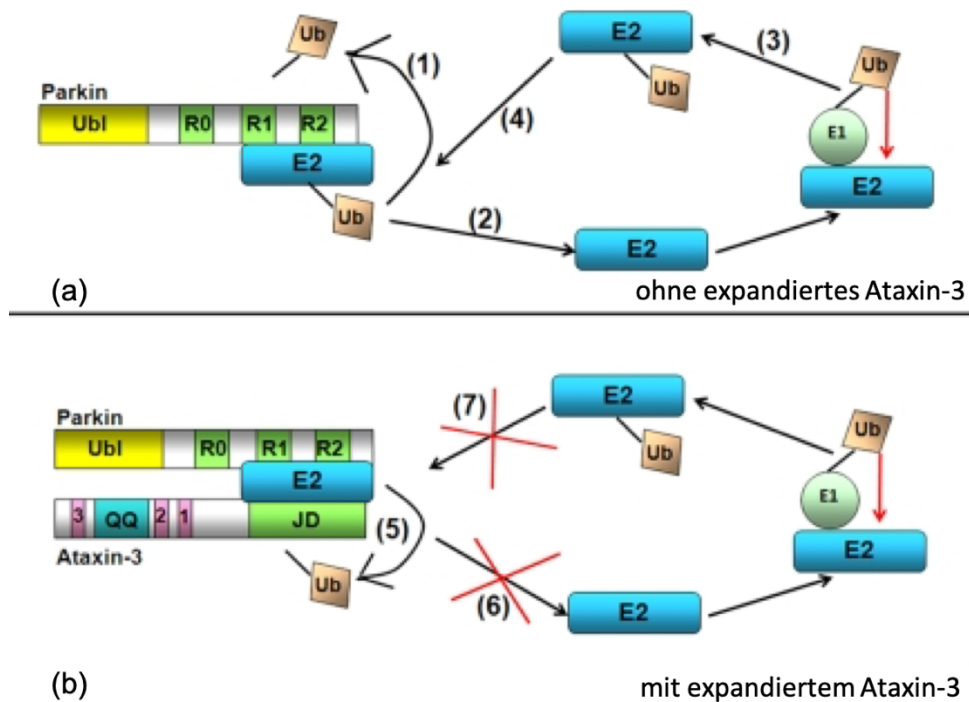


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Ubiquitinierung von Parkin und der Interaktion mit dem Ataxin-3-Protein

(a) In Abwesenheit des Ataxin-3-Proteins (1) findet eine Ubiquitin-Übertragung von der E2-Ubiquitin-Konjugase auf Parkin statt. (2) Daraufhin löst sich die Bindung der beiden Proteine und die E2-Ubiquitin-Konjugase geht eine Bindung mit der E1-Ubiquitin-Ligase ein. Diese aktiviert das Ubiquitin-Molekül und (3) transferiert es auf die E2-Ubiquitin-Konjugase. (4) Es ist eine erneute Ubiquitinierung von Parkin möglich.

(b) Bei Anwesenheit des expandierten Ataxin-3-Proteins (5) kommt es zu einer Bindung zwischen der E2-Ubiquitin Konjugase und diesem. Diese Interaktion stärkt wiederum die Bindung von Parkin mit der E2-Ubiquitin-Konjugase, wodurch der Transfer des Ubiquitins auf Parkin erschwert und auf das Ataxin-3-Protein umgeleitet wird. Die verstärkte Bindung verhindert ebenso, (6) dass die E2-Ubiquitin-Konjugase die Bindung lösen und wieder durch eine E1-Ubiquitin-Ligase beladen werden oder (7) dass eine ubiquitinierte E2-Ubiquitin-Konjugase an Parkin binden kann. Modifiziert nach Durcan et al., 2012.

legte er den Fokus auf folgende Polymorphismen: $G^{601}>A^{601}$ (Serin, S>Asparagin, N) auf Exon 4, $G^{1239}>C^{1239}$ (Valin, V>Leucin, L) auf Exon 10 und $G^{1281}>A^{1281}$ (Aspartat, D>Asparagin, N) auf Exon 11. Seine Kohorte war für die Polymorphismen G^{601}/A^{601} und G^{1281}/A^{1281} monomorph, weswegen er seine Charakterisierungsstudie zur Interaktion des Ataxin-3-Proteins mit den Parkin-Varianten des Polymorphismus G^{1239}/C^{1239} durchführte. Die translatierten Produkte der möglichen Varianten werden im Weiteren V380- bzw. L380-Parkin bezeichnet. Hierbei stellte er zunächst fest, dass homozygote C^{1239}/C^{1239} -Allelträger in Kombination mit ihren CAG-Wiederholungen ein um drei Jahre früheres AAO haben. Dies hat einen relevanten krankheitsmodifizierenden Effekt.

In seinen Zellkulturanalysen konnte zunächst ein Unterschied bezüglich der Lokalisation beider Varianten festgestellt werden. V380-Parkin ist gleichmäßig im Zytoplasma und perinukleär verteilt, wohingegen L380-Parkin sich eher gruppiert im Zytoplasma befindet. Außerdem konnte er eine verminderte Interaktion des L380-Parkin im Vergleich zum V380-Parkin mit dem expandierten Ataxin-3-Protein feststellen. Diese nimmt, je größer die PolyQ-Domäne des Ataxin-3-Proteins ist, zusätzlich stetig ab. In den Ataxin-3-Protein-Aggregaten finden sich keine der beiden Formen wieder, jedoch ist die Anzahl der Aggregate bei der Transfektion von L380-Parkin fast doppelt so hoch. L380-Parkin ubiquitiniert das Ataxin-3-Protein geringer als V380-Parkin. Dies hängt vermutlich mit der Lokalisation des Polymorphismus zwischen der IBR- und der RING2-Domäne zusammen. Dort liegt wie in 1.2.2 beschrieben das katalytische Zentrum der E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität, sodass der Einbau von Leucin zu einer Störung seiner Funktion führen kann. Dies erklärt die oben beschriebenen Beobachtungen, die für eine reduzierte Degradation des expandierten Ataxin-3-Proteins sprechen. Außerdem wird L380-Parkin vermehrt gespalten, wodurch es zu einem zusätzlichen Verlust seiner protektiven Funktion kommt (unveröffentlichte Diplomarbeit Jonasz J. Weber 2011). Kahns et al. beschreiben hier einen Kreislauf, da daraufhin die Aggregation des expandierten Ataxin-3-Proteins und der apoptotische Stress der Zellen steigen. Folge der Stressreaktion ist ebenso der Verlust von Parkin (Kahns et al. 2002). Das expandierte Ataxin-3-Protein ist bei der Expression von L380-Parkin häufiger fragmentiert, was zu der Verstärkung neuronaler Schäden nach der „*toxic fragment hypothesis*“ führen kann (Matos, Almeida und Nobrega 2017). Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass der C/C-Genotyp und möglicherweise auch der G/C-Genotyp eine krankheitsmodifizierende Bedeutung haben. Sie könnten somit in einer möglichen Funktion von Parkin als Biomarker eine Rolle spielen.

1.3 Biomarker

1.3.1 Allgemeines

Das Wort „Biomarker“ ist ein Schachtelmorphem aus der Bezeichnung „biologischer Marker“ und umfasst klinische Zeichen, Befunde bildgebender Verfahren und molekulare Bestimmungen verschiedener Substanzgruppen wie beispielsweise genetische Mutationen oder Proteine verschiedener Signalwege (Strimbu und Tavel 2010). Es gibt zwei Möglichkeiten der Einteilung von Biomarkern. Es kann zwischen *Trait-* und *Statemarkern* unterschieden werden. *Traitmarker* sind unveränderbare Eigenschaften wie eine Mutation. *Statemarkern* (z.B. Troponin bei Myokardinfarkt (Babuin und Jaffe 2005)) beschreiben sich im Krankheitsprozess verändernde Charakteristika und sind für Verlaufsbeobachtungen von Bedeutung. Die zweite Einteilung orientiert sich an der Funktion der Biomarker. Diagnostische Biomarker helfen bei der Identifizierung einer Erkrankung (z.B. ein expandiertes *Ataxin-3*-Allel). Prognosebiomarker geben Hinweise zum Verlauf der Erkrankung und einer potenziellen Heilung. Abschließend kann aus prädiktiven Biomarkern die Wahrscheinlichkeit eine Erkrankung zu bekommen und das therapeutische Ansprechen abgeleitet werden (Strecker 2011).

Die *Biomarkers Definition Working Group* definiert Biomarker als „Charakteristika, die objektiv messbar sind und als Indikator für physiologische bzw. pathologische Prozesse oder die pharmakologische Antwort auf eine therapeutische Intervention bewertet werden“ (Biomarkers Definitions Working Group 2001).

Biomarker schließen messbare Größen und klinische Zeichen ein. Durch sie sind nur bedingt Aussagen zum subjektiven Wohlbefinden oder Gesundheitszustand des Patienten ableitbar (Strimbu und Tavel 2010; Biomarkers Definitions Working Group 2001).

Dies sind jedoch die Größen, die durch die klinische Arbeit positiv beeinflusst werden sollen und durch primäre klinische Endpunkte in Studien festgelegt werden. Hierbei handelt es sich um harte Kriterien wie Todesfall, Eintritt eines Herzinfarktes oder eine komplette Remission, die vor Studienbeginn festgelegt werden und den Therapieerfolg überwachen (National Cancer Institute 2019).

Da der Verlauf mancher Erkrankungen sehr langsam ist oder therapeutische RCTs aus ethischen Gründen nicht bis zu dem Erreichen bedrohlicher klinischer

Endpunkte durchgeführt werden sollen, werden zunehmend Surrogatendpunkte in Studien etabliert. Damit Biomarker diese Funktion erfüllen, muss zuverlässig eine Vorhersage zum klinischen Ausgang einer Erkrankung durch ihre Bestimmung getroffen werden können. Dafür muss geprüft werden, ob der klinische Endpunkt mit dem Erreichen des Surrogatendpunktes korreliert. Außerdem muss die Frage beantwortet werden, inwiefern der Surrogatendpunkt krankheitsspezifisch ist und sich auf andere Populationen übertragen lässt (Strimbu und Tavel 2010). Es ist möglich, dass der gemessene Biomarker nicht selbst Teil des pathologischen Signalweges ist, der in den klinischen primären Endpunkt führt. Daraus kann fälschlicherweise eine Kausalität abgeleitet werden, die sich vor allem bei der Übertragung des Biomarkes als Surrogatmarker für andere klinische Studien negativ auswirken kann. So verbessert die LDL-Senkung mittels eines Statins signifikant das kardiovaskuläre Risiko (Kastelein et al. 2005), jedoch ist das nicht für die deutlich ausgeprägtere LDL-Senkung durch die kombinierte Therapie aus Statin und Ezetimib der Fall. Bei einer fehlenden Abnahme der Morbidität entspricht die Senkung des LDL-Spiegels in diesem Fall einem „falschen Surrogatmarker“ (Mitka 2008). Aus dieser Beobachtung ergibt sich ein weiterer Nachteil der Nutzung von Surrogatmarkern in Studien. Das Erreichen eines Surrogatendpunktes sagt nicht unbedingt etwas zur weiteren klinischen Entwicklung aus. Fehlt eine Kausalität bzw. wird eine falsche Kausalität zwischen Pathogenese und Biomarker angenommen, kann dies zu unerwarteten schwerwiegenden klinischen Folgen führen (Strimbu und Tavel 2010).

1.3.2 Biomarker in der SCA3

Für die SCA3 gibt es keine krankheitsmodifizierende Therapie und viele interventionelle Studien sind durch eine fehlende Randomisierung und Placebo-Gruppe sowie durch zu kurz angelegte Studiendauern qualitativ kritisch zu prüfen (Saute und Jardim 2018). Da die SCA3 eine sich langsam verschlechternde Erkrankung ist, können Biomarker als Surrogatendpunkte eine Verbesserung zur Beurteilung therapeutischer Interventionen und des Krankheitsverlaufes darstellen. Ihre Identifikation und Etablierung sind Teil intensiver Forschung (Lima und Raposo 2018).

Klinische Biomarker

Bislang wird der Krankheitsverlauf anhand klinischer Skalen wie dem SARA-Score (Schmitz-Hubsch et al. 2006) bewertet. Diese zeigen gegenüber kleinen Veränderungen in kurzen Zeiträumen Schwächen hinsichtlich ihrer Sensitivität und bleiben trotz Standardisierungsverfahren zu einem gewissen Teil subjektiv (Lima und Raposo 2018).

Ein anderer klinischer Biomarker kann der bei SCA3-Patienten deutliche Gewichtsverlust sein (Saute, Silva et al. 2012). Diallo et al. führten eine Längsschnittstudie mit drei Vorstellungen der SCA3-Patienten durch, die bei 38% der SCA3-Patienten einen Gewichtsverlust zeigte. Dieser korrelierte mit einem höheren SARA-Score, früherem AAO und einer höheren Anzahl der CAG-Wiederholungen. Außerdem litt diese SCA3-Patienten-Kohorte neben der Ataxie im Durchschnitt unter fünf weiteren Symptomen. Das Fortschreiten der Erkrankung ist signifikant schneller, je mehr der *Body-Mass-Index* (BMI) abnimmt, sodass dieser potenziell ein Prognosebiomarker sein kann (Diallo et al. 2017). Dies gilt ebenso für okulomotorische Bewegungsstörungen. Wu et al. konnten in ihrer klinischen Studie eine Reihe von okulomotorischen Störungen in präsymptomatischen SCA3-Mutationsträgern und SCA3-Patienten feststellen, deren Frequenz und Ausprägung mit dem SARA-Score korrelieren und sich beim Fortschreiten der Erkrankung verschlechtern. Da der SARA-Score keine okulomotorischen Störungen abprüft, waren die präsymptomatischen SCA3-Mutationsträger in dieser Studie laut diesem symptomfrei. Somit kann die Detektion der okulomotorischen Störungen möglicherweise bei der Vorhersage helfen, ab welchem Zeitpunkt mit dem Auftreten einer Gangataxie zu rechnen ist (Wu et al. 2017).

Neuroradiologische Biomarker

Für die Etablierung neuroradiologischer Biomarker liegen vor allem Querschnittstudien zur Volumetrie mit dem Surrogatendpunkt der Hirnatrophie vor. Diese zeigen eine deutliche Volumenabnahme des Kleinhirns, des Hirnstamms, der Basalganglien und des Thalamus, die mit dem SARA-, dem ICARS-Score, der Krankheitsdauer und der Anzahl der CAG-Wiederholungen korrelieren (Klaes et al. 2016). Adanyeguh et al. konnten in einer Längsschnittstudie zeigen, dass die

volumetrischen Veränderungen eine höhere Effektstärke zeigen als Veränderungen der Punktzahl in den klinischen Skalen. Sie schlagen, auch aufgrund der höheren Objektivität, die Verwendung dieses Charakteristikums als Biomarker zur Verlaufsbeurteilung der SCA3 vor (Adanyeguh et al. 2018).

Molekulare Biomarker

Die SCA3 ist eine sich langsam verschlechternde Erkrankung, für die keine erfolgreichen interventionellen Studien mit einer Verzögerung des Krankheitsverlaufs vorliegen. Da bei Erreichen klinischer Endpunkte und dem natürlichen Verlauf der Erkrankung ein langer Studienzeitraum gewählt werden müsste, ist die Etablierung von molekularen Biomarkern als Surrogatendpunkte und einer konsekutiven kürzeren Studiendauer von besonderem Interesse. Diese können in präsymptomatischen Mutationsträgern detektiert werden und auf diese Weise einen Therapiezeitpunkt festlegen, bei dem die Entwicklung neurologischer Symptome verzögert bzw. verhindert wird (Lima und Raposo 2018).

Als molekularer *Traitmarker* dient das expandierte *Ataxin-3*-Allel, das sowohl diagnostisch als auch prädiktiv aufgrund der negativen Korrelation mit dem AAO genutzt werden kann (Maciel et al. 1995). Andere prädiktive *Traitmarker* sind genetische Varianten, die zum Beispiel auf den Genen für IL-6 (Raposo et al. 2017) oder Apolipoprotein E (Peng et al. 2014) liegen. Dank ihrer Identifizierung können SCA3-Patienten hinsichtlich ihres Genotyps in den Studien gezielter eingeteilt und Verbesserungen einer genetischen Beratung zu einem möglichen AAO geschaffen werden (Lima und Raposo 2018). Da das AAO nur zu etwa 50% durch die Anzahl der CAG-Wiederholungen des expandierten *Ataxin-3*-Allels festgelegt wird, suchten de Mattos et al. ebenfalls nach modifizierenden Komponenten. Sie konnten in einer Metaanalyse zeigen, dass die Anzahl der CAG-Wiederholungen im *Ataxin-2*-Gen mit einem früheren AAO korrelieren. Außerdem spielt die ethnische Herkunft für das AAO eine Rolle, wofür die Autoren eine Studie zur Untersuchung der Rolle der *Ataxin-3*-Hapotypen (Gaspar et al. 2001; Maciel et al. 1999) vorschlugen. Sie ziehen daraus den Schluss, dass die Anzahl der CAG-Wiederholungen nicht in jeder Population dieselben Effekte haben kann (de Mattos et al. 2019).

Durch die beschriebene Interaktion mit dem expandierten Ataxin-3-Protein wird auf die Untersuchung von Parkin als molekularer *Statemarker* in dieser Promotion ein besonderes Augenmerk auf Parkin gelegt. Auf der Ebene der Transkriptionsfaktoren sind durch Raposo et al. zehn Gene des Immunsystems und des G-Rezeptor-gekoppelten-Signalweges aus Vollblut identifiziert worden, die bei Vorliegen des expandierten Ataxin-3-Proteins überexprimiert werden. Dies ist signifikant der Fall für *FCGR3B*, *P2RY13* und *SELPLG*, sodass die Autoren vorschlagen, diese drei in weiteren Kohorten hinsichtlich ihrer klinischen Vorhersagekraft zu prüfen. Von *FCGR3B* konnte eine höhere Konzentration im Frühstadium der Erkrankung (kürzere Krankheitsdauer) gemessen werden als im späteren Verlauf, sodass die Autoren von der Aktivierung einer zellulären Immunantwort auf das expandierte Ataxin-3-Protein im nicht betroffenen Gewebe „Blut“ ausgehen. Aufgrund der einfachen Gewinnung dieses Patientenmaterials und der Dynamik im Krankheitsprozess eignet sich dieser Transkriptionsfaktor womöglich gut als Prognosebiomarker (Raposo et al. 2015).

Toonen et al. konnten in einem homozygoten SCA3-Mausmodell geeignete Kandidaten für Verlaufsbiomarker in Blut identifizieren. In einer multimodalen Arbeit (genomische, metabolomische und lipidomische Methoden) konnten sie *Tnfrsf14* (Tumor-Nekrose-Faktor-(Ligand)-Familie, Mitglied 14), als höherregulierten Transkriptionsfaktor, erniedrigte DL-Tryptophanlevel sowie signifikant erhöhte Sphingoceramid- und Di- bzw. Tri-Acyl-Glycerollevel im Krankheitsverlauf festmachen. Für die Ceramide besteht eine Assoziation mit neuroinflammatorischen Prozessen (Arboleda et al. 2009). Die Autoren sehen die veränderte Bildung im Krankheitsverlauf als Antwort auf den durch das expandierte Ataxin-3-Protein mitbedingten oxidativen Stress, die die Neurone anfälliger für diesen macht (Toonen et al. 2018).

De Assis et al. haben in Blut Marker des oxidativen Ungleichgewichtes untersucht. Sie konnten zeigen, dass SCA3-Patienten ein höheres Level an reaktiven oxidativen Spezies bilden und die antioxidativen Enzyme, die SOD und die Glutathionperoxidase (GSH-Px), eine verminderte Aktivität vorweisen. Es ist von besonderem Interesse, dass die SOD in präsymptomatischen SCA3-Mutationsträgern signifikant aktiver ist. Dies kann ein sich im Verlauf der Erkrankung

erschöpfender antioxidativer Regulationsmechanismus sein. Die Aktivität der GSH-Px ist umso niedriger, je schwerer der Patient betroffen ist, sodass sich auch dieses Protein als Progosebiomarker eignen kann (de Assis et al. 2017). Ein weiterer Kandidat für einen Verlaufsbiomarker kann das leichte Serum-Neurofilament sein, das bei der Degeneration von Neuronen freigesetzt wird. Hier konnte durch Wilke et al. eine erhöhte Serumkonzentration bei SCA3-Patienten detektiert werden, die in weiterführenden Studien auf den Krankheitsverlauf und die klinischen Scores korreliert werden sollte (Wilke et al. 2018).

1.4 *NeurOmics*

NeurOmics war ein durch die Europäische Union gefördertes Forschungsprojekt zu seltenen vererbaren neurologischen Erkrankungen. Es sollten mittels verschiedener Methoden, „-Omics“, neue verursachende Gene, neue diagnostische *Tools* sowie mögliche Therapieformen für diese Erkrankungen identifiziert werden (NeurOmics 2019a). Es lief im Jahr 2013 an und hatte seinen Abschluss im Mai 2018 und bestand aus führenden europäischen Forschungsgruppen, Fachexperten aus der Wirtschaft und internationalen Experten (NeurOmics 2019b). Ein Ziel des Forschungsprojektes war es durch die internationale Zusammenarbeit eine große Patientenkohorte der verschiedenen Erkrankungen zu generieren, um beispielsweise neue krankheitsauslösende Genmutationen mittels *Next-Generation Whole-Exome Sequencing* (WES) zu ermitteln. Ein weiteres Ziel war die Identifizierung und Etablierung von Biomarkern zur Beschreibung einer Kohorte und Beurteilung der präsymptomatischen Phase, Therapieverläufen und -komplikationen. Diese und alle weiteren Ergebnisse wurden erstmals in eine große Datenbank eingespeist, auf die für zukünftige Projekte zugegriffen werden kann. Dem haben alle teilnehmenden Patienten mit ihrer Teilnahme an den verschiedenen Studienuntersuchungen zugesagt. Sie sind Patienten folgender zehn großer Erkrankungsgruppen:

1. Ataxien
2. Kongenitale Muskeldystrophien
3. Fronto-Temporale Demenzen
4. Kongenitale Myasthenien

5. Hereditäre Motorneuropathien (Charcot-Marie-Tooth Erkrankung)
6. Hereditäre Spastische Paraplegien
7. Chorea Huntington (HD)
8. Muskuläre Kanalopathien,
9. Muskeldystrophien
10. Spinale Muskelatrophien/Erkrankungen des zweiten Motorneurons (NeurOmics 2019a)

Die Erkrankungen teilten sich wiederum auf die verschiedenen Methoden in *Workpackages* auf, wobei sich das *Workpackage 4* mit der Identifikation von Verlaufsbiomarkern auseinandergesetzt hat und diese Promotion aus diesem hervorgegangen ist. (NeurOmics 2019c)

1.5 Zielsetzung

Die Zielsetzung dieser Promotion besteht in der Identifikation und Beschreibung des Gesamt-Ataxin-3-Proteins, des expandierten Ataxin-3-Proteins und von Parkin als mögliche prognostische und prädiktive Biomarker der SCA3. Bislang wurden keine suffizienten Biomarker aus einfach zu gewinnendem Patientenmaterial etabliert. Diese werden jedoch im Rahmen von therapeutischen klinischen Studien als Verlaufsbiomarker und in der genetischen Beratung als prognostische und prädiktive Biomarker dringend benötigt. Das Ataxin-3-Protein ist an einer Reihe von Signalwegen beteiligt und geht mit vielen Strukturen Interaktionen ein, die sich durch die Expansion der PolyQ-Domäne verändern können. Für Parkin ist durch Durcan et al. eine direkte Interaktion mit dem expandierten Ataxin-3-Protein beschrieben worden (Durcan et al. 2011; Durcan et al. 2012). Sie beobachteten in ihren Experimenten eine Abnahme des Parkin-Protein-Levels durch die veränderte Interaktion. Herr Dr. rer. nat. Weber konnte dies in seiner Diplomarbeit zum *Park2*-Polymorphismus G¹²³⁹/C¹²³⁹ bestätigen, der zusammen mit den Polymorphismen G⁶⁰¹/A⁶⁰¹ und G¹²⁸¹/A¹²⁸¹ in der vorliegenden Dissertation nochmals genauer hinsichtlich einer modifizierenden Rolle der Konzentrationen von Parkin und des expandierten sowie Gesamt-Ataxin-3-Proteins untersucht wird (unveröffentlichte Diplomarbeit Jonasz J. Weber 2011). Der Einfluss der erläuterten Polymorphismen des *Ataxin-3* und des *PARK2*-Gens auf die klinischen

Parameter mit möglicher krankheitsmodifizierender Funktion ist ein anderer Bestandteil der Analysen. Die Analysen werden in 24 symptomatischen SCA3-Patienten, fünf asymptomatischen möglichen Mutationsträgern (RISCA) und 31 geschlechts- und altersangepassten Kontrollen vorgenommen. Die jeweils gemessenen Proteinlevel von Parkin, dem expandierten und dem Gesamt-Ataxin-3-Protein werden mit den klinischen Parametern AAO, Krankheitsdauer, SARA-Score und Fortschrittrate der Erkrankung (*cross-sectional disease progression*, (CSDP)) korreliert. Von vier SCA3-Patienten und einem RISCA konnte eine Folgeanalyse mit neu erhobenem SARA-Score und neuer Bestimmung der Proteinlevel vorgenommen werden, sodass auch eingeschränkt die Dynamik der Proteinkonzentrationen im Krankheitsverlauf longitudinal mitbeurteilt werden soll. Weitere Fragestellungen sind, welche Parameter die durch die *Time-resolved fluorescence energy transfer* (TR-FRET)-Assays ermittelten Proteinkonzentrationen in aus Vollblut isolierten Lymphozyten beeinflussen und ob daraufhin standardisierte Rahmenbedingungen zu treffen sind. Die Zusammenhänge der Zielsetzung der Arbeit mit der in der Einleitung dargelegten Thematik sind in Abbildung 1.4 graphisch zusammengefasst.

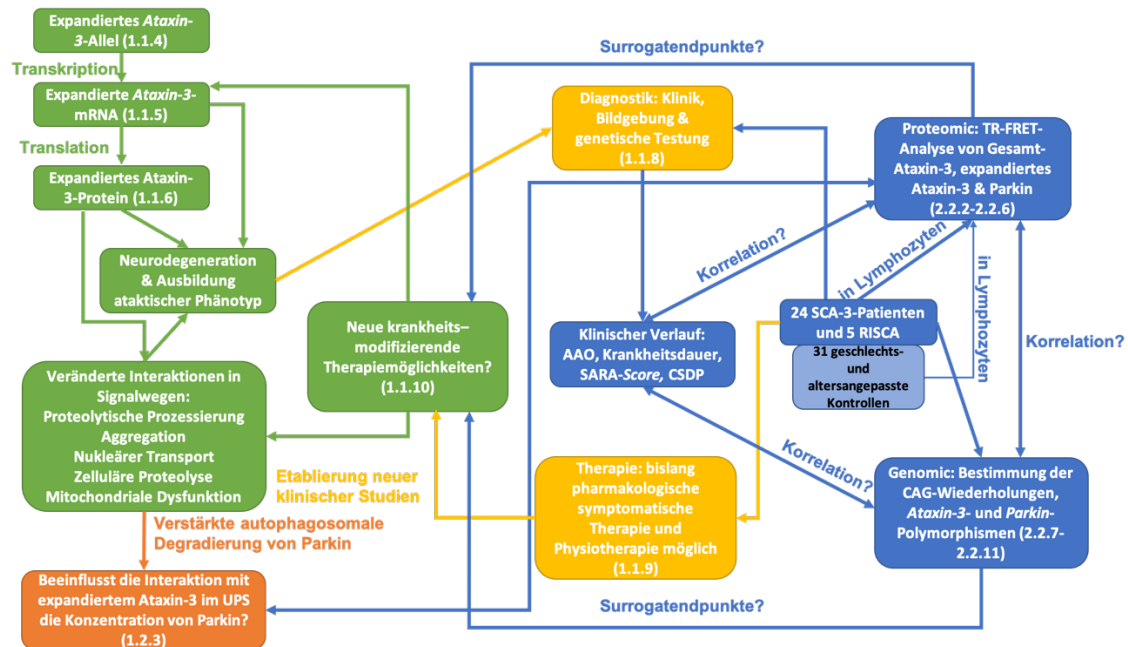


Abbildung 1.4: Darstellung der im ersten Kapitel beschriebenen Thematik zur SCA3 und Parkin und der möglichen Etablierung von Biomarkern

Grün: Die in der Einleitung dargelegte, einführende Literatur, auf der diese Promotion basiert. Orange: Die im Fokus stehende Interaktion von Parkin und dem expandierten Ataxin-3-Protein.

Einleitung

Gelb: In der Einleitung dargestellte Sachverhalte, die für den klinischen Alltag von Interesse sind.
Blau: Inhalte und Fragestellung dieser Promotion.

Durch die Expansion der CAG-Wiederholungen auf einem Allel des *Ataxin-3*-Gens kommt es zu einem verlängerten *Ataxin-3*-Transkript. Dieses wirkt selbst schon toxisch auf die Zellen, wenn es nicht translatiert wird. Bei der Translation entsteht ein *Ataxin-3*-Protein, das eine expandierte PolyQ-Domäne beinhaltet und neue pathogene Interaktionen in den zellulären Signalwegen eingeht. Diese führen zumeist zu einer Neurodegeneration mit konsekutiver Entwicklung eines ataktischen Phänotyps. Die Ermittlung der genauen Mechanismen dieser veränderten Signalwege sind Teil der aktuellen Forschung, um neue krankheitsmodifizierende Therapien zu entwickeln. Da es sich bei der SCA3 um eine langsam fortschreitende Erkrankung handelt und die Folgen der Morbidität schwerste Pneumonien durch Aspiration sind, ist die Nutzung von primären klinischen Endpunkten in Studien aus zeitlichen und ethischen Gründen schwierig. Umso wichtiger ist hier die Entwicklung von Biomarkern, die eine Aussage zum Krankheitsverlauf bzw. dem AAO geben und als Surrogatendpunkte genutzt werden können. Für diese Arbeit ist die durch das expandierte *Ataxin-3*-Protein bedingte veränderte Interaktion von Parkin mit der E2-Ubiquitin-Konjugase von besonderem Interesse. Durcan et al. konnten bei der Expression des expandierten *Ataxin-3*-Proteins eine abnehmende Konzentration des Parkin-Proteins detektieren. Dieses wird in dieser Arbeit nochmals geprüft und die Proteinkonzentrationen von Parkin zusammen mit der des Gesamt-*Ataxin-3*-Proteins und des expandierten *Ataxin-3*-Proteins auf ihre Korrelation mit klinischen Parametern untersucht. Außerdem wird analysiert, ob Korrelationen mit der Anzahl der CAG-Wiederholungen vorliegen und ob die verschiedenen Polymorphismen im *Ataxin-3*- und *Park2*-Gen sich modifizierend auf den Krankheitsverlauf, das AAO, den SARA-Score, die CSDP und die detektierten Proteinkonzentrationen auswirken.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräteverzeichnis

Tabelle 2.1: Verzeichnis der verwendeten Geräte

Gerät	Gerätetyp	Hersteller
Agarosegelkammern	Elektrophoresekammer 40-0708	peqLab, Erlangen, DE
	Elektrophoresekammer 40-1214	peqLab, Erlangen, DE
Autoklav	Autoklav ELV	Systec, Wettenberg, DE
Elektrophorese Span- nungsgeber	Consort EV231	peqLab, Erlangen, DE
	Consort E835	peqLab, Erlangen, DE
Eismaschine		Ziegra Eismaschine, I- sernhagen, DE
Envision Plattenlesegerät mit TRF-Laser	<i>Multimode Plate Reader EnVision TRF Light Unit, 337nm</i>	PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, US
Geldokumentation	Biostep Transiluminator	Biostep, Jahnsdorf, DE
Heizblock	ThermoStat Plus	Eppendorf, Hamburg, DE
	Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, DE
Isopropanolbox	<i>CoolCell® Cell Freezing Containers</i>	BioCision, San Rafael, Kalifornien, US
Mikrowelle		LG, Willich, DE
Polymerasekettenreaktion (PCR) Zykler	G-Storm GS1	Gene Technologies, Essex, UK
Photometer	MWG Sirius HT	MWG BioTech, Ebers- berg, DE
	Ultrospec® 3100pro	Amersham Biosciences, Little Chalfont Bucking- hamshire, UK

Material und Methoden

Pipetten	Research Pipette 10 µl	Eppendorf, Hamburg, DE
	Research Pipette 100 µl	Eppendorf, Hamburg, DE
	Research Pipette 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, DE
	Research Plus Pipette 2,5 µl	Eppendorf, Hamburg, DE
	Research Plus Pipette 10 µl	Eppendorf, Hamburg, DE
	Research Plus Pipette 100 µl	Eppendorf, Hamburg, DE
	Research Plus Pipette 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, DE
Sequenzierer	CEQ 8000	Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, US
Sterilbank	HERA Safe	Heraeus Holding, Hanau, DE
Elektronische Pipettierhilfe	pipetus® Hirschmann	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, DE
Vakuumpumpe	Laboport	KNF Neuberger, Freiburg, DE
Vakuumentrifuge	Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg, DE
Vortexer	REAX control	Heidolph, Schwabach, DE
	VF2	Janke & Kunkel, Staufen, DE
Waagen	Precisa XT 6200C-FR	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, CH
	Precisa 404A	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, CH
Wasseraufbereitungssystem	Quantum™ EX 06196	Millipore, Eschborn, DE
Wasserbad	GFL® 1083	GFL, Burgwedel, DE
Zentrifugen	Centrifuge 5417C 25000G	Eppendorf, Hamburg, DE
	Centrifuge 5418 16873G	Eppendorf, Hamburg, DE
	Centrifuge 5810 3220G	Eppendorf, Hamburg, DE
	Centrifuge 5810R 3220G	Eppendorf, Hamburg, DE

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.2: Verzeichnis der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
<i>96 Well Microplate</i>	Greiner bio-one, Frickenhausen, DE
<i>Aluminium Foil and Cling Film</i>	FIPP Handelsmarken, Hamburg, DE
BD Safety-Lok™ Blutentnahmeset	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, US
CELLSTAR® Centrifuge Tubes, PP, graduated, conical bottom, 15 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen, DE
CELLSTAR® Centrifuge Tubes, PP, graduated, conical bottom, 50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen, DE
CELLSTAR® Centrifuge Tubes, PP, graduated, conical bottom with support skirt, 50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen, DE
Einmal-Küvetten aus Polystyrol 1,5 ml	Roth, Karlsruhe, DE
epT.I.P.S.® 10 µl	Eppendorf, Hamburg, DE
epT.I.P.S.® 200 µl	Eppendorf, Hamburg, DE
epT.I.P.S.® 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, DE
Falcon™ <i>Serological Pipet</i> 2 ml	Corning Incorporated, New York, US
Falcon™ <i>Serological Pipet</i> 5 ml	Corning Incorporated, New York, US
Falcon™ <i>Serological Pipet</i> 10 ml	Corning Incorporated, New York, US
Falcon™ <i>Serological Pipet</i> 25 ml	Corning Incorporated, New York, US
Falcon™ <i>Serological Pipet</i> 50 ml	Corning Incorporated, New York, US
<i>Feather Disposable Scalpel</i>	Daigger Scientific, Vernon Hills, Illinois, US
Handschuhe Classic Nitrile Größe S, puderfrei	Abena GmbH, Zörbig, DE
Injekt® 10 ml Einmalspritze	B.Braun, Melsungen, DE
Parafilm®, Laboratory Film	Bemis Europe, Braine L'Alleud, BE
Nalgene™ System 100 <i>Cryogenic Tubes</i> 2 ml (Cryotubes)	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, DK
<i>Pasteur Capillary Pipettes</i> , 230 mm	WU Mainz, Bamberg, DE
PCR Softstrips 0,2ml	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, DE
PerkinElmer <i>ProxiPlate™</i> -384 Plus	PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, US
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, DE
Reaktionsgefäß 2 ml	Eppendorf, Hamburg, DE
Safety-Multifly® 21 G	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Sterican® Gr.1 20 G	B.Braun, Melsungen, DE
SurPhob Spitzen 10 µl	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, DE

TipOne® <i>Graduated Tip</i> 1000 µl	STARLAB International, Hamburg, DE
TipOne® RPT <i>UltraPoint Graduated Tip</i> 200 µl	STARLAB International, Hamburg, DE

2.1.3 Blutröhrchensysteme

Tabelle 2.3: Verzeichnis der verwendeten Blutröhrchensysteme

Bezeichnung	Handelsname	Zusatz	Volumen	Firma
EDTA-Röhrchen	S-Monovette® 9 ml K2E-Gel	K2 EDTA Gel	9 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE
CPDA-Röhrchen	S-Monovette® 8,5 ml CPDA	Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin	8,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DE
CPT-Röhrchen	BD Vacutainer® CPT™ <i>Mononuclear Cell Preparation Tube</i> Sodium Citrate	Natriumcitrat	8 ml	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, US

2.1.4 Chemikalien und Biochemikalien

Tabelle 2.4: Verzeichnis der verwendeten Chemikalien und Biochemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Agarose	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, US
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Merck (Merck Millipore), Darmstadt, DE
Ampuwa, Wasser für Injektionszwecke	Fresenius Kabi, Bad Homburg, DE
Biocoll (isotonisch)	Merck (Biochrom), Darmstadt, DE
Bis-Tris, PanReac	AppliChem, Darmstadt, DE
Borsäure	Roth, Karlsruhe, DE
Bovines Serum Albumin (BSA), purified	New England Biolabs, Inc., Ipswich, Massachusetts, US
Complete, EDTA-freier Proteasen-Inhibitor-Cocktail (Tabletten)	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Merk (Sigma-Aldrich), Darmstadt, DE
Dulbecco's <i>Phosphate Buffered Saline</i> (DPBS) -CaCl ₂ , -MgCl ₂	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, US
Ethanol absolute p.A., PanReac	AppliChem, Darmstadt, DE
Ethidiumbromid 1%	Roth, Karlsruhe, DE
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck, Darmstadt, DE

Fetales Kälberserum, Gibco®	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, US
Ficoll™ PM400	GE Healthcare Sciences, Chalfont St. Giles, UK
GelRed™, Nucleic Acid Gel Stain	Biotium, Inc., Fremont, Kalifornien, US
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Merck (MerckMillipore), Darmstadt, DE
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe, DE
Natriumdihydrogenphosphat, zur Analyse	AppliChem, Darmstadt, DE
Natrium-EDTA	Merck (Sigma-Aldrich), Darmstadt, DE
Natriumfluorid	Merck (MerckMillipore), Darmstadt, DE
Orange G	Omikron, Rietberg, DE
PCR Grade Nucleotide Mix (dNTPs)	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
peqGOLD, DNA-ladder Mix	PeqLab (VWR Chemicals), Erlangen, DE
Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bradford-Reagenz)	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, US
Q-Solution	Qiagen, Hilden, DE
RPMI 1640 Medium	Merck (Biochrom), Darmstadt, DE
Tris (hydroxymethyl)aminomethane (Tris)	Merck (Sigma-Aldrich), Darmstadt, DE
Triton® X 100	Roth, Karlsruhe, DE
Tween® 20, PanReac	AppliChem, Darmstadt, DE

2.1.5 Puffer und Lösungen

Tabelle 2.5: Verzeichnis der verwendeten Puffer und Lösungen

Verwendung	Name	Zusammensetzung
Agarose-Gelelektrophorese	10x Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer)	- 890mM Tris - 890mM Borsäure - 20mM EDTA
	6x Ladepuffer	- Orange G 0,2% - Ficoll 400 15% - Destilliertes (dd) H ₂ O ad 50 ml

Lymphozytenisolierung aus Vollblut (Verwendung bei EDTA- und CPDA-Röhrchen)	Erylyse-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> - Ammoniumchlorid 155 mM - Kaliumhydrogencarbonat 10 mM - EDTA 250 mM pH 7,4 0,1 mM - dd H₂O ad 1 l
	Einfriermedium	<ul style="list-style-type: none"> - Fetales Kälberserum 60% - RPMI 30% - DMSO 10%
Proteinisolierung	25x Complete-Proteasen-Inhibitor-Cocktail	<ul style="list-style-type: none"> - 1 Tablette pro 2 ml H₂O
	Lyse-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> - 1x PBS - 1% Triton® X 100 - 25x Complete-Proteasen-Inhibitor-Cocktail (40 µl je ml Puffer)
<i>Time-resolved fluorescence energy transfer (TR-FRET)</i>	Verdünnungspuffer (für die lysierten Lymphozyten)	<ul style="list-style-type: none"> - 1x PBS - 25x Complete-Proteasen-Inhibitor-Cocktail (40 µl je ml Puffer)
	Detektionspuffer	<ul style="list-style-type: none"> - Natriumdihydrogenphosphat 50mM - Natriumfluorid 400 mM - 0,1% BSA - 0,05% Tween® 20

2.1.6 Enzyme und käuflich erworbene Puffer

Tabelle 2.6: Verzeichnis der verwendeten Enzyme und käuflich erworbenen Puffer

Enzym/Puffer	Hersteller
Betain <i>Solution</i>	Merck (Sigma-Aldrich), Darmstadt, DE
BioTherm™ 10x <i>reaction buffer</i>	BioAxis Genecraft Products, Köln, DE
BioTherm™ <i>Taq DNA Polymerase</i>	BioAxis Genecraft Products, Köln, DE
Pwo DNA Polymerase 10x Puffer	Merck (Sigma-Aldrich), Darmstadt, DE
Pwo DNA Polymerase	Merck (Sigma-Aldrich), Darmstadt, DE
QIAGEN 10x PCR Puffer	Qiagen, Hilden, DE
QIAGEN <i>Taq DNA Polymerase</i>	Qiagen, Hilden, DE

2.1.7 Reagenziensets (Kits)

Tabelle 2.7: Verzeichnis der verwendete Reagenziensets

Bezeichnung	Hersteller
<i>GenomeLab™ DTCS Quick Start Mix</i>	Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, US
<i>GenomeLab™ Size Standard Kit-600</i>	Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, US
QIAquick® <i>Gel Extraction Kit</i>	Qiagen, Hilden, DE
QIAquick® <i>PCR Purification Kit</i>	Qiagen, Hilden, DE

2.1.8 Primer

Tabelle 2.8: Verzeichnis der verwendeten *Primer* für Polymorphismen des *Ataxin-3*-Gens

Polymorphismus	<i>Primer</i>	5'-3'-Sequenz
A ⁶⁶⁹ /G ⁶⁶⁹ (AS M zu AS V)	Vorwärtsprimer	tactagagcttatt
	Rückwärtsprimer	cagagccctctgcaaactct
G ⁹⁸⁷ /C ⁹⁸⁷ (AS G zu AS R) C ¹¹¹⁸ /A ¹¹¹⁸ (AS Y zu Stopp)	Vorwärtsprimer	ggtaactgctcctaataccaggg
	Rückwärtsprimer	ccagtgactactttgattcg
Fragmentlängenbestimmung (CAG-Wiederholungen)	Vorwärtsprimer (Markierung: 5' Cy5)	ccagtgactactttgattcg
	Rückwärtsprimer	tggcctttcacatggatgtgaa

Tabelle 2.9: Verzeichnis der verwendeten *Primer* für Polymorphismen des *Park2*-Gens

Polymorphismus	<i>Primer</i>	5'-3'-Sequenz
G ⁶⁰¹ /A ⁶⁰¹ (AS S zu AS N)	Vorwärtsprimer	aaaggccctctgcaaagagt
	Rückwärtsprimer	tcattttctggcagctca
G ¹²³⁹ /C ¹²³⁹ (AS V zu AS L)	Vorwärtsprimer	ctgccgggaatgtaaagaag
	Rückwärtsprimer	ggaactctccatgacctcca
G ¹²⁸¹ /A ¹²⁸¹ (AS D zu AS N)	Vorwärtsprimer	ccgacgtacagggaaacataaa
	Rückwärtsprimer	ctgctcagcacagactcacc

2.1.9 Antikörper

Tabelle 2.10: Verzeichnis der verwendeten Antikörper

Name	Epitop	Art und Spezifität	Bestellnummer	Firma	Cisbio-Labeling
Anti-Ataxin-3-1H9	E214-L233	Monoklonaler IgG-Antikörper (AK) aus Maus; Detektiert in: Mensch, Affe, Ratte und Maus	MAB5360	Merck (Merck-Millipore), Darmstadt, DE	Detektion des expandierten Ataxin-3-Proteins: Terbi-umcryptat (Tb)-Label Detektion des Gesamt-Ataxin-3-Protein: D2-Label
Anti-Ataxin-3	N-terminale Aminosäuren 1-215	Polyklonaler IgG-AK aus Kaninchen; Detektiert in: Mensch	ab96316	abcam®, Cambridge, UK	Detektion von Gesamt-Ataxin-3-Protein: Tb-Label
MW1	PolyQ (\geq 15Q)	Monoklonaler AK; Detektiert in: Mensch	AB 528290	Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, Iowa, US	Detektion des expandierten Ataxin-3-Proteins: D2-Label
Anti-Parkin-PRK8	Zweite Ring Domäne (aa 399-465)	Monoklonaler IgG-AK aus Maus; Detektiert in: Mensch, Ratte, Maus und Drosophila C Virus	ab77924	abcam®, Cambridge, UK	Detektion des Parkin-Proteins: Tb-Label
Anti-Parkin		Polyklonaler IgG-AK aus Kaninchen; Detektiert in: Maus, Ratte und Mensch	ab87198	abcam®, Cambridge, UK	Detektion des Parkin-Proteins: D2-Label

2.1.10 Software und Internetressourcen

Tabelle 2.11: Verzeichnis der verwendeten Softwareprogramme und Internetressourcen

Anwendung	Name	Hyperlink/Hersteller
Geldokumentation	Argus X1 [®]	Biostep, Jahnstadt, DE
Literaturverwaltung	EndNote X9	Clarivate Analytics, Philadelphia, Pennsylvania, US
Photometerauswertung	Gen5 2.01	BioTek Instruments, Inc., Winnoski, Vermont, US
Publikationen	PubMed	https://www.ncbi.nlm.nih.gov
Sequenzierungen	<i>GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System</i>	Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, US
Statistikprogramm	Prism 8	GraphPad Software, Inc., San Diego, Kalifornien, US
<i>Time-resolved fluorescence energy transfer (TR-FRET) Messungen</i>	EnVision Manager Version 1.13.3009.1401	PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, US

2.2 Methoden

2.2.1 Blutentnahme

Die Blutentnahme dient der Gewinnung von Vollblut, um wiederum hieraus für die weiteren Schritte Lymphozyten zu extrahieren. Sie wird an den 24 SCA3-Patienten, an fünf asymptomatischen Familienmitgliedern mit möglicher Mutation (RISCA) und 31 gesunden Kontrollpersonen durchgeführt, die der Teilnahme in der Europa-weiten Studie *NeurOmics* schriftlich zugestimmt haben.

Der Arm des Probanden wird unter Stauung zum Auffinden einer geeigneten Punktionsstelle unter Ausschluss einer Entzündung hin inspiziert. Ist eine geeignete Vene gefunden, wird die Haut über dieser großzügig desinfiziert und die Vene mit einer *Butterfly*-Kanüle punktiert. Aufgefangen wird das Blut hierbei entweder in Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Röhrchen, in Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin (CPDA)-Röhrchen oder *Cell Preparation Tubes* (CPT)-Röhrchen. Für das letztgenannte Blutröhrchensystem muss beachtet werden, dass ein kompatibles Abnahmesystem für *Vacutainer* des Unternehmens *BD Sciences* (*BD Safety-Lok*[™] Blutentnahmeset) verwendet werden muss. Für die Lymphozytenisolierung wird jeweils eine A- und B-Probe der SCA3-Patienten und RISCA und jeweils eine Probe der Kontrollen isoliert. Um ein für das weitere Prozedere ausreichendes Volumen der Proben zu gewährleisten, müssen mindestens 15 ml Blut abgenommen werden. Direkt nach der Entnahme werden diese sechs bis acht Mal invertiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgt zunächst Röhrchensystemspezifisch (2.2.2). Bei der erstmaligen Blutentnahme soll außerdem ein EDTA-Röhrchen zur Extraktion von DNA mit abgenommen werden, um Analysen der verschiedenen Polymorphismen und der Anzahl der CAG-Wiederholungen in *Ataxin-3* durchführen zu können (ab 2.2.7).

2.2.2 Aufreinigung der Lymphozyten aus Vollblut

Aufreinigung der Lymphozyten aus EDTA- und CPDA-Röhrchen

Um möglichst viele Lymphozyten sauber aus Vollblut zu isolieren und die Ausbeute zu maximieren, soll die Aufreinigung innerhalb einer Stunde nach der Blutentnahme unter der Sterilbank durchgeführt werden.

Je Probe wird das Blut zweier Röhrchen in einen 50 ml Falcon gegeben, welcher dann mit Dulbecco's *Phosphate Buffered Saline* (DPBS) auf 35 ml Volumen aufgefüllt wird.

In einem zweiten 50 ml Falcon werden 15 ml Biocoll vorgelegt. Hierauf wird das Blut-PBS-Gemisch aus dem ersten Falcon vorsichtig mittels einer Stripette aufgeschichtet, sodass sich zwei Phasen bilden.

Anschließend wird das Falcon mit dem Biocoll-Blut-Gemisch bei 500 G für 30 Minuten zentrifugiert. Bei der Zentrifugation bindet das Biocoll die Erythrozyten in der unteren Phase, sodass nach der Zentrifugation die Lymphozyten zusammen mit dem DPBS aus diesem Falcon in einen neuen 50 ml Falcon mittels Stripette transferiert werden können. Die an Biocoll gebundenen Erythrozyten und Blutröhrchensysteme werden in den infektiösen Müll entsorgt.

Die abgenommenen Lymphozyten werden im 50 ml Falcon mit DPBS nochmals auf 50 ml Volumen aufgefüllt und für zehn Minuten bei 500 G zentrifugiert. Bei diesem Schritt setzen sich die Zellen als Pellet ab. Der Überstand wird mit einer Pasteurpipette abgesaugt und das Pellet in 7 ml Erylysepuffer resuspendiert, um es von eventuell vorhandenen Erythrozyten zu reinigen. Nach einer Inkubationszeit von sieben Minuten bei Raumtemperatur wird der Falcon wieder auf 50 ml Volumen mit DPBS aufgefüllt und erneut für zehn Minuten bei 500 G zentrifugiert. Nach nochmaligem Absaugen des Überstandes wird das Pellet in 1 ml Einfriermedium aufgenommen.

Die Suspension wird vom Falcon in ein *Cryotube* transferiert und in einer Isoopropanolbox für mindestens 24 Stunden bei -80 °C gelagert.

Aufreinigung der Proben aus CPT-Röhrchen

Nach der Blutentnahme müssen die Proben in den CPT-Röhrchen bei Raumtemperatur gelagert und innerhalb von zwei Stunden für 20 Minuten bei 1.500-1.800 G zentrifugiert werden, um eine optimale Lymphozytengewinnung zu gewährleisten. Da in den CPT-Röhrchen durch den Hersteller *BD Sciences* ein Trennmedium aus Ficoll und einer Polyesterbarriere vorgelegt ist, sind Erythrozyten vom Plasma und den Lymphozyten nach diesem Schritt bereits sauber getrennt. Dies erlaubt ein längeres Ruheintervall bis zu 24 Stunden zum

nächsten Verarbeitungsschritt und somit beispielsweise einen Versand der Proben aus anderen Zentren. Für diese Promotion und *NeurOmics* nutzte ein Zentrum diese Form des Versandes für die Bereitstellung von Proben. Die anschließende Aufreinigung findet unter der Sterilbank statt.

Im ersten Schritt können Plasma und *buffy coat* mit einer Stripette gesammelt und in ein 15 ml Falcon transferiert werden. Sollte die Probe versandt worden sein, muss sie vor diesem Schritt durch fünf- bis zehnmaliges Invertieren resuspendiert werden.

Das Falcon wird mit DPBS auf 15 ml Gesamtvolumen aufgefüllt und fünf Mal invertiert. Danach wird es bei 300 G 15 Minuten zentrifugiert. Bei diesem Schritt setzen sich die Lymphozyten als Pellet ab und das überstehende Plasma-DPBS-Gemisch kann mittels Pasteurpipette abgesaugt werden.

Das Pellet wird im nächsten Schritt mit 10 ml DPBS resuspendiert und die Probe somit gewaschen. Vor der nächsten Zentrifugation für zehn Minuten bei 300 G wird das Falcon wieder fünfmal invertiert. Danach kann wieder der überstehende Puffer bis zum Zellpellet abgesaugt werden. Dieses wird abschließend in 1 ml Einfriermedium resuspendiert, in ein *Cryotube* transferiert und in einer Isopropanolbox bei -80 °C für mindestens 24 Stunden eingefroren.

2.2.3 Lyse der Lymphozyten

Die bei -80 °C eingefrorene Lymphozyten-Probe wird bis zum Beginn des nächsten Schrittes auf Eis gelegt. Im Wasserbad wird sie dann für etwa 20 bis 30 Sekunden aufgetaut und unter der Sterilbank aus dem *Cryotube* in ein 15 ml Falcon überführt. Das *Cryotube* wird mit 1 ml DPBS nochmals gespült und das Gemisch ebenfalls in das 5 ml Falcon pipettiert. Das Falcon wird dann bei 300 G für fünf Minuten zentrifugiert.

Der Überstand über dem abgesetzten Pellet wird abgesaugt und das Pellet nochmals mit 1 ml DPBS gewaschen. Nachdem das Pellet über einen Vortexer in dem DPBS gelöst wird, kann es erneut bei 300 G für fünf Minuten zentrifugiert werden. Der Überstand wird wieder abgesaugt und die Probe dann auf Eis gelegt, da der nächste Schritt nicht mehr unter der Sterilbank erfolgt.

Je nach Volumen des Pellets wird nun der Probe 50 μ l-150 μ l Lyse-Puffer hinzugegeben, welches 1%-ig Triton[®] X 100 für die Zerstörung der Zellmembran enthält. Das Pellet wird mittels eines Vortexer im Puffer suspendiert, um eine komplette Lyse der Lymphozyten zu erreichen. Anschließend folgt eine 30-minütige Inkubation auf Eis, bei der die Probe nach zehn bzw. 20 Minuten nochmals gemischt wird. Nach der Inkubation wird die Suspension in ein *Cryotube* transferiert und bei -80 °C weggefroren.

2.2.4 Verdünnung der Lymphozyten für die Proteinbestimmung

Die bei -80 °C gelagerten lysierten Lymphozyten werden auf Eis gelegt und so schonend aufgetaut. Für die Messungen mit dem TR-FRET-Assay müssen sie noch mit einem Verdünnungspuffer aus DPBS und Protease-Inhibitoren (Complete) in einem Verhältnis von 1:2 verdünnt werden. Vor Entnahme des zu verdünnenden Volumens sollte das *Cryotube* nochmals einige Male invertiert oder mit dem Vortexer gemischt werden, damit sich eine homogene Mischung aus Zellen und Puffer ergibt. Nach Anfertigen der Verdünnung werden die unverdünnten Lymphozyten sofort wieder bei -80 °C weggefroren, wohingegen die Verdünnung bei -20 °C gelagert werden kann.

2.2.5 Bradford-Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung nach Bradford dient der Ermittlung der Gesamtproteinmenge der lysierten Lymphozyten (Bradford 1976). Bei jeder Messung muss neben den Proben eine Standardreihe mit einem Bovinem-Serum-Albumin (BSA)-Stock (10 mg/ml) gemessen werden. Hierfür wird dieses zunächst 1:10 verdünnt. Für die Standardreihe werden in separaten Reaktionsgefäßen Volumina des verdünnten BSA-Stocks mit den enthaltenen Massen von 0 μ g, 1 μ g (1 μ l), 2 μ g (2 μ l), 5 μ g (5 μ l), 10 μ g (10 μ l), 15 μ g (15 μ l) und 20 μ g (20 μ l) pipettiert und mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 800 μ l aufgefüllt.

Die verdünnten Lymphozyten werden aus dem -20 °C-Gefrierschrank geholt und auf Eis aufgetaut. Aus jeder Probe werden 5 μ l in je ein Reaktionsgefäß gegeben

und dieses Volumen ebenfalls mit Wasser auf 800 µl aufpipettiert. Anschließend werden die verdünnten Lymphozytenproben wieder bei -20°C weggefroren.

Nach Auffüllen der Proben mit Wasser auf ein 800 µl-Endvolumen werden diese für die weiteren Schritte auf Eis gestellt und zu jeder Probe 200 µl des Bradford-Reagenz (*Protein Assay Dye Reagent Concentrate*) pipettiert. Die Reihenfolge des Pipettierens sollte analog der sich anschließenden Messungen erfolgen, damit die Inkubationszeiten der Proben in etwa gleichbleiben. Dies ist wichtig, da der im Bradford-Reagenz enthaltene Farbstoff *Coomassie Brilliant Blue* Komplexe mit den basischen Aminosäuren Arginin, Lysin und Histidin der Proteine eingeht und die Komplexbildung bis zu ihrer Sättigung mit der Inkubationszeit zunimmt. Auf der Komplexbildung beruht auch die Proteinkonzentrationsbestimmung, da der Farbstoff sein Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm bei der Komplexbildung verschiebt und somit eine erhöhte Absorption bei 595 nm für eine höhere Proteinkonzentration spricht.

Für die Messung selbst gibt es nun zwei Möglichkeiten:

Die Proben werden aus den Reaktionsgefäßen komplett in eine Einmal-Küvette überführt. Die Küvette wird nun in das Photometer (Ultrospec® 3100pro) eingesetzt, die Wellenlänge auf 595 nm eingestellt und die Extinktion zweimalig gemessen.

Bei der zweiten Möglichkeit wird eine *96 Well Microplate* mit je einem Duplikat der Standardreihe und Proben mit einem Volumen von 100 µl beladen. Die Messung erfolgt wiederum im Photometer (MWG Sirius HT) bei einer Wellenlänge von 595 nm. Das weitere Vorgehen ist für beide Messmethoden wieder identisch: Die Werte der Leerprobe der Standardreihe werden als Referenzwert der weiteren Messungen genutzt und dementsprechend die anderen Messwerte, um diesen Wert reduziert (OD₅₉₅) (Tabelle 2.12).

Mit den korrigierten Werten der Standardreihe wird eine Eichkurve ermittelt (Abbildung 2.1), über die dann die Proteinkonzentrationen der verdünnten Lymphozytenproben bestimmt werden kann.

Tabelle 2.12: Exemplarische Messergebnisse einer Standardreihe

Protein-Menge (µg)	1. Messung	2. Messung	Mittelwert
0	0	0	0
1	0,158	0,156	0,157
2	0,116	0,115	0,1155
5	0,292	0,288	0,29
10	0,6	0,602	0,601
15	0,973	0,977	0,975
20	1,076	1,076	1,076

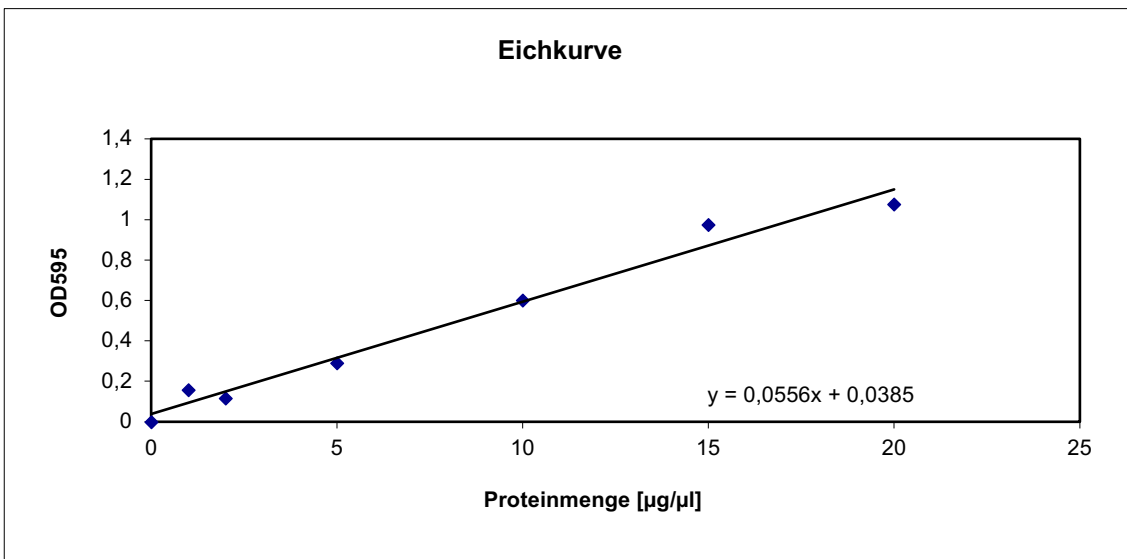


Abbildung 2.1: Exemplarische Eichkurve anhand der in Tabelle 2.12 dargestellten Messreihe

Aus den in Tabelle 2.12 dargestellten Werten kann über die erstellte Eichkurve für die Messwerte der Proben der lysierten Lymphozyten die Proteinmenge mittels der Steigung (hier: 0,0556) und des Achsenabschnittes (hier: 0,0385) berechnet werden.

Die Proteinmenge berechnet sich hier folgendermaßen:

$$\text{Proteinmenge } (\mu\text{g}) = \frac{\text{OD595} - \text{Steigung} \left(\frac{\Delta y}{\Delta x}\right)}{\text{Achsenabschnitt } (x_0)}$$

Für den TR-FRET-Assay ist jedoch die Proteinkonzentration von Relevanz, so dass diese abschließend folgendermaßen berechnet wird:

$$\text{Proteinkonzentration } \left(\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}}\right) = \frac{\text{Proteinmenge } (\mu\text{g})}{\text{Volumen der Lymphoprobe } (\mu\text{l}) / \text{Verdünnung}}$$

2.2.6 Time-resolved fluorescence energy transfer-Assay

Der TR-FRET-Assay ist eine hochempfindliche und spezifische Methode zur quantitativen Proteinbestimmung. Sie basiert, ähnlich dem *Western Blot*, über eine Bindung von Antikörpern (AK) und dem zu detektierenden Protein. Die hohe Sensitivität und Spezifität werden durch die Nutzung von zwei verschiedenen Antikörpern erreicht, welche beide spezifisch an dem zu analysierenden Protein binden müssen.

Diese werden von dem Unternehmen „Cisbio Bioassays“ (Codolet, FR) fluoreszenzmarkiert, sodass pro Protein ein Donormolekül mit Terbiumcryptat (Tb)- und ein Akzeptormolekül mit D2 markiert wird. Binden beide Antikörper an dem zu analysierenden Protein in räumlicher Nähe, kommt es zu einem Energietransfer von Donor- zu Akzeptormolekül (Abbildung 2.2). Dies führt wiederum dazu, dass das Akzeptormolekül Energiesignale abgibt, die mittels Laser detektiert werden. Da es nur bei Bindung beider Antikörper zu einem Energietransfer kommt, kann aus dessen Stärke auf die Konzentration des zu bestimmenden Proteins geschlossen werden (Nguyen et al. 2013).

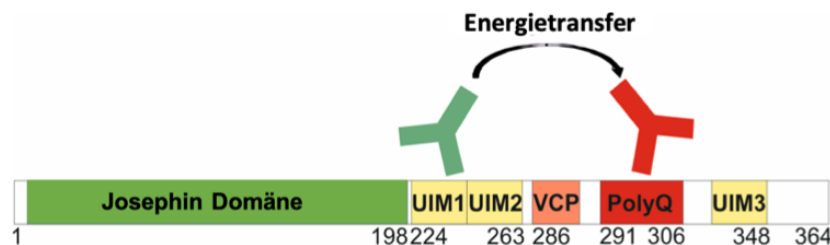


Abbildung 2.2: Beispielhafte Darstellung des Funktionsprinzips des TR-FRET für das expandierte Ataxin-3-Protein

Der Tb-markierte Anti-Ataxin-3-1H9-AK bindet an UIM 1, das sich in räumlicher Nähe zur PolyQ-Domäne des Proteins befindet. Dort bindet der D2-markierte MW1-AK ab einer Mindestlänge von 15 Glutaminen (15Q). Binden beide AK, kommt es zu einem Energietransfer des 1H9-AK zum MW1-AK. Dieser sendet nun wieder Energie aus, die als Signal von einem Laser erfasst wird. Die hohe Spezifität des Assays wird durch notwendige Bindung zweier AK erreicht, die hohe Sensitivität durch die Detektion eines Energiesignals mittels Laser. Je stärker das Signal durch den Energietransfer, desto höher ist die Konzentration des in diesem Beispiel dargestellten expandierten Ataxin-3-Proteins. Modifiziert nach Nguyen et al., 2013.

Der Assay wird in einer 384er-Well-Platte (PerkinElmer ProxiPlate™-384 Plus) durchgeführt, in welche zunächst die auf Eis aufgetauten Lymphozytenverdünungen (1:2) mit einem Volumen von 5 µl als Duplikat pipettiert werden. Zusätzlich werden die zu detektierenden Proteine in überexprimierter Form als Positiv-

bzw. DPBS als Negativkontrollduplikate ebenfalls mit einem Volumen von 5 µl in die Platte vorgelegt. Vor dem nächsten Schritt wird der Antikörper-Mix vorbereitet, der sich je nach Protein aus verschiedenen Antikörpern und Mengen zusammensetzt (Tabelle 2.13):

- Für das expandierte Ataxin-3-Protein wird der Tb-markierte Anti-Ataxin-3-1H9-Antikörper mit einer Konzentration von 0,3 ng und der D2-markierte MW1-Antikörper mit 0,5 ng pro *Well* eingesetzt
- Für die Detektion des Gesamt-Ataxin-3-Proteins (physiologische und expandierte polyQ-Domäne) wird der Tb-markierte N-terminale Anti-Ataxin-3-Antikörper mit einer Konzentration von 0,5 ng und der D2-markierte Anti-Ataxin-3-1H9-Antikörper mit 10 ng pro *Well* eingesetzt
- Für die Detektion des Parkin-Proteins wird der Tb-markierte Anti-Parkin PRK8-Antikörper mit einer Konzentration von 0,25 ng pro und der D2-markierte Anti-Parkin-Antikörper mit 5 ng pro *Well* eingesetzt

Die Antikörper sind aufgrund ihrer Fluoreszenzmarkierung vor Lichteinfluss geschützt schonend auf Eis aufzutauen und nach dem Pipettieren wieder zügig bei -80 °C zu verstauen.

Tabelle 2.13: Zusammensetzung des AK-Mix zur Proteindetektion

Protein	Antikörper	Stock-Konzentration	Masse pro Probe	Resultieren-des Volumen pro Probe
Expandiertes Ataxin-3-Protein	Tb-markierter Anti-Ataxin-3-1H9-AK	108 µg/ml	0,3 ng	0,0027 µl
	D2-markierter MW1-AK	211 µg/ml	10 ng	0,0474 µl
Gesamt-Ataxin-3-Protein	Tb-markierter Anti-Ataxin-3-AK	170 µg/ml	0,5 ng	0,00294 µl
	D2-markierter Anti-Ataxin-3-1H9-AK	167 µg/ml	10 ng	0,05988 µl

Parkin-Protein	Tb-markierter Anti-Parkin- PRK8-AK	116 µg/ml	0,25 ng	0,0022 µl
	D2-markierter Anti-Parkin-AK	311 µg/ml	5 ng	0,0161 µl

Sind alle zu messenden *Wells* der Platte mit der Probe und dem Antikörper-Mix befüllt, wird eine Probemessung im TR-FRET-Lesegerät (Envision Plattenlesegerät mit TRF-Laser) durchgeführt, um grobe Pipettierfehler zu ermitteln. Anschließend wird die Platte lichtgeschützt bei 4 °C für 24 Stunden inkubiert. Die Messung am Folgetag wird wieder mit dem TR-FRET Lesegerät durchgeführt. Das Donormolekül sendet ein langandauerndes fluoreszierendes Energiesignal mit einer maximalen Wellenlänge von 615 nm aus, welches wiederum das Akzeptormolekül erregt. Dieses sendet daraufhin anstelle eines kurzandauernden fluoreszierenden Eigensignals ein dauerhaftes fluoreszierendes Signal mit einer maximalen Wellenlänge von 665 nm aus. Um beide Signale zu erfassen, wird die Messung über zwei Kanäle unterschiedlicher Wellenlänge ebendieser beiden Frequenzen durchgeführt. Der Erregungsimpuls des Gerätes bei der Messung führt dazu, dass die unspezifischen kurzandauernden fluoreszierenden Signale der Matrix und das fluoreszierende Eigensignal des Akzeptors (vor dem FRET-Energietransfer) miterfasst werden (Abbildung 2.3). Um dieses zu vermeiden, muss eine Zeitspanne von 100 µs abgewartet werden, bevor im nächsten Zeitfenster von 300 µs die Signale gemessen werden (Tabelle 2.14).

Tabelle 2.14: TR-FRET Protokoll

Bezeichnung	Dauer/Wellenlänge
Emission 1	615 nm Europium
Emission 2	665 nm Allophycocyanin
Messverzögerung	100 µs
Messzeitfenster	300 µs

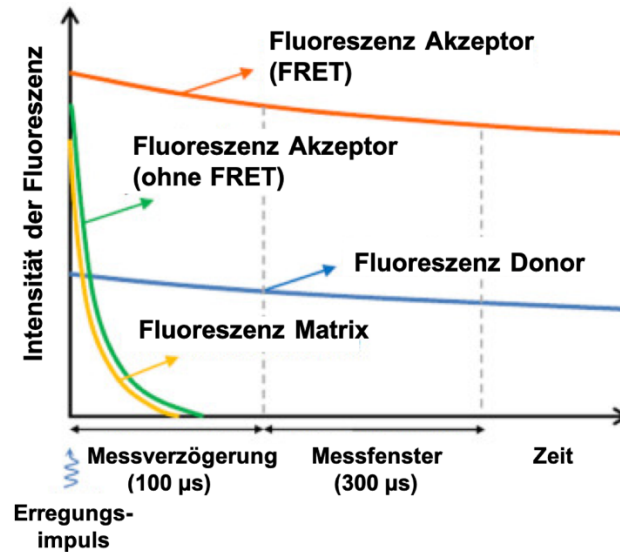


Abbildung 2.3: Intensität der verschiedenen Fluoreszenzsignale bei Messung des FRET-Signals

Nach einem Erregungsimpuls des Systems werden die verschiedenen Moleküle des Reaktionsansatzes angeregt und senden ein fluoreszierendes Signal aus. Die Matrix und die Akzeptormoleküle, die noch nicht durch das Donorsignal angeregt wurden, haben ein sehr kurzzeitiges Signal, das aber bei einer sofortigen Erfassung des Gesamtsignals das Messergebnis verfälscht. Deswegen soll eine Messverzögerung von 100 µs eingehalten werden. Das nachfolgende Messzeitfenster beträgt aufgrund des langsam abfallenden FRET-Akzeptor- und des Donorsignals 300 µs. Modifiziert nach Cui et al., 2014.

Für die weitere Auswertung wird das Verhältnis der gemessenen Werte der beiden verwendeten Kanäle gebildet:

$$Ratio = \frac{Channel\ 2}{Channel\ 1}$$

Von diesem Wert wird nun der Pipettierfehler der Duplikate berechnet. Um mit den Werten weiterarbeiten zu können, sollte er $\leq 10\%$ betragen. Danach wird der Mittelwert des Duplikats der Probe gebildet und von diesem wiederum der Mittelwert der Messwerte der Negativprobe abgezogen (ΔF):

$$\Delta F = \emptyset Ratio (Probe) - \emptyset Ratio (Negativprobe)$$

Abschließend wird ΔF mit der im Bradford-Assay ermittelten Gesamt-Proteinkonzentration in Verhältnis gesetzt:

$$\Delta F_c = \frac{\Delta F}{\text{Proteinkonzentration} \left(\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}} \right)}$$

Die so relativ zur Gesamtproteinkonzentration ermittelte Menge des zu detektierenden Proteins wird weiter für die statistischen Auswertungen genutzt.

2.2.7 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dient der Amplifizierung eines bestimmten Genabschnittes. Sie ist der erste Schritt um weiterführende Analysen wie Sequenzierungen zu der Detektion von Polymorphismen oder Fragmentlängenbestimmungen, bei der die Anzahl der CAG-Wiederholungen ermittelt wird, durchzuführen.

Das Prinzip beruht auf der thermischen Trennung der DNA-Stränge bei etwa 95 °C, sodass kodogener und kodierender Strang einzeln vorliegen. Durch ein Herabsenken der Temperatur kommt es im nächsten Schritt zum Andocken, dem *Annealing*, der *Primer* (je einen für kodogenen und kodierenden Strang), an die die hitzestabile DNA-Polymerase (*Taq*) binden kann. Durch eine leichte Erhöhung der Temperatur kann die *Taq* mittels hinzugegebener freier Nukleotide, einem Nukleotidmix (dNTPs), die Replikation im Sinne einer Elongation vom 5' zum 3' Ende durchführen. Dies bedeutet, dass die Replikation am kodogenen Strang kontinuierlich und die Replikation am kodierenden Strang diskontinuierlich abläuft. Die Zyklen der Denaturierung, des *Annealings* der *Primer* und der Elongation werden etwa 30 bis 40 Mal wiederholt, sodass eine exponentielle Vermehrung des gewünschten Fragmentes erreicht wird.

Isolierung der DNA

Die DNA-Isolierung aus dem abgenommenen EDTA-Blut haben freundlicherweise die medizinisch-technischen Angestellten des Instituts für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik und Yvonne Theurer aus dem Hertie-Institut des Universitätsklinikums Tübingen vorgenommen und für die verschiedenen Analysen zur Verfügung gestellt.

PCR der *Park2*-Polymorphismen G⁶⁰¹/A⁶⁰¹, G¹²³⁹/C¹²³⁹ und G¹²⁸¹/A¹²⁸¹

Zu den zu analysierenden DNA-Proben müssen pro Probe folgende Chemikalien in der PCR-Ansatz pipettiert werden (Tabelle 2.15):

Tabelle 2.15: Inhalte des PCR-Ansatzes pro Probe zur Amplifikation der *Park2*-Polymorphismen G⁶⁰¹/A⁶⁰¹, G¹²³⁹/C¹²³⁹ und G¹²⁸¹/A¹²⁸¹

Substanz	Menge
DNA der Probe/Wasser (Negativprobe)	2 µl
Wasser	13,3 µl
Puffer 10x (Qiagen)	2 µl
dNTPs	0,5 µl
Exonspezifischer Vorwärtsprimer	1 µl
Exonspezifischer Rückwärtsprimer	1 µl
<i>Taq</i> (Qiagen)	0,2 µl
Gesamtvolumen Ansatz	20 µl

Die *Taq* sollte im Eisblock dazu pipettiert werden, um einer Wirkungsabschwächung durch Wärme vorzubeugen und nach Nutzung wieder bei -20 °C gelagert werden. Nach Befüllen der PCR-*Stripes* mit dem vollständigen Ansatzvolumen wird die PCR im Zykler gestartet. Folgendes Programm muss hierfür programmiert werden (Tabelle 2.16):

Tabelle 2.16: Zykler-Programm zur PCR der *Park2*-Polymorphismen G⁶⁰¹/A⁶⁰¹, G¹²³⁹/C¹²³⁹ und G¹²⁸¹/A¹²⁸¹

Schritt	Zyklen	Temperatur	Dauer
Denaturierung		95 °C	5 min
<i>Touchdown</i>	10x	95 °C	30 sec
		65 °C – 55 °C	30 sec
		72 °C	30 sec
Replikations-Zyklen	25x	95 °C	30 sec
		55 °C	30 sec
		72 °C	30 sec
Finale Elongation		72 °C	7 min
Lagerung		10 °C	∞

Nach Ablauf der PCR kann die replizierte DNA bei 5 °C-10 °C bis zu den weiteren Schritten gelagert werden.

PCR des *Ataxin-3*-Polymorphismus A⁶⁶⁹/G⁶⁶⁹

Zu den zu analysierenden DNA-Proben müssen pro Probe folgende Chemikalien in der PCR-Ansatz pipettiert werden (Tabelle 2.17):

Tabelle 2.17: Inhalte des PCR-Ansatzes pro Probe zur Amplifikation des *Ataxin-3*-Polymorphismus A⁶⁶⁹/G⁶⁶⁹

Substanz	Menge
DNA der Probe/Wasser (Negativprobe)	1,5 µl
Wasser	14,3 µl
10x Puffer (Biotherm)	2 µl
dNTPs	0,4 µl
Vorwärtsprimer	1 µl
Rückwärtsprimer	1 µl
<i>Taq</i> (Biotherm)	0,2 µl
Gesamtvolumen Ansatz	20,4 µl

Die *Taq* sollte erneut im Eisblock dazu pipettiert werden, um einer Wirkungsabschwächung durch Wärme vorzubeugen und nach Nutzung wieder bei -20 °C gelagert werden. Nach dem Befüllen der PCR-*Stripes* mit dem vollständigen Ansatzvolumen wird die PCR im Zykler gestartet. Folgendes Programm muss hierfür programmiert werden (Tabelle 2.18):

Tabelle 2.18: Zykler-Programm zur PCR des *Ataxin-3*-Polymorphismus A⁶⁶⁹/G⁶⁶⁹

Schritt	Zyklen	Temperatur	Dauer
Denaturierung		94 °C	5 min
Replikations-Zyklen	30x	94 °C	60 sec
		56 °C	60 sec
		72 °C	60 sec
Finale Elongation		72 °C	5 min
Lagerung		10 °C	∞

Nach Ablauf der PCR kann die replizierte DNA bei 5 °C-10 °C bis zu den weiteren Schritten gelagert werden.

PCR der *Ataxin-3*-Polymorphismen G⁹⁸⁷/C⁹⁸⁷ und C¹¹¹⁸/A¹¹¹⁸

Zu den zu analysierenden DNA-Proben müssen pro Probe folgende Chemikalien in der PCR-Ansatz pipettiert werden (Tabelle 2.19):

Tabelle 2.19: Inhalte des PCR-Ansatzes pro Probe zur Amplifikation der *Ataxin-3*-Polymorphismen G⁹⁸⁷/C⁹⁸⁷ und C¹¹¹⁸/A¹¹¹⁸

Substanz	Menge
DNA der Probe/Wasser (Negativprobe)	1,5 µl
Wasser	24 µl
Puffer (PWO)	3 µl
dNTPs	0,33 µl
Vorwärtsprimer	0,66 µl
Rückwärtsprimer	0,66 µl
<i>Taq</i> (PWO)	0,2 µl
Gesamtvolumen Ansatz	30,35 µl

Die *Taq* sollte wieder im Eisblock dazu pipettiert werden, um einer Wirkungsschwächung durch Wärme vorzubeugen und nach Nutzung wieder bei -20 °C gelagert werden. Nach Befüllen der PCR-Stripes mit dem vollständigen Ansatzvolumen wird die PCR im Zykler gestartet. Folgendes Programm muss hierfür programmiert werden (Tabelle 2.20):

Tabelle 2.20: Zykler-Programm zur PCR der *Ataxin-3*-Polymorphismen G⁹⁸⁷/C⁹⁸⁷ und C¹¹¹⁸/A¹¹¹⁸

Schritt	Zyklen	Temperatur	Dauer
Denaturierung		94 °C	5 min
<i>Touchdown</i>	10x	94 °C	30 sec
		65 °C – 55 °C	30 sec
		68 °C	45 sec
Replikations-Zyklen	25x	94 °C	30 sec
		55 °C	30 sec
		68 °C	45 sec
Finale Elongation		68 °C	5 min
Lagerung		10 °C	∞

Nach Ablauf der PCR kann die replizierte DNA bei 5 °C-10 °C bis zu den weiteren Schritten gelagert werden.

PCR zur CAG-Wiederholungen-Fragmentlängenbestimmung in *Ataxin-3*

Zu den zu analysierenden DNA-Proben müssen pro Probe folgende Chemikalien in der PCR-Ansatz pipettiert werden (Tabelle 2.21):

Tabelle 2.21: Inhalte des PCR-Ansatzes pro Probe zur CAG-Wiederholungen-Fragmentlängenbestimmung in *Ataxin-3*

Substanz	Menge
DNA der Probe/ Wasser (Negativprobe)	2 µl
Wasser	11,4 µl
Puffer 10x (Qiagen)	2 µl
dNTPs	0,4 µl
Q-Solution	4 µl
Vorwärtsprimer	1 µl
Rückwärtsprimer	1 µl
<i>Taq</i> (Qiagen)	0,2 µl
Gesamtvolumen Ansatz	22 µl

In diesem Ansatz ist der Vorwärtsprimer fluoreszenzmarkiert und soll daher lichtgeschützt hinzugegeben werden. Wird lichtgeschützt gearbeitet, kann im weiterführenden Schritt ein ausreichend hohes Signal detektiert werden. Außerdem ist es wichtig die *Taq* gekühlt in den Ansatz zu pipettieren, um eine möglichst hohe Ausbeute des replizierten Fragmentes zu erhalten. Nach Befüllen der PCR-Stripes mit dem vollständigen Ansatzvolumen wird die PCR im Zyklus gestartet. Folgendes Programm muss hierfür programmiert werden (Tabelle 2.22):

Tabelle 2.22: Zyklus-Programm zur PCR zur CAG-Wiederholungen-Fragmentlängenbestimmung in *Ataxin-3*

Schritt	Zyklen	Temperatur	Dauer
Denaturierung		94 °C	5 min
Replikations-Zyklen	30x	94 °C	60 sec
		60 °C	60 sec
		72 °C	120 sec
Finale Elongation		72 °C	10 min
Lagerung		10 °C	∞

Nach Ablauf der PCR muss die replizierte DNA bei 5 °C-10 °C lichtgeschützt bis zu den weiteren Schritten gelagert werden.

Um eine Kontamination mit DNA in einer der benutzten Substanzen rechtzeitig zu erkennen, soll stets eine Negativprobe mit im Zyklus laufen gelassen werden. Diese kann im nächsten Schritt der Gelelektrophorese erkannt werden.

2.2.8 Gelelektrophorese

Detektion der PCR-Produkte der *Park2*-Polymorphismen G⁶⁰¹/A⁶⁰¹, G¹²³⁹/C¹²³⁹ und G¹²⁸¹/A¹²⁸¹ sowie des Polymorphismus A⁶⁶⁹/G⁶⁶⁹ in *Ataxin-3*

Zum Nachweis der replizierten DNA-Fragmente und somit einer erfolgreichen PCR wird eine Gelelektrophorese durchgeführt. Hierfür wird ein 1%-iges Agarosegel mit 1x Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE) gegossen, zu welchem GelRed™ 1:40000 µl oder Ethidiumbromid 1:20.000 µl hinzugegeben wird. Aus dem PCR-Produkt werden 5 µl der Probe entnommen und in ein Reaktionsgefäß zusammen mit 5 µl 6x Ladepuffer pipettiert. Wenn das Gel fest geworden ist, wird jede Probe in eine Tasche hinein pipettiert und das Gel im TBE-Bad an eine Spannungsquelle angeschlossen. Die negativ geladene DNA wandert im Spannungsfeld auf die positiv geladene Anode zu. Je länger das Fragment der PCR, oder je niedriger die Spannung des Feldes, desto langsamer diffundiert die DNA Richtung Anode. In die erste Tasche wird ein Bandenmarker, peqGOLD, *DNA-ladder* Mix, hinzugegeben, mit dem die Fragmentlänge ermittelt werden kann (Abbildung 2.4).

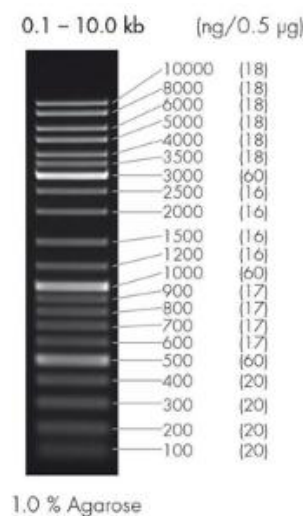


Abbildung 2.4: Bandenmarker peqGOLD *DNA-ladder* Mix

Die durch den Hersteller angegebene Legende zur Anzahl der Basen, die das PCR-Produkt einer entsprechenden Bande enthält (VWR Chemicals, 2019).

Ethidiumbromid bzw. GelRed™ interkaliert in den DNA-Doppelsträngen und absorbiert UV-Licht, was wiederum zu einer Verstärkung der Fluoreszenz der beiden Stoffe führt und somit zu einer Sichtbarmachung der DNA-Bande. Durch die Banden des Markers kann abgeschätzt werden, ob sich die Banden bereits gut aufgetrennt haben. Ist in jeder Tasche, außer der Negativprobe, eine Bande zu erkennen, kann von einer erfolgreichen PCR ausgegangen und mit der restlichen Probe weitergearbeitet werden (Abbildung 2.5).

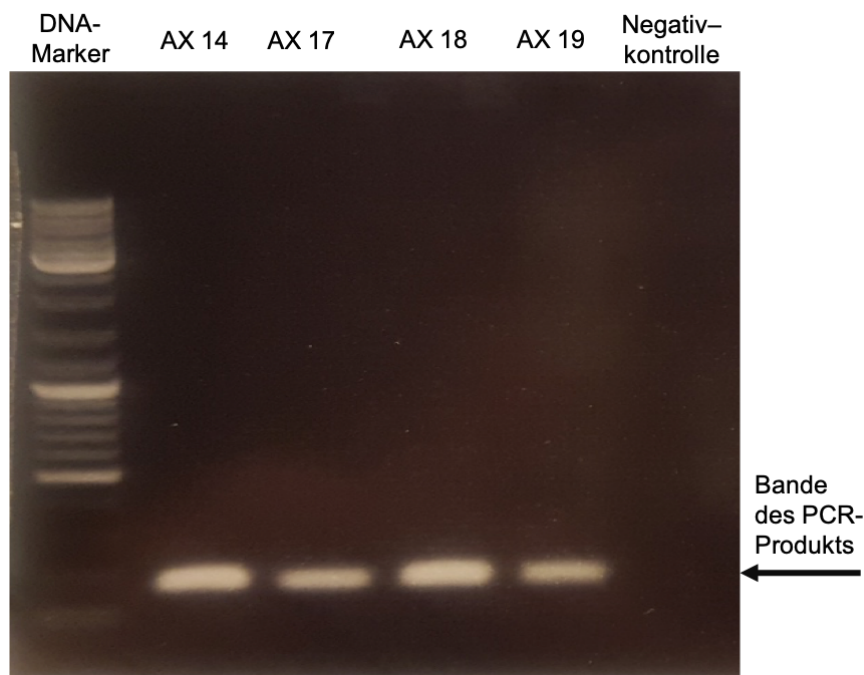


Abbildung 2.5: Gelbild einer PCR zum *Park2*-Polymorphismus G¹²³⁹/C¹²³⁹

Die Taschen sind oben im Bild, die Anode befindet sich unterhalb der Banden, somit ist die Laufrichtung der DNA von oben nach unten. Ganz links ist der Bandenmarker zu erkennen. Die Fragmentlänge beträgt 163 Basenpaare. In der Spur der Tasche am rechten Bildrand ist keine Bande zu erkennen. Sie ist mit der Wasserprobe als Negativkontrolle befüllt worden.

Detektion der PCR-Produkte der *Ataxin-3*-Polymorphismen G⁹⁸⁷/C⁹⁸⁷ und C¹¹¹⁸/A¹¹¹⁸

Es wird ebenfalls ein 1%-iges Agarosegel mit TBE gegossen, dem GelRed™ oder Ethidiumbromid hinzugefügt wird. Im Gegensatz zu den vorher beschriebenen PCR-Produkten wird hier das komplette PCR-Produkt in die Geltasche zusammen mit 10 µl 6x Ladepuffer pipettiert.

Nach Ablauf der Gelelektrophorese können unter dem UV-Licht zwei Banden detektiert werden, da ein expandiertes und ein physiologisches Allel vorliegen

(Abbildung 2.6). Für die weiteren Schritte müssen die Allele separat analysiert werden, sodass die Banden, die zusammen das komplette PCR-Produkt beinhalten, aus dem Gel geschnitten werden müssen und in einem Reaktionsgefäß für die weiteren Schritte verwahrt werden.

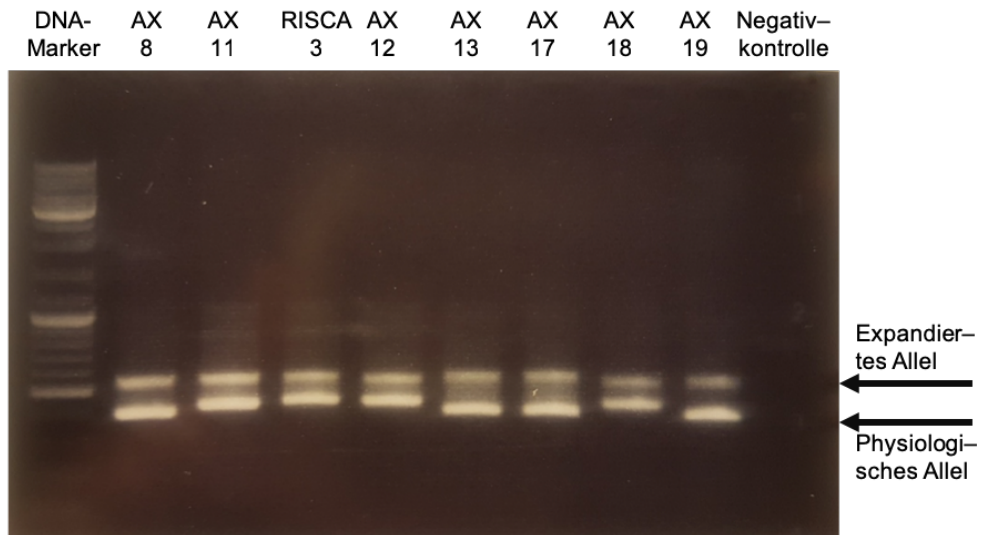


Abbildung 2.6: Gelbild einer PCR zu den *Ataxin-3*-Polymorphismen G^{987}/C^{987} und C^{1118}/A^{1118}

Aufgrund der verschiedenen Längen der Allele bilden sich zwei Banden, wobei das expandierte Allel nicht so schnell Richtung Anode zieht wie das physiologische Allel. Somit gehört die obere Bande zum expandierten Allel. Die untere Bande des physiologischen Allels ist stärker ausgeprägt, da die DNA-Polymerase das expandierte Allel nicht so effizient replizieren kann und es hier zu einem quantitativen Unterschied kommt.

2.2.9 Aufreinigung der PCR-Produkte

Eine Aufreinigung des PCR-Produktes ist notwendig, da beispielweise noch die *Primer*, der Puffer und die DNA-Polymerase aus dem PCR-Reaktionsansatz enthalten sind. Diese müssen vor Ansatz der Sequenzierungsreaktion zunächst entfernt werden, um Interaktionen und somit eine unsaubere Sequenzierung zu vermeiden.

Aufreinigung der PCR-Produkte der *Park2*-Polymorphismen G^{601}/A^{601} , G^{1239}/C^{1239} und G^{1281}/A^{1281} sowie des *Ataxin-3*-Polymorphismus A^{669}/G^{669}

Zur Aufreinigung der PCR wird das QIAquick® *PCR Purification Kit* verwendet. Dem PCR-Produkt wird das fünffache seines Volumens an PB1-Puffer hinzugegeben und das gesamte Volumen in die Säule der Zentrifugationsbehältnisse des

Kits transferiert, die in einem Auffangbehälter eingebettet ist. In der Säule ist Kieselgel eingebracht, an das die DNA adsorbiert. Diese Bindung führt dazu, dass bei der nachfolgenden Zentrifugation die DNA im Gegensatz zu den anderen Stoffen des PCR-Ansatzes nicht durch die Membran hindurchdiffundiert. Es wird für eine Minute bei 17.900 G zentrifugiert. Die Flüssigkeit im Auffangbehälter des Gefäßes kann verworfen werden, da die DNA an der Membran gebunden ist. Im nächsten Schritt werden 750 µl PE-Puffer in das Behältnis pipettiert. Nach einer weiteren einminütigen Zentrifugation bei 17.900 G wird die Flüssigkeit im Auffangbehälter erneut verworfen. Um das im PE-Puffer vorhandene Ethanol von der Probe zu trennen, wird eine erneute Zentrifugation bei 17.900 G für eine Minute durchgeführt, wobei nach diesem Schritt der gesamte Auffangbehälter verworfen werden kann. Die Säule wird nun in ein Reaktionsgefäß gesetzt und es wird, je nach Bandenstärke bei der vorherigen Gelelektrophorese, zwischen 20 µl und 50 µl Elutionspuffer in die Säule pipettiert. Abschließend wird eine letzte einminütige Zentrifugation bei 17.900 G vorgenommen, bei der sich die aufgereinigte DNA abschließend im Reaktionsgefäß befindet. Die Säule wird verworfen und das Ergebnis der Aufreinigung mittels Gelelektrophorese überprüft.

Aufreinigung der PCR-Produkte der *Ataxin-3*-Polymorphismen der G⁹⁸⁷/C⁹⁸⁷ und C¹¹¹⁸/A¹¹¹⁸

Nach der Detektion der Banden der beiden Allele müssen diese, da das gesamte PCR-Produkt in das Gel eingesetzt wird, getrennt in expandierte und physiologische Allele ausgeschnitten werden. Die ausgeschnittenen Banden werden in Reaktionsgefäße transferiert und mit dem QIAquick® Gel *Extraction Kit* weiterverarbeitet.

Zunächst muss die Masse der ausgeschnittenen Banden gewogen werden, um die Menge des im nächsten Schritt hinzu pipettierten QB-Puffers zu ermitteln. Es ist davon auszugehen, dass 100 mg Masse einem Volumen von 100 µl entsprechen und pipettiert das dreifache Volumen, aber maximal 400 µl, QB-Puffer in das Reaktionsgefäß mit der Gel-Bande-Mischung. Danach werden die Reaktionsgefäße bei 50 °C für zehn Minuten im Schüttelheizblock inkubiert. Das Gel löst sich in dieser Zeit im Puffer auf und dem Gemisch wird das einfache Volumen

zur vorher gewogenen Masse der Bande (100 mg \cong 100 μ l) an Isopropanol dazu pipettiert.

Der Inhalt des Reaktionsgefäßes wird in ein im Kit enthaltenes Zentrifugationsbehältnis pipettiert, das aus einer Säule und einem Auffangbehälter besteht. Es folgt eine Zentrifugation für eine Minute bei 17.900 G. Die Flüssigkeit im Auffangbehälter kann nach der Zentrifugation verworfen werden. Auf die Säule wird im weiteren Schritt 750 μ l PE-Puffer pipettiert und es folgt eine weitere einminütige Zentrifugation bei 17.900 G. Die Flüssigkeit des Auffangbehältnisses kann wieder verworfen werden. Um das im PE-Puffer gelöste Ethanol von der Probe zu trennen, wird eine erneute Zentrifugation bei 17.900 G für eine Minute durchgeführt, wobei nach diesem Schritt der gesamte Auffangbehälter verworfen werden kann. Die Säule wird in ein Reaktionsgefäß gesetzt und es wird, je nach Bandenstärke bei der Gelelektrophorese, zwischen 20 μ l und 50 μ l Elutionspuffer in die Säule pipettiert. Abschließend wird eine letzte einminütige Zentrifugation bei 17.900 G vorgenommen, bei der sich die aufgereinigte DNA abschließend im Reaktionsgefäß befindet. Die Säule wird verworfen und das Ergebnis der Aufreinigung mittels Gelelektrophorese überprüft.

Detektion der aufgereinigten PCR-Produkte

Nach der Aufreinigung wird ebenfalls mittels Gelelektrophorese auf einem 1%-igem Agarosegel mit TBE geprüft, ob noch genügend Probe für eine Sequenzierung vorhanden ist. Sind klare Banden unter dem UV-Licht zu erkennen, kann eine Sequenzierung durchgeführt werden.

2.2.10 Sequenzierungsreaktion der Polymorphismen

Im nächsten Schritt wird die Basenfolge des Fragments mittels der Sequenzierung ermittelt. Hierbei sind vor allem die Basen, die einen bekannten Polymorphismus darstellen, von Interesse. Ähnlich einer PCR wird hierfür eine Replikation durchgeführt. Im Unterschied zu dieser werden zusätzlich zu den dNTPs auch ddNTPs hinzugegeben, die ein Weiterarbeiten der *Taq* nach ihrem Einbau stoppen, da die Ribose an Position 2' und 3' desoxidiert ist. Da diese an unterschiedlichen Stellen des generierten Stranges eingebaut werden, entstehen viele

unterschiedlich lange Fragmente. Die ddNTPs sind fluoreszenzmarkiert, sodass diese als letzte Base das Ende eines Fragments markieren. Im Sequenziergerät werden die Fragmente der Länge nach analysiert und die Basenfolge ermittelt.

Sequenzierungsansatz der aufgereinigten PCR-Produkte der *Park2*-Polymorphismen G^{601}/A^{601} , G^{1239}/C^{1239} und G^{1281}/A^{1281} sowie des *Ataxin-3*-Polymorphismus der A^{669}/A^{669}

Anhand des Bandensignals der Gelelektrophorese nach der Aufreinigung wird die Menge der eingesetzten DNA in dem Sequenzierungsansatz abgeschätzt. Sie kann zwischen 5 µl und 11 µl betragen. Werden weniger als 11 µl DNA verwendet, wird das Volumen mit Wasser auf 11 µl aufgefüllt. Das Wasser-PCR-Produkt-Gemisch wird in ein PCR-*Stripe* pipettiert und bei 95 °C im Zykler zunächst für drei bis fünf Minuten denaturiert. Später werden je nach Polymorphismus folgende Substanzen hinzugegeben (Tabelle 2.23):

Tabelle 2.23: Inhalte des Sequenzierungsansatzes pro Probe der *Park2*-Polymorphismen G^{601}/A^{601} , G^{1239}/C^{1239} und G^{1281}/A^{1281} sowie des *Ataxin-3*-Polymorphismus A^{669}/G^{669}

Substanz			Menge
DNA und Wasser			11 µl
Betain			2 µl
DTCS-Mix			3 µl
Primer	<i>Park2</i>	G^{601}/A^{601} : Vorwärtsprimer	1,2 µl
		G^{1239}/C^{1239} : Vorwärtsprimer	
		G^{1281}/A^{1281} : Rückwärtsprimer	
	<i>Ataxin-3</i>	A^{669}/G^{669} : Rückwärtsprimer	
Gesamtvolumen Ansatz			17,2 µl

Betain und der DTCS-Mix sind im „*GenomeLab™ DTCS Quick Start Mix*“ Kit enthalten. DTCS setzt sich aus der *Taq*, Puffer, dNTPs und den fluoreszenzmarkierten ddNTPs zusammen, weswegen es lichtgeschützt und gekühlt verwendet werden muss.

Sequenzierungsansatz der aufgereinigten PCR-Produkte der *Ataxin-3*-Polymorphismen der G⁹⁸⁷/C⁹⁸⁷ und C¹¹¹⁸/A¹¹¹⁸

Anhand des Bandensignals der Gelelektrophorese nach der Aufreinigung wird die Menge der eingesetzten DNA für den Sequenzierungsansatz abgeschätzt und beträgt zwischen 5 µl und 11 µl. Gegebenenfalls wird ebenfalls mit Wasser auf ein Gesamtvolumen auf 11 µl auf pipettiert. Nach der drei- bis fünfminütigen Denaturierung im Zykler bei 95 °C, werden folgende Stoffe dem Wasser-PCR-Produkt-Gemisch hinzugefügt (Tabelle 2.24):

Tabelle 2.24: Inhalte des Sequenzierungsansatzes pro Probe der der *Ataxin-3*-Polymorphismen der G⁹⁸⁷/C⁹⁸⁷ und C¹¹¹⁸/A¹¹¹⁸

Substanz	Menge
DNA und Wasser	11 µl
Q-Solution	4 µl
DTCS-Mix	4 µl
Vorwärtsprimer	1 µl
Gesamtvolumen Ansatz	20 µl

Der DTCS-Mix ist im „*GenomeLab™ DTCS Quick Start Mix*“ Kit enthalten und setzt sich aus der *Taq*, Puffer, dNTPs und den fluoreszenzmarkierten ddNTPs zusammen, weswegen es lichtgeschützt und gekühlt verwendet werden muss.

Sequenzierungsreaktion

Die Sequenzierungsreaktion findet im Zykler statt und wird mit folgenden Schritten programmiert (Tabelle 2.25):

Tabelle 2.25: Zykler-Programm zur Sequenzierungsreaktion

Schritt	Zyklen	Temperatur	Dauer
Denaturierung		94 °C	1 min 30 sec
Replikations-Zyklen	31x	96 °C	20 sec
		57 °C	20 sec
		60 °C	1 min
Lagerung		10 °C	∞

Das Reaktionsprodukt muss bei 5 °C-10 °C sowie lichtgeschützt gelagert werden.

Aufreinigung des Sequenzierungsreaktionsproduktes

Um ein gutes Sequenzierergebnis ohne Störsignale zu erhalten, müssen die im Sequenzierungsansatz verwendeten Chemikalien wie Puffer, *Taq* oder *Primer* vorher entfernt werden. Außerdem läuft die im Zyklus thermisch katalysierte Sequenzierungsreaktion weiter, sodass diese zunächst gestoppt werden muss. Hierfür wird folgender Stopp-Mix in 10 µl jedes Ansatzes pipettiert (Tabelle 2.26):

Tabelle 2.26: Inhalte des Stopp-Mixes zur Unterbrechung der Sequenzierungsreaktion pro Probe

Substanz	Menge
Wasser	10 µl
3 M Natrium-Acetat	2,2 µl
100 mM Natrium-EDTA	2,2 µl
Glycogen	1,1 µl

Das Glycogen ist im „*GenomeLab™ DTCS Quick Start Mix*“ Kit enthalten. Sind Stopp-Mix und Sequenzierungsansatz im Reaktionsgefäß, werden 60 µl eiskaltes 100%-iges Ethanol zu jeder Probe pipettiert und die Reaktionsgefäße bei voller Geschwindigkeit für 30 Minuten zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wird das Ethanol aus den Reaktionsgefäßen vorsichtig dekantiert, wobei nicht das DNA-Pellet, das unten im Reaktionsgefäß ausfällt, mitentfernt werden darf. Anschließend werden 190 µl eiskalter 70%-iger Ethanol in die Reaktionsgefäße pipettiert und sie werden nochmals bei voller Geschwindigkeit für 20 Minuten zentrifugiert. Nach nochmaligem Dekantieren des Ethanols werden 90 µl eiskalter 70%-iger Ethanol in die Reaktionsgefäße pipettiert und es wird abschließend für 15 Minuten bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert. Nachdem das Ethanol wieder dekantiert wurde, werden die Pellets in der Vakuumzentrifuge bei 31 °C für zwölf Minuten getrocknet.

Nach dem Trocknen werden 42 µl des SLS-Puffers aus dem „*GenomeLab™ DTCS Quick Start Mix*“ Kit auf die Pellets pipettiert und die Reaktionsgefäße

gevoertext. Anschließend lässt wird das Gemisch für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert.

Beladen des Sequenziergerätes und Starten der Analyse

Nach der 30-minütigen Inkubation der Proben, werden diese in die *Wells* der Probenplatte des Sequenzierers, CEQ 8000, mit je 40 µl Volumen pipettiert. Abschließend wird noch je ein Tropfen Öl des „*GenomeLab™ DTCS Quick Start Mix*“ Kits hinzugegeben, um einer Verdampfung der Proben vorzubeugen. Auf die zweite Platte wird in die identischen *Wells* ein Puffer für das Sequenziergerät geladen, dann kann er beladen und das „LFR-b“-Programm gestartet werden (Tabelle 2.27):

Tabelle 2.27: Sequenzierungsprogramm „LFR-b“

Schritt	Temperatur/Spannung	Dauer
Kapillare	57 °C	-
Denaturierung	90 °C	2 min
Injektion	2,0 kV	15 sec
Trennung	6,0 kV	60 min

Auswertung der Sequenzierung

Nachdem die Sequenzierung beendet ist, können in der Software des Sequenziergerätes, „*GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System*“, mittels Matrizen des jeweiligen Genabschnittes die Polymorphismen überprüft und die Basen notiert werden. Ebenso wird die Qualität der Sequenzierung beurteilt.

2.2.11 CAG-Wiederholungen-Fragmentlängenanalyse in *Ataxin-3*

Das PCR-Produkt der CAG-Wiederholungen-Fragmentlängenanalyse wird nicht wie die anderen PCR Produkte in einer Gelelektrophorese detektiert oder aufgereinigt, sondern direkt weiter für die Sequenzierung verwendet.

Zunächst wird das PCR-Produkt 1:5 mit Wasser verdünnt und hiervon 5 µl direkt in die Probenplatte des Sequenzierers pipettiert. Zu jeder Probe werden 34,5 µl des SLS-Puffers aus dem „*GenomeLab™ DTCS Quick Start Mix*“ Kit

hinzugegeben und 0,5 µl 600-STD-Marker aus dem „GenomeLab™ Size Standard Kit–600“. In jedes *Well* wird wieder ein Tropfen Öl, als Schutz gegen das Verdampfen, aus dem „GenomeLab™ DTCS Quick Start Mix“ Kit hinzugefügt und die entsprechenden *Wells* der Pufferplatte des Sequenzierers mit dem Puffer befüllt. Danach kann der Sequenzierer beladen und das Programm Frag-2 (Tabelle 2.28) gestartet werden.

Tabelle 2.28: Programm der Fragmentlängenbestimmung „Frag-2“

Schritt	Temperatur/Spannung	Dauer
Kapillare	35 °C	-
Denaturierung	90 °C	2 min
Injektion	2,0 kV	30 sec
Trennung	6,0 kV	60 min

Nach Abschluss des Programms kann in der Software des Sequenzierers die Fragmentlängenbestimmung vorgenommen werden. Durch den 600-STD-Marker kann das Programm messen, wie lange das analysierte PCR-Produkt ist und damit darstellen, wie viele CAG-Wiederholungen das analysierte Allel beinhaltet. Durch die fehlende Aufreinigung kommt es in der Darstellung zu drei *Peaks*. Der erste wird durch die verbliebenen *Primer* und anderen Reagenzien gebildet, der zweite und höchste durch das physiologische Allel und der dritte *Peak* durch das expandierte Allel (Abbildung 2.7). Durch die verwendeten *Primer* binden insgesamt 159 Basen um die CAG-Wiederholungen, sodass ihre Anzahl bzw. die Anzahl der Glutamine wie folgt berechnet werden kann:

$$\text{Anzahl der Q} = \frac{\text{Anzahl der Nukleotide beim 2. bzw. 3. Peak} - 159}{3}$$

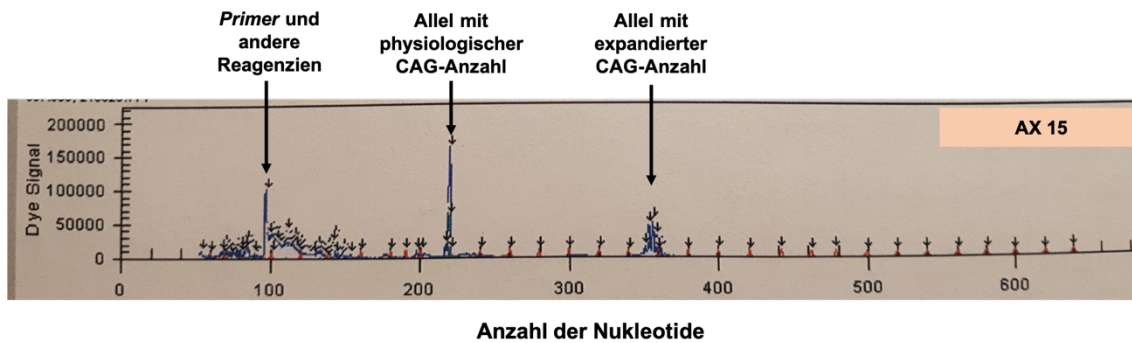


Abbildung 2.7: Auswertung der CAG-Wiederholungen-Fragmentlängenbestimmung

Durch den 600-STD-Marker kann durch das Programm Frag-2 die Länge des PCR-Produktes ermittelt werden. Aufgrund der verschiedenen Anteile des Reaktionsansatzes ergeben sich drei *Peaks*. Der *Peak* mit den geringsten Nucleotidanzahl wird durch die *Primer* und anderen Reagenzien gebildet. Der zweite *Peak* durch das Allel mit physiologischer CAG-Anzahl. Da dieses Allel besser als das expandierte durch die *Taq* amplifiziert werden kann, ist hier das höchste Signal zu detektieren. Der dritte mit der höchsten Nucleotidanzahl wird durch das expandierte Allel gebildet. Über die Gesamtnucleotidzahl kann die Anzahl der Q berechnet werden (s.o.).

2.2.12 Statistische Auswertungen

Die statistischen Auswertungen werden mit Prism 8 vorgenommen. Als signifikant werden p-Werte $\leq 0,05$ (Kennzeichnung: *), als deutlich signifikant p-Werte $\leq 0,0021$ (Kennzeichnung: **), als hoch signifikant p-Werte $\leq 0,0002$ (Kennzeichnung: ***) und als höchst signifikant p-Werte $\leq 0,0001$ (Kennzeichnung: ****) angegeben. Nach Ermittlung mittels des Shapiro-Wilk-Tests, ob eine Normalverteilung vorliegt, werden zur weiteren statistischen Analyse entweder parametrische oder nichtparametrische Tests verwendet. Zur Prüfung einer Korrelation zwischen unverbundenen Kohorten wird im Fall einer Normalverteilung der ungepaarte t-Test und für nicht normalverteilte Daten der Mann-Whitney-Test genutzt. Sind die Kohorten miteinander verbunden, wie im Fall von Verlaufspuren, werden Signifikanzen mittels des gepaarten t-Tests für normalverteilte Daten oder für nicht normalverteilte Daten mittels des Wilcoxon-Tests berechnet. Ein linearer Zusammenhang wird bei einer Normalverteilung durch Ermittlung der Korrelationskoeffizienten nach Pearson und bei nicht normalverteilten Daten nach Spearman analysiert.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung eines hochsensitiven und -spezifischen TR-FRET-Assays für das Gesamt-Ataxin-3-Protein

3.1.1 Allgemeiner Ablauf der Etablierung eines TR-FRET-Assays

Für die Etablierung hochsensitiver und -spezifischer TR-FRET-Assays waren für das jeweilige zu detektierende Protein zwei verschiedene Antikörper notwendig. Deren Bindungsverhalten wurde in verschiedenen Konzentrationen mittels *Western Blot*-Assays in überexprimierten Proben des Proteins überprüft. Konnte ein gutes Signal über den *Western Blot* erzielt werden, erfolgte die Fluoreszenzmarkierung der beiden Antikörper durch das Unternehmen „Cisbio Bioassays“ (Sitz Codolet, FR). Der Donor-Antikörper erhielt eine Tb- und der Akzeptor-Antikörper eine D2-Markierung. Um zu ermitteln, in welchem Verhältnis das bestmögliche Energiesignal über den Laser gemessen werden konnte, wurden beide Antikörper in verschiedenen Konzentrationen miteinander kombiniert und den überexprimierten Proben des Proteins zugesetzt. Der Tb-Antikörper wurde in Mengen von 0,3 ng, 0,5 ng und 1 ng pro Probe mit jeweils 1 ng, 3 ng und 10 ng pro Probe des D2-Antikörpers kombiniert, sodass neun verschiedene Mengenverhältnisse getestet wurden (Nguyen et al. 2013). Für das expandierte Ataxin-3- und Parkin-Protein führte Frau Dr. rer. nat. Hübener-Schmid die jeweilige Etablierung durch. Für das expandierte Ataxin-3-Protein wurde das höchste Signal für die Kombination 0,3 ng des Tb-markierten Anti-Ataxin-3-1H9-Antikörpers und 10 ng des D2-markierten MW1-Antikörpers detektiert. Das beste Signal bei der Messung des Parkin-Protein-Levels bot die Kombination aus 0,25 ng des Tb-markierten Anti-Parkin-PRK8-Antikörpers und 5 ng des D2-markierten Anti-Parkin-Antikörpers. Diese Assays durften für die Messungen dieser Promotion genutzt werden.

3.1.2 Bestimmung der verwendeten Antikörper und ihrer Mengen zur Bestimmung des Gesamt-Ataxin-3-Protein

Um eine Aussage zu der Dynamik des Gesamt-Ataxin-3-Proteins im Krankheitsverlauf der SCA3 sowohl in Abhängigkeit mit den anderen Proteinen als auch

genetischen Merkmalen treffen zu können, wurde für diese Promotion ein neues TR-FRET-Assay etabliert. Zunächst wurde der MW1-Antikörper durch den N-terminal bindenden Anti-Ataxin-3-Antikörper (Polyklonaler IgG-Antikörper des Unternehmens abcam®) ersetzt. Seine Bindung wurde durch Herrn Dr. rer. nat. Weber über den *Western Blot*-Assay überprüft (Daten nicht gezeigt). Anschließend erhielt dieser eine Tb-Markierung und ist Donor-Antikörper im Assay. Akzeptor ist der Anti-Ataxin-3-Antikörper-Klon 1H9, der in dieser Fragestellung eine D2-Markierung erhielt. Der Tb-Anti-Ataxin-3-Antikörper wurde, wie unter 3.1.1 erläutert, in Mengen von 0,3 ng, 0,5 ng und 1 ng pro Probe mit jeweils 1 ng, 3 ng oder 10 ng pro Probe des D2-Anti-Ataxin-3-1H9-Antikörper kombiniert. Gemessen wurde das aus *Human Embryonic Kidney* (HEK293T)-Zellen isolierte Gesamt-Ataxin-3, die entweder 15 oder 148 Glutamine exprimierten und von Frau Dr. rer. nat. Hübener-Schmid zur Verfügung gestellt wurden.

Nach Ablauf des Assays zeigte die Kombination aus den Mengen 0,5 ng des Tb-Anti-Ataxin-3-Antikörper und 10 ng des D2-Anti-Ataxin-3-1H9-Antikörper in beiden Zellmodellen die stärksten Signale, sodass für die Gesamt-Ataxin-3 Bestimmungen auf diese Antikörper-Mengen zurückgegriffen wurde (Abbildung 3.1). Für die 148 Glutamine exprimierenden HEK293T-Zellen war das detektierte Signal tendenziell höher, was nach Vergleich der beiden Kohorten mit dem ungepaarten t-Tests nicht signifikant war (p-Wert: 0,1021) (Abbildung 3.1b).

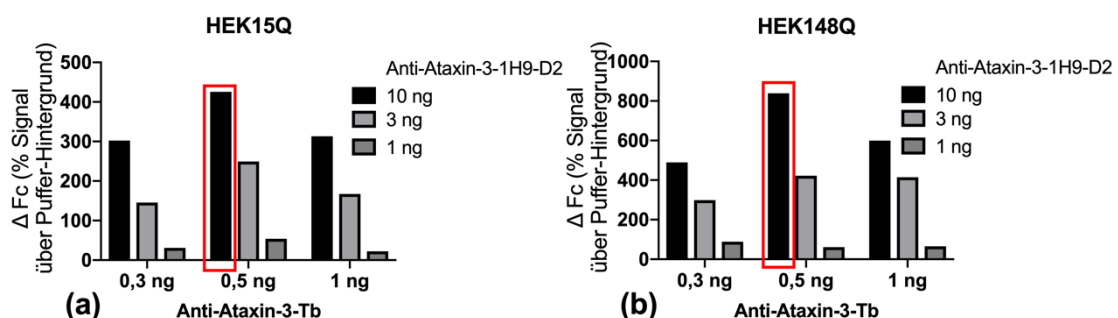


Abbildung 3.1: Messergebnisse der Gesamt-Ataxin-3-Protein-TR-FRET-Assay-Etablierung

Zur Etablierung der pro Probe benötigten AK-Menge wurden jeweils 0,3 ng, 0,5 ng und 1 ng des Tb-Anti-Ataxin-3-AK mit jeweils 1 ng, 3 ng und 10 ng des D2-Anti-Ataxin-3-1H9-AK kombiniert. In (a) sind die Ergebnisse der Messungen der 15Q exprimierenden HEK293T-Zellen dargestellt. Hier fiel das TR-FRET-Signal für die Kombination von 0,5 ng des Tb-Anti-Ataxin-3-AK und 10 ng des D2-Anti-Ataxin-3-1H9-AK am stärksten aus.

(b) Bei den 148Q exprimierenden HEK293T-Zellen lag das stärkste Signal ebenfalls bei dieser Kombination vor. Das Signal für das expandierte Ataxin-3-Protein war tendenziell höher.

3.2 Kohortenanalyse

3.2.1 Klinische Merkmalsausprägungen

Im Rahmen von *NeurOmics* wurden 24 verschiedene SCA3-Patienten-Proben an den drei europäischen Standorten Tübingen, Bonn und Paris gesammelt. Bei Studieneinschluss wurden die SCA3-Patienten über die Bezeichnung „AX + fortlaufender Ziffer“ pseudonymisiert. Es waren zehn weibliche und 14 männliche SCA3-Patienten in der Studie eingeschlossen, die ein durchschnittliches Alter von 52,5 Jahren (Standardabweichung (SD): $\pm 10,3$ Jahre) aufwiesen. Beim Auftreten der ataktischen Symptome (*Age at Onset*, AAO), hatten die SCA3-Patienten ein durchschnittliches Alter von 42,4 Jahren (SD: $\pm 10,8$ Jahre), wobei der jüngste 19 Jahre und der älteste 64 Jahre alt waren. Zum Zeitpunkt der Probenentnahme lag eine durchschnittliche Erkrankungsdauer von 10,1 Jahren (SD: $\pm 6,3$ Jahre) und ein durchschnittlicher SARA-Score von 16,0 Punkten (SD: $\pm 8,0$) vor. Die *cross-sectional disease progression* (CSDP) wurde bei den SCA3-Patienten rechnerisch ermittelt, indem der aktuelle SARA-Score durch die Krankheitsdauer geteilt wurde. Hier zeigte die Kohorte einen Median von 1,9 SARA-Score-Punkten pro Erkrankungsjahr (Interquartilsabstand (IQA): 1,2-2,4). Bei fünf SCA3-Patienten waren neben der Ataxie zusätzliche Symptome beschrieben. AX 3 zeigte eine Bradykinese, die kurzzeitig mit Levodopa behandelt wurde. AX 9 litt unter einem schweren multisystemischen Verlauf mit Spastik, Dystonien, peripherer Neuropathie und war auf den Rollstuhl angewiesen. AX 15 zeigte ausgeprägte Störungen der Okulomotorik und der Bewegungsgeschwindigkeit. Bei AX 17 lag ein *Restless-Legs-Syndrom* (RLS) vor und bei AX 18 eine periphere Polyneuropathie. Die Kohorte war für die Parameter Alter (p-Wert: 0,9080), AAO (p-Wert: 0,4556), Krankheitsdauer (p-Wert: 0,02063) und den SARA-Score (p-Wert: 0,6358) nach dem Shapiro-Wilk-Test normalverteilt (Tabelle 3.1).

In die Promotion waren fünf asymptotische mögliche Mutationsträger, die RISCA, eingeschlossen. Sie waren Angehörige eines SCA3-Patienten und in einer doppelt verblindeten klinischen Studie der neurologischen Poliklinik des Universitätsklinikums Tübingen miteingeschlossen, bei der weder die RISCA noch die Ärzte wussten, ob und wer die Mutation trug. Die Kohorte schloss vier Männer

und eine Frau ein und hatte ein Durchschnittsalter von 30,2 Jahren (SD: $\pm 7,6$ Jahre). Der mittlere SARA-Score betrug 0,7 Punkte (SD: $\pm 0,57$ Punkte) mit einer Spanne von 0 bis 1,5 Punkten.

Die Kohorte war für ihr Alter (p-Wert: 0,4758) und den SARA-Score (p-Wert: 0,8140) nach dem Shapiro-Wilk-Test normalverteilt (Tabelle 3.1).

Neben den Proben der SCA3-Patienten und der RISCA wurden 31 geschlechts- und altersangepasste Kontrollen analysiert, die keinerlei neurologische Erkrankung mit Störung der Blut-Hirn-Schranke (BHS) in ihrer Vorgeschichte aufwiesen. Eingeschlossen wurden elf Frauen und 20 Männer mit einem durchschnittlichen Alter von 44,4 Jahren (SD: $\pm 12,6$ Jahre). Die Kohorte war hinsichtlich ihres Alters nach dem Shapiro-Wilk-Test normalverteilt (p-Wert: 0,7559) (Tabelle 3.1).

Für die klinischen Parameter wurden in der vorliegenden Dissertation Zusammenhänge mit den durch die TR-FRET-Assays gemessenen Proteinleveln des expandierten (3.4) und Gesamt-Ataxin-3- (3.3) sowie Parkin-Proteins (3.5) statistisch geprüft. Neben linearen Korrelationsprüfungen wurden nicht lineare Zusammenhänge für diese untersucht. Dafür wurden die SCA3-Patienten für jeden klinischen Parameter in zwei bzw. drei Kohorten aufgeteilt. Die Trenngröße bildete bei drei Parametern der Median, um dieselbe Anzahl an SCA3-Patienten pro Kohorte zu erhalten. Für das AAO ergaben sich Gruppen mit ≤ 40 (n=12) und ≥ 45 Jahren (n=12). Bei der Krankheitsdauer teilten sich die SCA3-Patienten in Dauern von ≤ 9 (n=12) und ≥ 10 Jahren (n=12) auf. Bei der Prüfung der CSDP waren in der ersten Gruppe Patienten mit einem Erkrankungsfortschritt von $\leq 1,8$ (n=12) und in der zweiten von $\geq 2,0$ (n=12) SARA-Score-Punkten pro Erkrankungsjahr. Für den SARA-Score erfolgte nach Rücksprache mit Herrn Prof. Dr. med. Synofzik eine Einteilung nach klinischer Schwere. Trennpunktzahlen waren eine Punktzahl des SARA-Scores von ≤ 12 (n=8) für mild, 13 bis 23 (n=12) für moderat und ≥ 24 Punkte (n=4) für schwer betroffene SCA3-Patienten. Die RISCA-Kohorte und die Kontrollen wurden als Einheit der geteilten SCA3-Patienten-Kohorte gegenübergestellt.

Während des Promotionszeitraums stellten sich vier SCA3-Patienten und ein RISCA nach einer Zeitspanne von einem (AX 12), zwei (AX 3, AX 11, RISCA 3) oder drei Jahren (AX 5) ein zweites Mal vor, sodass eine Verlaufskontrolle mit

einer nochmaligen Bestimmung des SARA-Scores und Messungen des Parkinson-Protein-, des expandierten und des Gesamt-Ataxin-3-Protein-Levels möglich waren. Diese wurden in einer separaten Verlaufsanalyse ausgewertet (3.7).

Tabelle 3.1: Überblick der klinischen Merkmale der Gesamtkohorte

Die SCA3-Patienten-Kohorte war für die Parameter Alter (p-Wert: 0,9080), AAO (p-Wert: 0,4556), Krankheitsdauer (p-Wert: 0, 0,2063) und den SARA-Score (p-Wert: 0,6358) normalverteilt. Die RISCA-Kohorte war für ihr Alter (p-Wert: 0,4758), und den SARA-Score (p-Wert: 0,8140) normalverteilt. Für das Alter normalverteilt war die Kontrollkohorte (p-Wert: 0,7559). Diese Parameter werden durch das arithmetische Mittel mit SD dargestellt. Die anderen nicht normalverteilten Parameter werden durch den Median und IQA beschrieben.

	SCA3-Patienten	RISCA	Kontrollen
Kohortenstärke (Frauenanteil)	24 (10; 41,67 %)	5 (1; 20%)	31 (11; 35,48%)
Alter in Jahren	52,5 (SD: $\pm 10,3$)	30,2 (SD: $\pm 7,6$)	44,4 (SD: $\pm 12,6$)
AAO in Jahren	42,4 (SD: $\pm 10,8$)	-	-
Krankheitsdauer in Jahren	10,1 (SD: $\pm 6,3$)	-	-
SARA-Score in Punkten	16 (SD: ± 8)	0,7 (SD: $\pm 0,57$)	-
CSDP in SARA-Score-Punkte/Erkrankungsjahre	1,9 (IQA: 1,2-2,4)	-	-

3.2.2 Genetische Merkmalsausprägungen

Für diese Promotion wurden die Anzahl der CAG-Wiederholungen und Polymorphismen des *Ataxin-3*- und *Park2*-Gens bei den SCA3-Patienten und RISCA ermittelt, um Zusammenhänge zwischen den klinischen Parametern und den Proteinleveln zu detektieren. Viele der CAG-Wiederholungen wurden durch die jeweiligen Institute weitergeleitet, da diese im Rahmen der Diagnostik ermittelt worden waren. Fehlende CAG-Wiederholungen wurden für vier SCA3-Patienten und ein RISCA über CAG-Wiederholungen-Fragmentlängenanalysen ermittelt, so dass diese letztlich für 21 SCA3-Patienten und drei RISCA bekannt waren. Die SCA3-Patienten zeigten ein arithmetisches Mittel von 68 (SD: $\pm 3,7$, Spannweite 61 bis 75) und die RISCA einen Median von 64 (IQA: 63,75-65,5) Wiederholungen. Mit einer Spannweite von 63 bis 70 CAG-Wiederholungen waren alle pathologisch erhöht. Von RISCA 4 lag keine DNA vor. Es konnte keine Aussage zu

seinem Mutationsstatus getroffen werden und ob es sich um eine gesunde Kontrolle handelte.

Nach dem Shapiro-Wilk-Test lag eine Normalverteilung der CAG-Wiederholungen der SCA3-Patienten vor (p-Wert: 0,9143) (Tabelle 3.2).

Um neben linearen Zusammenhängen der Anzahl der CAG-Wiederholungen nicht lineare Korrelationen abbilden zu können, wurde die Kohorte in drei Gruppen unterteilt. Die erste umfasste vier SCA3-Patienten und drei RISCA mit ≤ 64 CAG-Wiederholungen. In der zweiten waren zehn SCA3-Patienten mit 65 bis 69 CAG-Wiederholungen und in der dritten Gruppe sieben SCA3-Patienten und ein RISCA mit ≥ 70 CAG-Wiederholungen.

Die *Ataxin-3*-Polymorphismen G^{987}/C^{987} und C^{1118}/A^{1118} waren in einem gemeinsamen Ansatz Allel-spezifisch bestimmt worden. Hier war eine Aussage zur Ausprägung des Genotyps des expandierten und physiologischen Allels möglich. Die Sequenzierung verlief für zwölf SCA3-Patienten und drei RISCA erfolgreich. Zehn SCA3-Patienten und drei RISCA zeigten einen heterozygoten Genotyp $G^{987}-C^{1118}/exp\ C^{987}-A^{1118}$ (Aminosäuren Glycin-Tyrosin, G-Y/Aminosäure Arginin-Stopp-Codon, R-Stopp) und zwei SCA3-Patienten (AX 4 und AX 15) einen homozygoten $C^{987}-A^{1118}/exp\ C^{987}-A^{1118}$ (R-Stopp/R-Stopp).

Für den *Ataxin-3*-Polymorphismus A^{669}/G^{669} konnte aus methodischen Gründen keine Allel-spezifische Analyse erfolgen. Die Sequenzierung erfolgte erfolgreich bei 18 SCA3-Patienten und vier RISCA. Elf SCA3-Patienten und drei RISCA waren für diesen Polymorphismus heterozygot mit den Allelen A^{669}/G^{669} (Aminosäuren Methionin/Valin, M/V). Die homozygote Variante A^{669}/A^{669} (Aminosäuren Methionin/Methionin, M/M) trugen sieben SCA3-Patienten und ein RISCA. In dieser Kohorte waren auch die zwei SCA3-Patienten, AX 4 und AX 15, mit der homozygoten Ausprägung $C^{987}-A^{1118}/exp\ C^{987}-A^{1118}$ (R-Stopp/R-Stopp) (Tabelle 3.2). Die Sequenzierung aller analysierten *Park2*-Polymorphismen wurde erfolgreich bei 18 SCA3-Patienten und vier RISCA durchgeführt. Die homozygote Variante des *Park2*-Polymorphismus G^{601}/A^{601} G^{601}/G^{601} (Aminosäuren Serin/Serin, S/S) trugen 16 SCA3-Patienten und vier RISCA. Die Varianten G^{601}/A^{601} (Aminosäuren Serin/Asparagin, S/N) und A^{601}/A^{601} (Aminosäuren Asparagin/Asparagin, N/N) je ein SCA3-Patient. Der *Park2*-Polymorphismus G^{1239}/C^{1239} wurde in der

homozygoten Variante G¹²³⁹/G¹²³⁹ (Aminosäuren Valin/Valin, V/V) von 15 SCA3-Patienten und drei RISCA getragen. Drei SCA3-Patienten und RISCA 2 hatten die heterozygote Ausprägung G¹²³⁹/A¹²³⁹ (Aminosäuren Valin/Leucin, V/L). RISCA 2 war homozygot für die Variante A¹²⁸¹/A¹²⁸¹ (Aminosäuren Asparagin/Asparagin, N/N) des *Park2*-Polymorphismus G¹²⁸¹/A¹²⁸¹. Die anderen drei RISCA und alle 18 SCA3-Patienten zeigten für diesen Polymorphismus die Ausprägung der anderen homozygoten Variante G¹²⁸¹/G¹²⁸¹ (Aminosäuren Aspartat/Aspartat, D/D) (Tabelle 3.2).

Die Verteilung der Polymorphismen folgte nach Nutzung des Shapiro-Wilk-Tests keiner Normalverteilung.

Um eine mögliche Diagnose hinsichtlich einer SCA3 zu vermeiden, wurden die genetischen Analysen der CAG-Wiederholungen, der *Ataxin-3*- und der *Park2*-Polymorphismen bei den Kontrollen nicht vorgenommen.

Tabelle 3.2: Überblick der genetischen Merkmalsausprägungen der untersuchten SCA3-Patienten und RISCA

Fett hinterlegt ist das expandierte Allel. **Rot** bzw. **grün** sind die Personen mit einer Kombination, der in dieser Kohorte selteneren Allelvarianten, hervorgehoben.

			SCA3-Patienten	RISCA
CAG-Wiederholungen			68 (SD: ± 3,7)	64 (IQA: 63,75-65,5) alle pathologisch
<i>Ataxin-3</i>- Polymorphismen	G ⁹⁸⁷ /C ⁹⁸⁷ & C ¹¹¹⁸ /A ¹¹¹⁸	G-C/C-A	10	3
		C-A/C-A	2 (AX 4 + 15)	0
	A ⁶⁶⁹ /G ⁶⁶⁹	A/G	11	3
		A/A	7 (inklusive AX 4 + 15)	1
<i>Park2</i>- Polymorphismen	G ⁶⁰¹ /A ⁶⁰¹	G/G	16	4
		G/A	1	0
		A/A	1	0
	G ¹²³⁹ /C ¹²³⁹	G/G	15	3
		G/C	3	1 (RISCA 2)
	G ¹²⁸¹ /A ¹²⁸¹	G/G	18	3
A/A		0	1 (RISCA 2)	

3.2.3 Korrelationen der CAG-Wiederholungen mit den klinischen Parametern

Die Anzahl der CAG-Wiederholungen legt die Ausprägung der Klinik und des AAO der SCA3-Patienten bis zu 50 Prozent fest (Maciel et al. 1995). In dieser Promotion wurde analysiert, ob diese Zusammenhänge in der untersuchten Kohorte vorlagen und bestätigt werden konnten. Eingeschlossen wurden die 21 SCA3-Patienten, deren Anzahl der CAG-Wiederholungen bekannt war.

Signifikante negative lineare Korrelation mit dem AAO

Für die SCA3-Patienten-Kohorte zeigte sich nach Berechnung des linearen Korrelationskoeffizienten nach Pearson eine signifikante negative lineare Korrelation (NLK) (p-Wert: 0,0054) mit dem AAO (Abbildung 3.2). Das heißt, je mehr CAG-Wiederholungen das expandierte Allel des Patienten besaß, desto früher war das Auftreten von ataktischen Symptomen. Die Korrelationsprüfung der drei Gruppen ergab mittels des ungepaarten t-Tests keine signifikanten Zusammenhänge. Es war die Tendenz eines früheren Erkrankungsbeginns für ≥ 70 CAG-Wiederholungen auszumachen (Abbildung 3.2b).

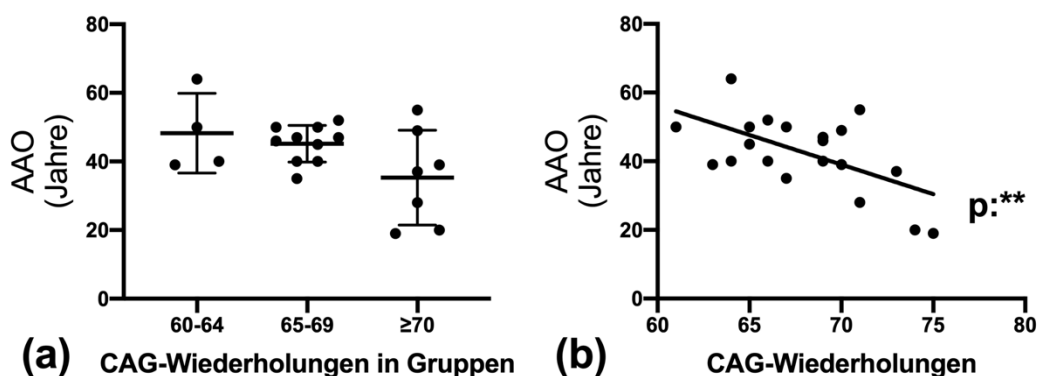


Abbildung 3.2: Korrelation der CAG-Wiederholungen mit dem AAO

Aufgetragen wurden die CAG-Wiederholungen (a) in Kohorten oder (b) linear gegen das AAO. (a) Die dicke horizontale Mittellinie stellt das arithmetische Mittel und die beiden dünnen Linien ober- und unterhalb dieser die SD dar. Es zeigte sich die Tendenz eines früheren AAO für die Kohorte mit ≥ 70 CAG-Wiederholungen. (b) Nach Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson ergab sich eine signifikante NLK (p-Wert: 0,0054) für das AAO.

Signifikante positive lineare Korrelation mit dem SARA-Score

In der Analyse des Korrelationskoeffizienten nach Pearson zeigte sich eine positive lineare Korrelation (PLK) (p -Wert: 0,0117) mit dem SARA-Score. Das heißt, je mehr CAG-Wiederholungen vorlagen, desto höher war der SARA-Score (Abbildung 3.3a). In der Analyse der Kohorten wurde trotz Tendenz eines höheren SARA-Scores für ≥ 70 CAG-Wiederholungen über den ungepaarten t -Test kein signifikanter Zusammenhang berechnet (Abbildung 3.3b).

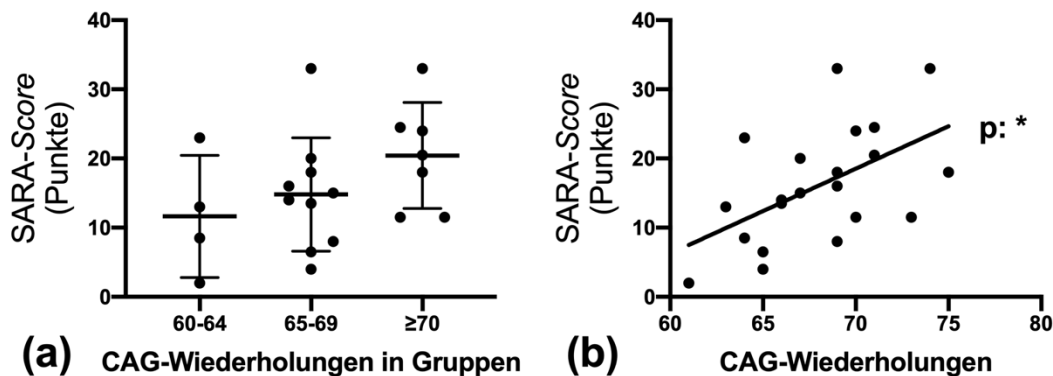


Abbildung 3.3: Korrelation der CAG-Wiederholungen mit dem SARA-Score
Aufgetragen wurden die CAG-Wiederholungen (a) in Kohorten oder (b) linear gegen den SARA-Score. (a) Tendenziell war der SARA-Score in der Kohorte mit ≥ 70 CAG-Wiederholungen am höchsten. (b) Nach der Analyse des linearen Korrelationskoeffizienten nach Pearson zeigte sich eine signifikante PLK (p -Wert: 0,0117).

Signifikante Korrelation der CSDP mit einer CAG-Anzahl von ≥ 70

In der nächsten Analyse wurde überprüft, ob die Anzahl der CAG-Wiederholungen mit einem schnelleren Voranschreiten der Erkrankung einhergeht. Hierfür wurde die CSDP berechnet. In der linearen Analyse zeigte sich ein tendenzieller Anstieg der CSDP bei Zunahme der CAG-Wiederholungen (Abbildung 3.4b). Bei der Analyse der aufgeteilten Kohorte errechnete sich für die Gruppe mit ≥ 70 CAG-Wiederholungen im Vergleich zur Gruppe mit ≤ 64 CAG-Wiederholungen nach dem Mann-Whitney-Test eine signifikant höhere CSDP (p -Wert: 0,0485) (Abbildung 3.4a).

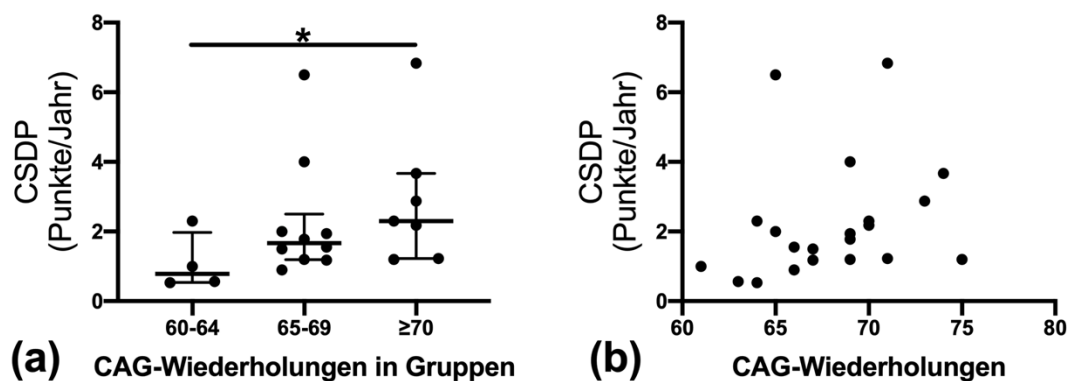


Abbildung 3.4: Korrelation der CAG-Wiederholungen mit der CSDP

Aufgetragen wurden die CAG-Wiederholungen (a) in Kohorten oder (b) linear gegen die CSDP. (a) Die dicke horizontale Mittellinie stellt den Median und die beiden dünnen Linien ober- und unterhalb den IQA dar. Es berechnete sich eine signifikant höhere CSDP der Kohorte mit ≥ 70 im Vergleich zur Kohorte mit ≤ 64 CAG-Wiederholungen (p-Wert: 0,0485). (b) Es zeigte sich die Tendenz einer PLK.

3.2.4 Korrelationen des *Ataxin-3*-Polymorphismus A^{669}/G^{669} mit den klinischen Parametern

Ziel der nächsten Analysen war die Ermittlung eines potenziellen Einflusses des Polymorphismus A^{669}/G^{669} auf die klinischen Parameter AAO, SARA-Score und CSDP. Eingeschlossen wurden die 18 SCA3-Patienten mit ermitteltem Genotyp. Die Aufteilung der Kohorte erfolgte entsprechend der Allelausprägung. Für diese wurde im direkten Vergleich und in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen ein modifizierender Effekt auf die klinischen Parameter geprüft.

Signifikante NLK des Genotyps A^{669}/G^{669} mit dem AAO

In der Analyse der beiden Kohorten zeigte sich nach dem Mann-Whitney-Test kein signifikanter Unterschied für das AAO (Abbildung 3.5a). Für die SCA3-Patienten mit dem Genotyp A^{669}/G^{669} zeigte sich in der Analyse des linearen Korrelationskoeffizienten nach Spearman eine signifikante NLK (p-Wert: 0,0346). (Abbildung 3.5b).

Signifikant höherer SARA-Score des Genotyps A^{669}/G^{669}

In der Kohortenanalyse der beiden Allelausprägungen für den Polymorphismus A^{669}/G^{669} berechnete sich durch Nutzung des Mann-Whitney-Tests ein signifikant höherer SARA-Score der SCA3-Patienten mit der heterozygoten Ausprägung (p-

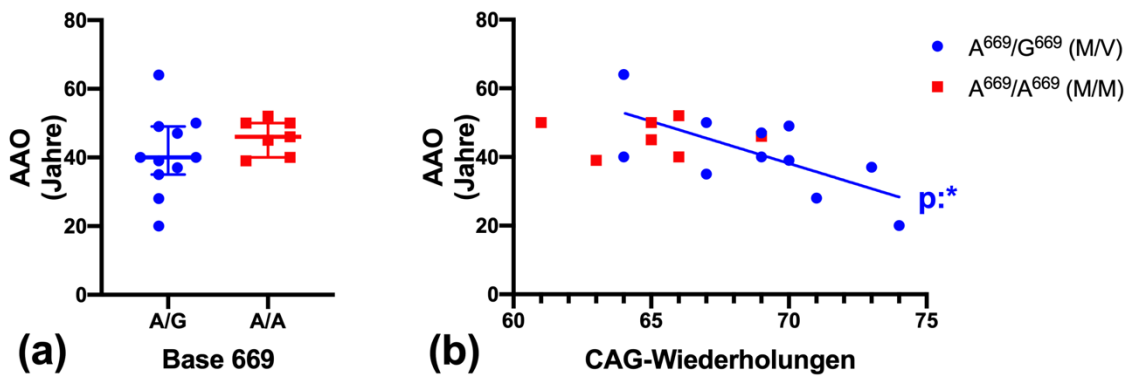


Abbildung 3.5: Korrelation des Polymorphismus A⁶⁶⁹/G⁶⁶⁹ mit dem AAO

Aufgetragen wurden die verschiedenen Allelausprägungen des Polymorphismus A⁶⁶⁹/G⁶⁶⁹ (a) in Kohorten oder (b) linear in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen gegen das AAO. Die Kohorten sind farblich und durch Symbole gekennzeichnet (s. Legende). (a) Die dicke horizontale Mittellinie stellt den Median und die beiden dünnen Linien ober- und unterhalb den IQA dar. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied der verschiedenen Genotypen für das AAO. (b) . Es konnte für die Ausprägung A⁶⁶⁹/G⁶⁶⁹ eine signifikante NLK nach Spearman dargestellt werden (p-Wert: 0,0346).

Wert: 0,0053) (Abbildung 3.6a). In der linearen Auftragung wurde für beide Allelausprägungen des Polymorphismus die Tendenz der PLK in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen für den SARA-Score gesehen (Abbildung 3.6b).

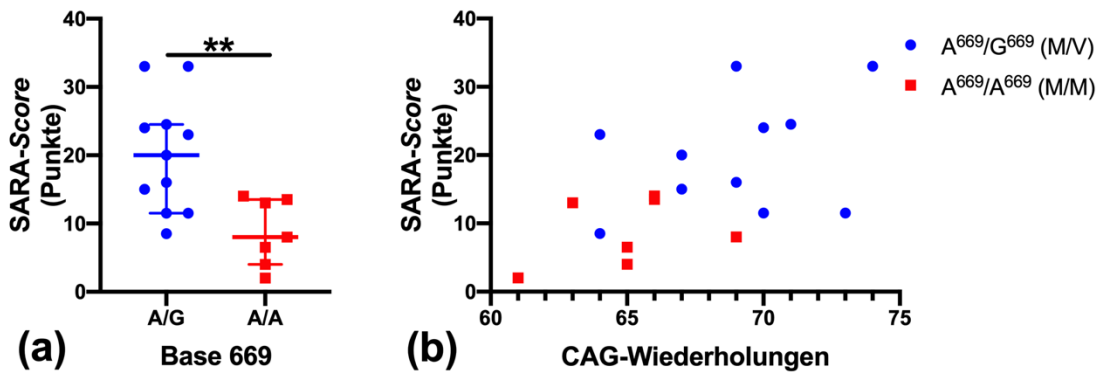


Abbildung 3.6: Korrelation des Polymorphismus A⁶⁶⁹/G⁶⁶⁹ mit dem SARA-Score

Aufgetragen wurden die verschiedenen Allelausprägungen des Polymorphismus A⁶⁶⁹/G⁶⁶⁹ (a) in Kohorten oder (b) linear in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen gegen den SARA-Score. (a) In der Kohortenanalyse zeigte sich ein signifikant höherer SARA-Score für die heterozygote Ausprägung des Polymorphismus (p-Wert: 0,0053). (b) In der linearen Auftragung war für beide Ausprägungen des Polymorphismus die Tendenz einer PLK für den SARA-Score zu sehen.

Keine signifikante Korrelation des Polymorphismus A⁶⁶⁹/G⁶⁶⁹ mit der CSDP

Weder in der Kohortenanalyse mittels Mann-Whitney-Test noch in der Bestimmung des linearen Korrelationskoeffizienten nach Spearman zeigte sich für einen

der beiden Genotypen des Polymorphismus A^{669}/G^{669} ein signifikanter Zusammenhang mit der CSDP (Abbildung 3.7).

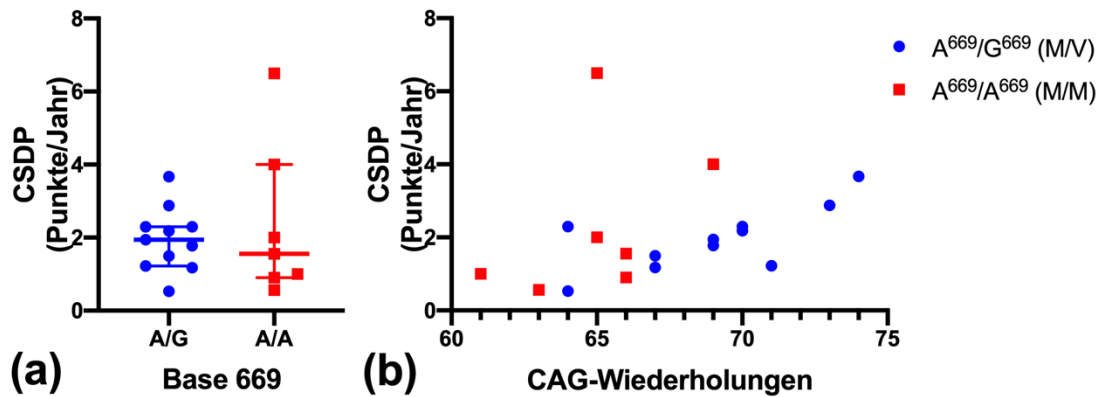


Abbildung 3.7: Korrelation des Polymorphismus A^{669}/G^{669} mit der CSDP

Aufgetragen wurden die verschiedenen Allelausprägungen des Polymorphismus A^{669}/G^{669} (a) in Kohorten oder (b) linear in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen gegen die CSDP. In keiner Analyse zeigte sich für die zwei Allelausprägungen des Polymorphismus ein signifikanter Zusammenhang mit der CSDP.

3.2.5 Korrelationen der Polymorphismen G^{987}/C^{987} und C^{1118}/A^{1118} mit den klinischen Parametern

Die Sequenzierung der Polymorphismen G^{987}/C^{987} und C^{1118}/A^{1118} erfolgte gemeinsam. Sie wurden zusammen und Allel-spezifisch für die Fragestellung einer Korrelation mit den klinischen Parametern AAO, SARA-Score und CSDP untersucht. Die zwölf SCA3-Patienten mit einer erfolgreichen Sequenzierung wurden entsprechend ihrer Allelausprägung für die Polymorphismen in zwei Kohorten aufgeteilt. Neben dem direkten Vergleich dieser beiden wurde ein modifizierender Zusammenhang der Polymorphismen in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen für die klinischen Parameter untersucht. Dies konnte aufgrund der kleinen Kohortenstärke der homozygoten Allelträger dieser Polymorphismen nur für die heterozygote Kohorte erfolgen.

Signifikante NLK des Genotyps $G^{987}-C^{1118}/C^{987}-A^{1118}$ mit dem AAO

Im direkten Vergleich beider Genotypen für die Polymorphismen G^{987}/C^{987} und C^{1118}/A^{1118} zeigte sich die Tendenz eines späteren AAO für die homozygote Kohorte (Abbildung 3.8a). Durch die Berechnung des linearen

Korrelationskoeffizienten nach Spearman wurde für die heterozygote Allelausprägung der Polymorphismen G^{987}/C^{987} und C^{1118}/A^{1118} mit Zunahme der CAG-Wiederholungen eine signifikante NLK für das AAO (p-Wert: 0,0249) ermittelt (Abbildung 3.8b).

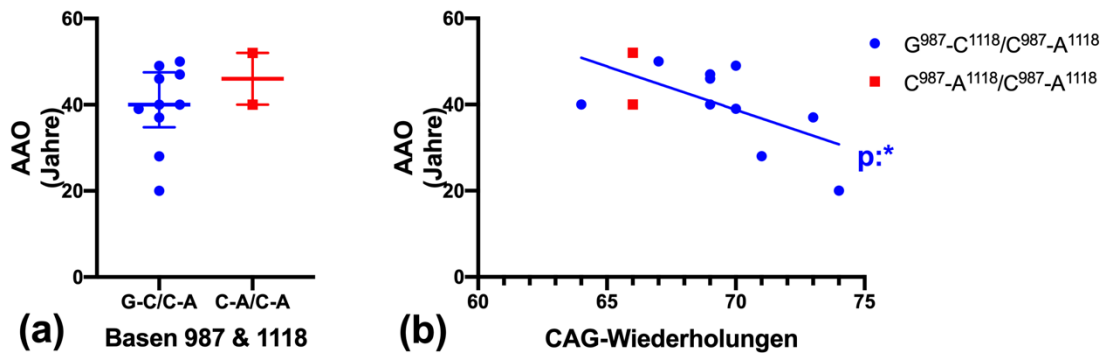


Abbildung 3.8: Korrelation der Polymorphismen G^{987}/C^{987} und C^{1118}/A^{1118} mit dem AAO
 Aufgetragen wurden die verschiedenen Allelausprägungen der Polymorphismen G^{987}/C^{987} und C^{1118}/A^{1118} (a) in Kohorten oder (b) linear in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen gegen das AAO. Die Kohorten sind farblich und durch Symbole gekennzeichnet (s. Legende). (a) Die dicke horizontale Mittellinie stellt den Median und die beiden dünnen Linien ober- und unterhalb den IQA dar. Die homozygote Kohorte für diese Polymorphismen zeigte die Tendenz eines späteren AAO. (b) In Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen zeigten die für die Polymorphismen heterozygoten SCA3-Patienten eine signifikante NLK für das AAO (p-Wert:0,0249).

Keine signifikante Korrelation der Polymorphismen G^{987}/C^{987} und C^{1118}/A^{1118} mit dem SARA-Score

Die Polymorphismen G^{987}/C^{987} und C^{1118}/A^{1118} zeigten im direkten Vergleich und linear in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen keine signifikante Korrelation mit dem SARA-Score (Abbildung 3.9).

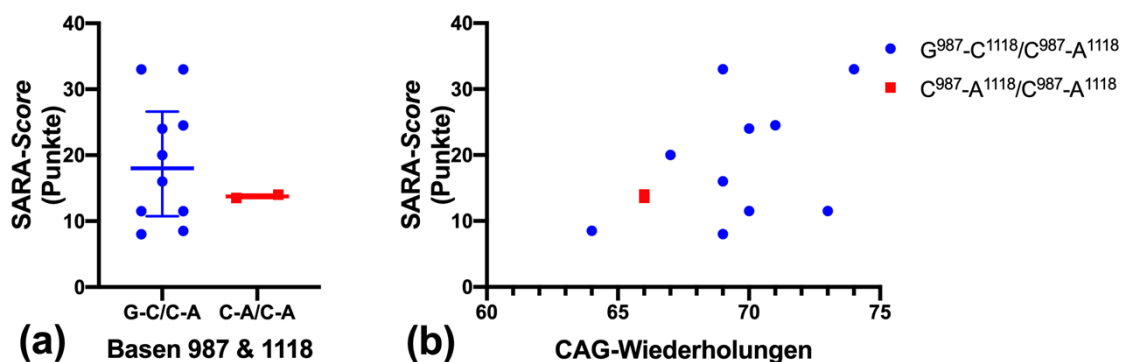


Abbildung 3.9: Korrelation der Polymorphismen G^{987}/C^{987} und C^{1118}/A^{1118} mit dem SARA-Score

Aufgetragen wurden die verschiedenen Allelausprägungen der Polymorphismen G^{987}/C^{987} und C^{1118}/A^{1118} (a) in Kohorten oder (b) linear in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen gegen den SARA-Score. In keiner der beiden Analysen konnte ein signifikanter Zusammenhang ermittelt werden.

Signifikante PLK des Genotyps $G^{987}-C^{1118}/C^{987}-A^{1118}$ mit der CSDP

In der Bestimmung des linearen Korrelationskoeffizienten nach Spearman ermittelte sich für die heterozygote Kohorte der Polymorphismen G^{987}/C^{987} und C^{1118}/A^{1118} eine signifikante PLK in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen für die CSDP (p-Wert: 0,0347) (Abbildung 3.10b). Im direkten Vergleich der Kohorten beider Allelausprägungen für die Polymorphismen deutete die heterozygote Kohorte die Tendenz einer schnelleren CSDP an (Abbildung 3.10a).

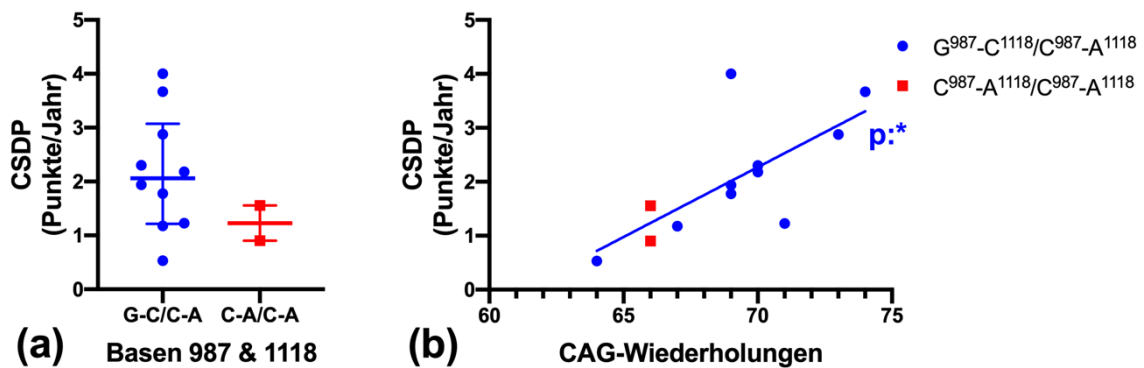


Abbildung 3.10: Korrelation der Polymorphismen G^{987}/C^{987} und C^{1118}/A^{1118} mit der CSDP
 Aufgetragen wurden die verschiedenen Allelausprägungen der Polymorphismen G^{987}/C^{987} und C^{1118}/A^{1118} (a) in Kohorten oder (b) linear in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen gegen die CSDP. (a) Die heterozygote Kohorte für die Polymorphismen G^{987}/C^{987} und C^{1118}/A^{1118} deutete eine schnellere CSDP an. (b) In Abhängigkeit der Anzahl CAG-Wiederholungen zeigte sie eine signifikante PLK für die CSDP (p-Wert: 0,0347).

3.2.6 Korrelationen des *Park2*-Polymorphismus G^{601}/A^{601} mit den klinischen Parametern

Im nachfolgenden Abschnitt wurde der Einfluss der Varianten des *Park2*-Polymorphismus G^{601}/A^{601} auf die Ausprägung der klinischen Parameter AAO, SARA-Score und CSDP untersucht. Eingeschlossen wurden die 18 SCA3-Patienten, deren Genotyp ermittelt werden konnte. Die Kohortenaufteilung folgte der Allelausprägung. Zwei der Kohorten zählten nur einen SCA3-Patienten, sodass ein direkter Vergleich der Kohorten nicht möglich war. Für die homozygote Variante G^{601}/G^{601} des Polymorphismus G^{601}/A^{601} wurde ein potenzieller modifizierender

Effekt in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen auf die klinischen Parameter geprüft.

Signifikante NLK des Genotyps G^{601}/G^{601} mit dem AAO

Die Kohorte des Genotyps G^{601}/G^{601} ist nach der Berechnung mittels des Shapiro-Wilk-Tests normalverteilt (p-Wert: 0,1169) (Abbildung 3.11a). In der Analyse des linearen Korrelationskoeffizienten nach Pearson zeigte sich eine signifikante NLK des Genotyps G^{601}/G^{601} in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen mit dem AAO (p-Wert: 0,0112) (Abbildung 3.11b).

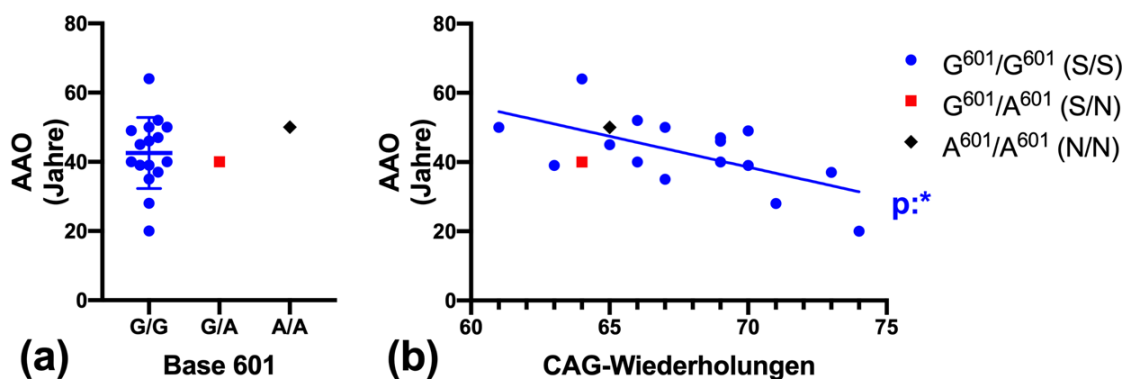


Abbildung 3.11: Korrelation des Polymorphismus G^{601}/A^{601} mit dem AAO

Aufgetragen wurden die verschiedenen Allelausprägungen des Polymorphismus G^{601}/A^{601} (a) in Kohorten oder (b) linear in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen gegen das AAO. Die Kohorten sind farblich und durch Symbole gekennzeichnet (s. Legende). (a) Die dicke horizontale Mittellinie stellt das arithmetische Mittel und die beiden dünnen Linien ober- und unterhalb die SD dar. Eine Kohortenanalyse war nicht möglich. (b) Nach Berechnung des linearen Korrelationskoeffizienten nach Pearson lag für den Genotyp G^{601}/G^{601} eine signifikante NLK mit dem AAO vor (p-Wert: 0,0112).

Signifikante PLK des Genotyps G^{601}/G^{601} mit dem SARA-Score

Nach dem Shapiro-Wilk-Test war die Kohorte des Genotyps G^{601}/G^{601} für den SARA-Score normalverteilt (p-Wert: 0,6913) (Abbildung 3.12a). In der Bestimmung des linearen Korrelationskoeffizienten nach Spearman zeigte sie eine signifikante PLK (p-Wert: 0,0409) in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen mit dem SARA-Score (Abbildung 3.12b).

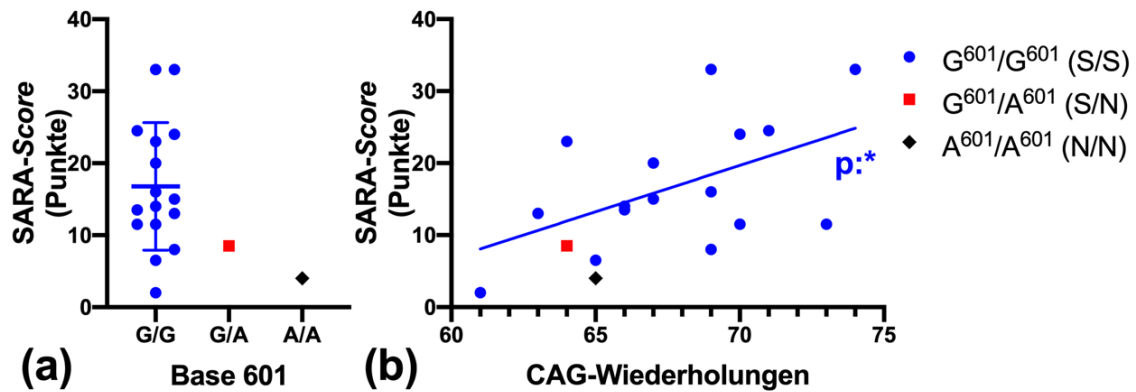


Abbildung 3.12: Korrelation des Polymorphismus G^{601}/A^{601} mit dem SARA-Score

Aufgetragen wurden die verschiedenen Allelausprägungen des Polymorphismus G^{601}/A^{601} (a) in Kohorten oder (b) linear in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen gegen den SARA-Score. Es berechnete sich eine signifikante PLK des Genotyps G^{601}/G^{601} im Zusammenhang mit den CAG-Wiederholungen für den SARA-Score (p-Wert: 0,0409).

Kein signifikanter Zusammenhang des Polymorphismus G^{601}/A^{601} mit der CSDP

Es lag keine lineare Korrelation des Genotyps G^{601}/G^{601} mit der CSDP in Abhängigkeit der Anzahl der CAG-Wiederholungen vor (Abbildung 3.13).

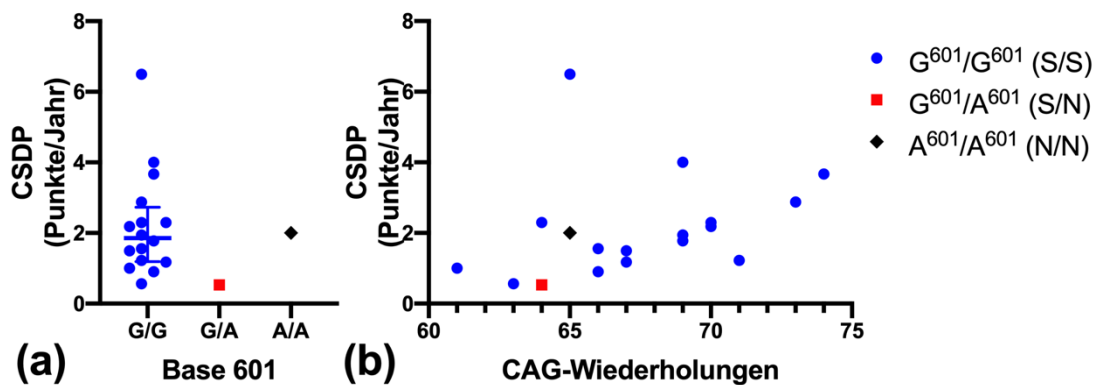


Abbildung 3.13: Korrelation des Polymorphismus G^{601}/A^{601} mit der CSDP

Aufgetragen wurden die verschiedenen Allelausprägungen des Polymorphismus G^{601}/A^{601} (a) in Kohorten oder (b) linear in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen gegen die CSDP. (a) Die dicke horizontale Mittellinie stellt den Median und die beiden dünnen Linien ober- und unterhalb den IQA dar. (b) Nach Berechnung des linearen Korrelationskoeffizienten nach Spearman ergab sich kein signifikanter Zusammenhang.

3.2.7 Korrelationen des *Park2*-Polymorphismus G¹²³⁹/C¹²³⁹ mit den klinischen Parametern

Der *Park2*-Polymorphismus, der die Base G¹²³⁹/C¹²³⁹ beschreibt, wurde auf einen Einfluss auf die Ausprägung der klinischen Parameter AAO, SARA-Score und CSDP untersucht. Eingeschlossen waren die 18 SCA3-Patienten mit bekanntem Genotyp. Die Aufteilung der Kohorte folgte der Allelausprägung. Neben dem direkten Vergleich der Allelausprägungen wurde in einer weiteren Analyse ein modifizierender Effekt des Polymorphismus in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen auf die klinischen Parameter geprüft.

Keine signifikanten Korrelationen des Polymorphismus G¹²³⁹/C¹²³⁹ mit dem AAO, dem SARA-Score und der CSDP

Beide Kohorten waren nach der Nutzung des Shapiro-Wilk-Tests für das AAO (p-Wert (G¹²³⁹/G¹²³⁹): 0,5137; p-Wert (G¹²³⁹/C¹²³⁹): 0,7941) und den SARA-Score (p-Wert (G¹²³⁹/G¹²³⁹): 0,8082; p-Wert (G¹²³⁹/C¹²³⁹): 0,2034) normalverteilt. Die Kohorte des Genotyps G¹²³⁹/C¹²³⁹ war für die CSDP normalverteilt (p-Wert: 0,6781). In der Kohortenanalyse ermittelte sich über den ungepaarten t-Test keine signifikante Korrelation der beiden Genotypen mit dem AAO und dem SARA-Score (Abbildung 3.14a,c). Die Nutzung des Mann-Whitney-Tests für die Kohortenanalyse der CSDP erbrachte ebenfalls keine signifikanten Ausprägungsunterschiede (Abbildung 3.14e). In der Analyse des linearen Korrelationskoeffizienten berechnete sich für keine Allelausprägung ein signifikanter Zusammenhang in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen mit den klinischen Parametern (Abbildung 3.14b,d,f). Es bestand die Tendenz eines früheren AAO (Abbildung 3.14a) und einer NLK für die heterozygote Ausprägung G¹²³⁹/C¹²³⁹ (Abbildung 3.14b) in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen. Die homozygote Kohorte G¹²³⁹/G¹²³⁹ hatte eine Tendenz der PLK mit dem SARA-Score (Abbildung 3.14d).

3.2.8 Korrelationen des *Park2*-Polymorphismus G¹²⁸¹/A¹²⁸¹ mit den klinischen Parametern

Die Ausprägung des *Park2*-Polymorphismus G¹²⁸¹/A¹²⁸¹ war bei den 18 erfolgreich sequenzierten Patienten ausschließlich homozygot. Aufgrund dieser

absoluten Monomorphie waren keine statistischen Auswertungen mit den klinischen Parametern möglich.

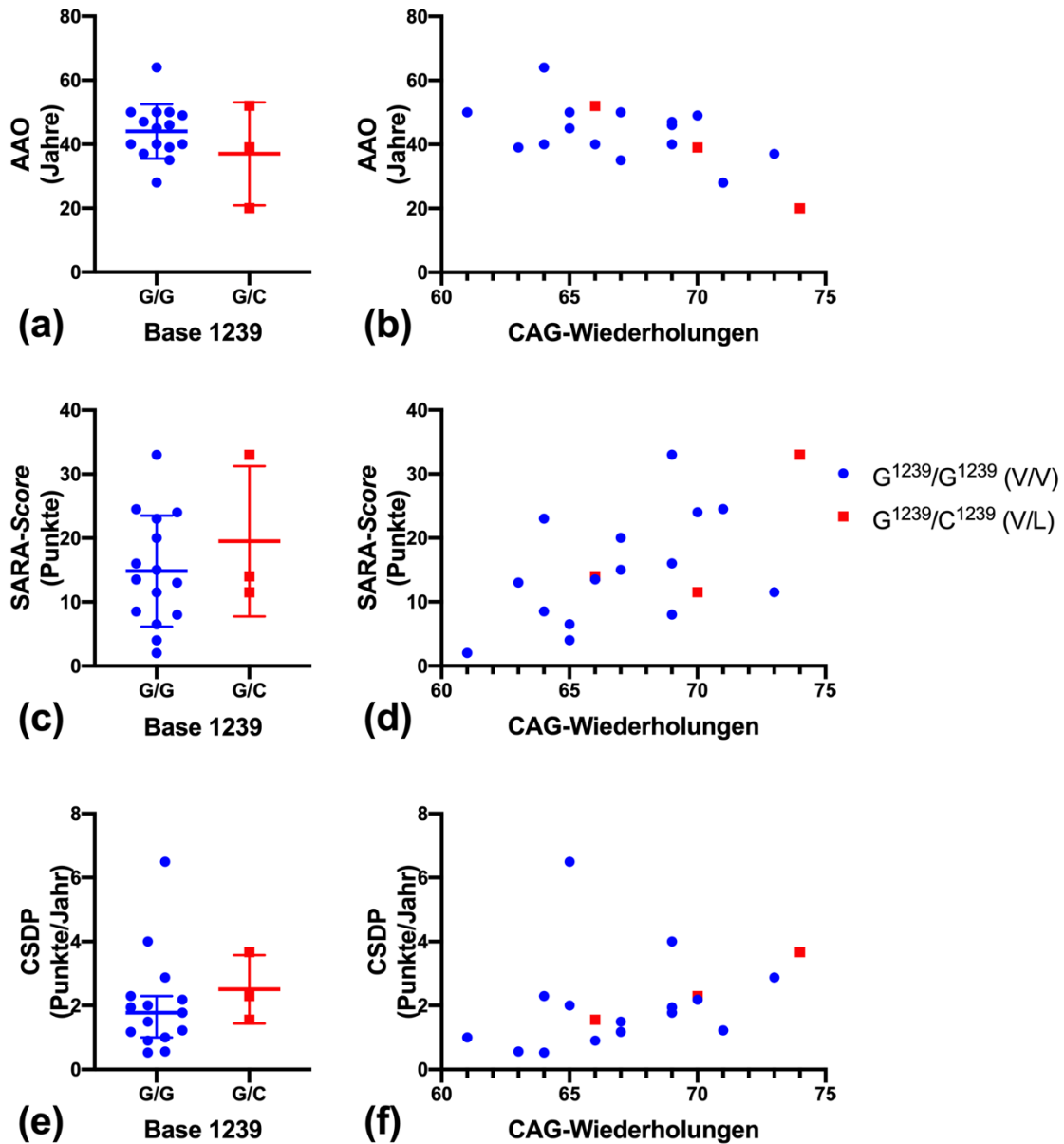


Abbildung 3.14: Korrelationen des Polymorphismus G^{1239}/C^{1239} mit dem AAO, dem SARA-Score und der CSDP

Aufgetragen wurden die verschiedenen Allelausprägungen des Polymorphismus G^{1239}/C^{1239} (a,c,e) in Kohorten oder (b,d,f) linear in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen gegen (a+b) das AAO, (c+d) den SARA-Score und (e+f) die CSDP. Die Kohorten sind farblich und durch Symbole gekennzeichnet (s. Legende). (a,c,e) Nach Ermittlung einer Normalverteilung stellte die dicke horizontale Mittellinie stellt das arithmetische Mittel bzw. den Median und die beiden dünnen Linien ober- und unterhalb die SD bzw. den IQA dar.

In keiner der durchgeführten Berechnungen ergaben sich signifikante Korrelationen. Die Kohorte der Ausprägung G^{1239}/C^{1239} zeigte die Tendenz (a) eines früheren AAO und (b) einer NLK in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen mit diesem. Die Kohorte der Ausprägung G^{1239}/G^{1239} hatte die Tendenz (d) einer PLK mit dem SARA-Score.

3.2.9 Zusammenfassung der Ergebnisse der Etablierung des TR-FRET-Assays zur Bestimmung des Gesamt-Ataxin-3-Proteins und der Kohortenanalyse

In der nachfolgenden Tabelle 3.3 werden die Ergebnisse der Abschnitte 3.1 und 3.2 zusammengefasst. Die Korrelationsprüfungen der genetischen und klinischen Merkmale der SCA3-Patienten-Kohorte sind in Zusammenschau mit den in den nachfolgenden Abschnitten (3.3, 3.4, 3.5) beschriebenen Proteinmessungen Teil der Diskussion. Die Etablierung des TR-FRET-Assays war die Voraussetzung für die Messungen und Analysen des nachfolgenden Abschnitts 3.3.

Tabelle 3.3: Zusammenfassung der Ergebnisse der Abschnitte 3.1 und 3.2

Rot geschriebene Basen des *Ataxin-3*-Polymorphismus G⁹⁸⁷/C⁹⁸⁷ und C¹¹¹⁸/A¹¹¹⁸ entsprechen dem expandierten Allel.

Für welche Kombination der Mengen von Tb-Anti-Ataxin-3-AK und D2-Anti-Ataxin-3-1H9-AK erhält man das höchste Signal des Gesamt-Ataxin-3-Proteins im TR-FRET-Assay?		
Tb-Anti-Ataxin-3-AK		0,5 ng
D2-Anti-Ataxin-3-1H9-AK		10 ng
Hatten die genetischen Ausprägungen von Polymorphismen der SCA3-Patienten einen Zusammenhang mit den klinischen Parametern?		
CAG-Wiederholungen		<ul style="list-style-type: none"> – signifikante NLK mit AAO (p-Wert: **) – signifikante PLK mit SARA-Score (p-Wert: *) – ≥ 70 CAG-Wiederholungen signifikant schnellere CSDP (p-Wert: *)
Ataxin-3-Polymorphismen	A ⁶⁶⁹ /G ⁶⁶⁹	Genotyp A⁶⁶⁹/G⁶⁶⁹ : <ul style="list-style-type: none"> – signifikante NLK mit AAO (p-Wert: *) – signifikant höherer SARA-Score (p-Wert: *)
	G ⁹⁸⁷ /C ⁹⁸⁷ und C ¹¹¹⁸ /A ¹¹¹⁸	Genotyp G⁹⁸⁷-C¹¹¹⁸/C⁹⁸⁷-A¹¹¹⁸ : <ul style="list-style-type: none"> – signifikante NLK mit AAO (p-Wert: *) – signifikante PLK mit CSDP (p-Wert: *)
Park2-Polymorphismen	G ⁶⁰¹ /A ⁶⁰¹	Genotyp G⁶⁰¹/G⁶⁰¹ : <ul style="list-style-type: none"> – relativ monomorphe Kohorte – signifikante NLK mit AAO (p-Wert: *) – signifikante PLK mit SARA-Score (p-Wert: *)
	G ¹²³⁹ /C ¹²³⁹	– keine Signifikanz mit dem AAO, dem SARA-Score oder der CSDP
	G ¹²⁸¹ /A ¹²⁸¹	– monomorphe Kohorte; Auswertung nicht möglich

3.3 Korrelationen des Gesamt-Ataxin-3-Proteins

Die quantitative und qualitative Messung des Gesamt-Ataxin-3-Proteins erfolgte anhand des neu etablierten TR-FRET-Assays (3.1.2) mit dem Tb-markierten

Anti-Ataxin-3-Antikörper und dem D2-markierten Anti-Ataxin-3-1H9-Antikörper in lysierten Lymphozyten-Proben von 24 SCA3-Patienten, fünf RISCA und 31 Kontrollen. Es ergab sich für das ΔFc der SCA3-Patienten ein Median von 3,48 (IQA: 1,36-4,74), für die RISCA ein Median von 1,94 (IQA: 1,18-2,66) und ein Median für das ΔFc der Kontrollen von 4,84 (IQA: 2,74-9,76) (Tabelle 3.4 und Abbildung 3.15). Um eine mögliche Funktion als Surrogatmarker für therapeutische randomisierte-klinische Studien (*randomized clinical trials*, RCT) zu untersuchen, wurden die gemessenen Proteinmengen mit klinischen und genetischen Parametern korreliert.

Zunächst wurden die Kohorten der SCA3-Patienten, RISCA und Kontrollen miteinander verglichen, um die Rolle des Krankheitsstatus zu prüfen. Nach Nutzung des Mann-Whitney-Tests war kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Kohorten für das Gesamt-Ataxin-3-Protein zu berechnen. Auffallend war die breite Streuung der Gesamt-Ataxin-3-Protein-Werte der Kontrollen und der hohe Messwert von RISCA 4 (Abbildung 3.15).

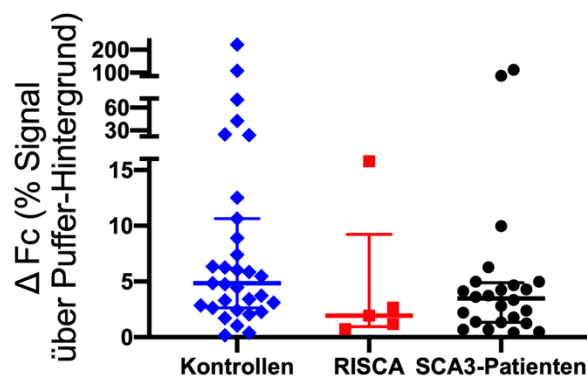


Abbildung 3.15: Korrelation des Gesamt-Ataxin-3-Proteins mit dem Erkrankungsstatus
Aufgetragen wurden die Kohorten der Kontrollen, RISCA und SCA3-Patienten gegen das gemessene ΔFc -Signal des Gesamt-Ataxin-3-Proteins. Die dicke horizontale Mittellinie stellt das arithmetische Mittel bzw. den Median und die beiden dünnen Linien ober- und unterhalb dieser die SD bzw. den IQA nach Ermittlung einer Normalverteilung dar. Zwischen den einzelnen Kohorten ließ sich kein signifikanter Unterschied der Gesamt-Ataxin-3-Protein-Expression berechnen.

3.3.1 Korrelationen des Gesamt-Ataxin-3-Proteins mit den klinischen Parametern

Im nachfolgenden Teil wurden die gemessenen ΔFc -Signale des Gesamt-Ataxin-3-Proteins mit den Parametern AAO, Krankheitsdauer, SARA-Score und CSDP

korreliert. Die Kohortenanalyse wurde mit der unter 3.2.1 erläuterten Aufteilung der SCA3-Patienten vorgenommen. Für die SCA3-Patienten wurde ein linearer Zusammenhang des klinischen Parameters mit dem gemessenen Proteinsignal untersucht.

Keine signifikante Korrelation des Gesamt-Ataxin-3-Protein-Levels mit dem AAO

Für das AAO errechneten sich mittels des Mann-Whitney-Tests keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen den Kohorten. Nach Nutzung des Shapiro-Wilk-Tests lag für die SCA3-Patienten-Kohorte mit einem AAO von ≥ 45 Jahren eine Normalverteilung vor (p-Wert: 0,9988) (Abbildung 3.16a). Über die Ermittlung des linearen Korrelationskoeffizienten nach Spearman konnte kein signifikanter Zusammenhang mit dem AAO ermittelt werden (Abbildung 3.16b).

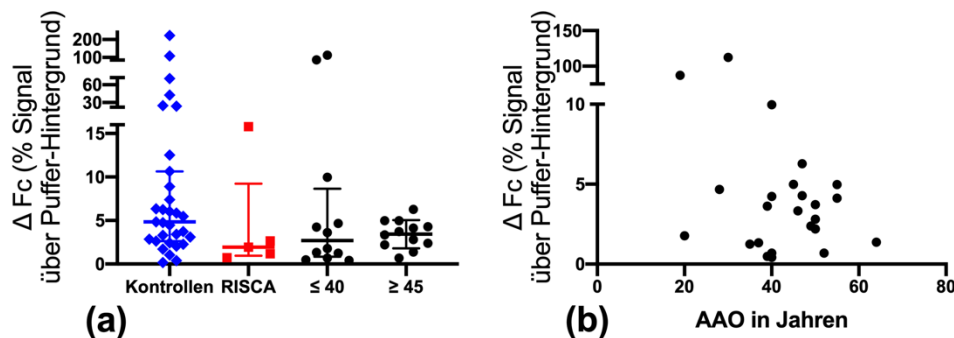


Abbildung 3.16: Korrelation des Gesamt-Ataxin-3-Proteins mit dem AAO

Aufgetragen wurden die (a) Kohorten der Kontrollen, RISCA und SCA3-Patienten und (b) das AAO der SCA3-Patienten linear gegen das gemessene ΔFc -Signal des Gesamt-Ataxin-3-Proteins. In beiden Darstellungen ergab sich keine signifikante Korrelation des Gesamt-Ataxin-3-Proteins mit dem AAO.

Keine signifikante Korrelation des Gesamt-Ataxin-3-Protein-Levels mit der Krankheitsdauer

In der Kohortenanalyse konnten keine signifikanten Unterschiede in den Gesamt-Ataxin-3-Protein-Levels mittels des Mann-Whitney-Tests berechnet werden. Für die SCA3-Patienten-Kohorte mit einer Krankheitsdauer von ≤ 9 Jahren lag nach dem Shapiro-Wilk-Test eine Normalverteilung vor (p-Wert: 0,2407) (Abbildung 3.17a). In der Bestimmung des linearen Korrelationskoeffizienten nach

Spearman wurde kein signifikanter Zusammenhang mit der Krankheitsdauer nachgewiesen (Abbildung 3.17b).

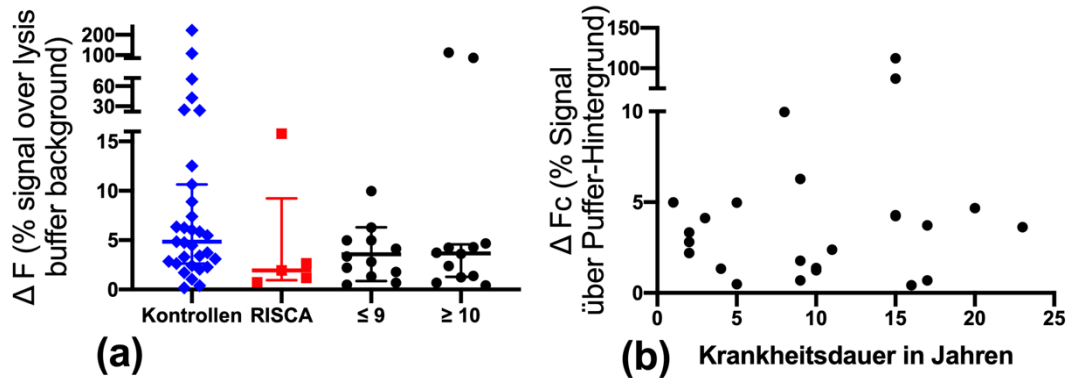


Abbildung 3.17: Korrelation des Gesamt-Ataxin-3-Proteins mit der Krankheitsdauer
 Aufgetragen wurden die (a) Kohorten der Kontrollen, RISCA und SCA3-Patienten und (b) die Krankheitsdauer der SCA3-Patienten linear gegen das gemessene ΔFc -Signal des Gesamt-Ataxin-3-Proteins. In beiden Darstellungen wurde keine signifikante Korrelation des Gesamt-Ataxin-3-Proteins mit der Krankheitsdauer festgestellt.

Signifikant geringeres Gesamt-Ataxin-3-Protein-Level der Kohorten mit ≤ 12 SARA-Score-Punkten

In der Kohortenanalyse zeigte sich eine signifikante Abnahme des Gesamt-Ataxin-3-Protein-Levels der mild betroffenen SCA3-Patienten-Kohorte mit ≤ 12 Punkten gegenüber den Kontrollen. Dies wurde mittels des Mann-Whitney-Tests berechnet (p-Wert: 0,0335). Die Kohorte mit der Punktzahl von ≤ 12 (p-Wert: 0,3641) und ≥ 24 Punkten (p-Wert: 0,7215) sind nach Nutzung des Shapiro-Wilk-Tests normalverteilt (Abbildung 3.18a). Ein linearer Zusammenhang des SARA-Scores und des gemessenen Gesamt-Ataxin-3-Protein-Levels bestand nicht (Abbildung 3.18b).

Signifikant niedrigere Messwerte des Gesamt-Ataxin-3-Proteins für eine CSDP von $\geq 2,0$ SARA-Score-Punkten pro Erkrankungsjahr

In der mit dem Mann-Whitney-Test durchgeführten Kohortenanalyse zeigte sich für die SCA3-Patienten-Kohorte mit einer CSDP von $\geq 2,0$ SARA-Score-Punkten pro Erkrankungsjahr ein signifikant niedrigeres Gesamt-Ataxin-3-Protein-Level

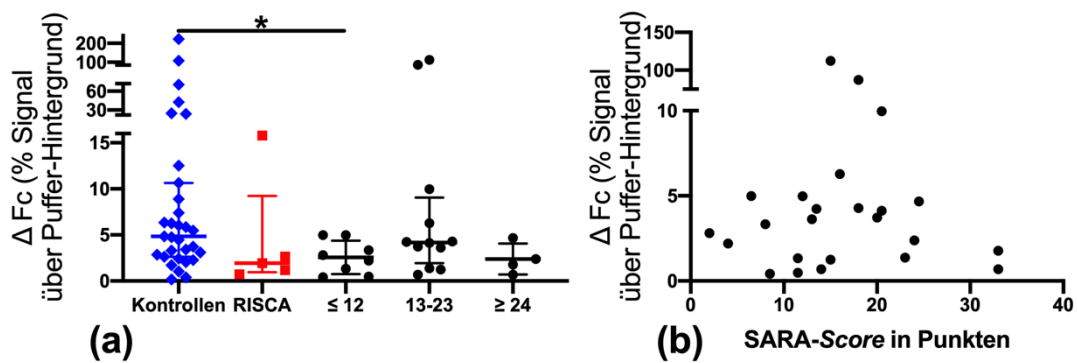


Abbildung 3.18: Korrelation des Gesamt-Ataxin-3-Proteins mit dem SARA-Score

Aufgetragen wurden die (a) Kohorten der Kontrollen, RISCA und SCA3-Patienten und (b) der SARA-Score der SCA3-Patienten linear gegen das gemessene ΔFc -Signal des Gesamt-Ataxin-3-Proteins. (a) Die mild betroffene SCA3-Patienten-Kohorte mit ≤ 12 Punkten zeigte gegenüber der Kontrollkohorte ein signifikant niedrigeres Level des Gesamt-Ataxin-3-Proteins (p-Wert: 0,0335). (b) Eine lineare Korrelation des SARA-Scores mit den Messwerten des Gesamt-Ataxin-3-Proteins lag nicht vor.

als das der Kontrollkohorte (p-Wert: 0,0259) (Abbildung 3.19a). Die Berechnung des linearen Korrelationskoeffizienten nach Spearman ergab keinen signifikanten Zusammenhang (Abbildung 3.19b).

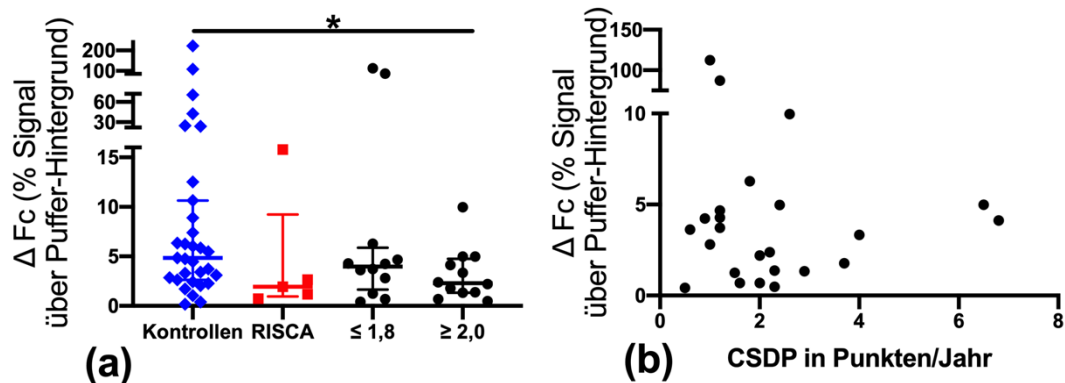


Abbildung 3.19: Korrelation des Gesamt-Ataxin-3-Proteins mit der CSDP

Aufgetragen wurden die (a) Kohorten der Kontrollen, RISCA und SCA3-Patienten und (b) die CSDP der SCA3-Patienten linear gegen das gemessene ΔFc -Signal des Gesamt-Ataxin-3-Proteins. (a) Mittels des Mann-Whitney-Tests berechnete sich ein signifikant niedrigeres Gesamt-Ataxin-3-Protein-Level der SCA3-Patienten-Kohorte mit einer CSDP von $\geq 2,0$ SARA-Score-Punkten pro Erkrankungsjahr (p-Wert: 0,0259). (b) In der Analyse einer linearen Korrelation zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang.

3.3.2 Korrelation des Gesamt-Ataxin-3-Proteins mit den CAG-Wiederholungen

In der nächsten Analyse wurde ein potenzieller Zusammenhang der CAG-Wiederholungen mit der Expression des Gesamt Ataxin-3 überprüft. Es waren die 21 SCA3-Patienten und vier RISCA mit bekannter Anzahl der CAG-Wiederholungen eingeschlossen. Korrelationen der Kohorten und der Linearität wurden mit den Messwerten der SCA3-Patienten (schwarz), der RISCA (rot) und der gemeinsamen Kohorte (violett) vorgenommen.

Keine signifikante Korrelation der gemessenen Gesamt-Ataxin-3-Level mit der Anzahl der CAG-Wiederholungen

Es zeigte sich durch Anwendung des Mann-Whitney-Tests eine signifikante Abnahme des Gesamt-Ataxin-3-Protein-Levels der Kontrollkohorte zur RISCA- und Gesamtkohorte mit ≤ 64 CAG-Wiederholungen (p-Wert (RISCA): 0,0177, p-Wert (gemeinsam): 0,0035) (Abbildung 3.20a). In der Analyse einer linearen Korrelation berechnete sich für keine Kohorte ein signifikanter Zusammenhang mit der CAG-Wiederholungsanzahl (Abbildung 3.20b).

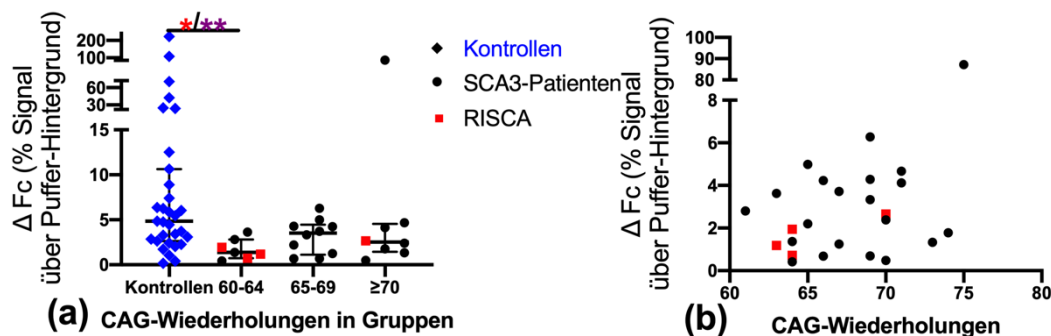


Abbildung 3.20: Korrelation des Gesamt-Ataxin-3-Proteins mit den CAG-Wiederholungen
 Aufgetragen wurden die (a) Kohorten der Kontrollen und unterschiedlicher CAG-Wiederholungsanzahl sowie (b) die CAG-Wiederholungen der SCA3-Patienten und RISCA linear gegen das gemessene ΔFc -Signal des Gesamt-Ataxin-3-Proteins. Kontrollen, RISCA und SCA3-Patienten sind farblich und durch Symbole gekennzeichnet (s. Legende). Korrelationen der SCA3-Patienten sind schwarz, der RISCA rot und der gemeinsamen Kohorte violett gekennzeichnet. (a) Die dicke horizontale Mittellinie stellt den Median und die beiden dünnen Linien ober- und unterhalb dieser den IQA dar. Nach dem Mann-Whitney-Test war die Abnahme der Gesamt-Ataxin-3-Protein-Messwerte der Kontrollkohorte zur RISCA- (p-Wert: 0,0177) und Gesamtkohorte (p-Wert: 0,0035) mit ≤ 64 CAG-Wiederholungen signifikant.

3.3.3 Korrelationen des Gesamt-Ataxin-3-Proteins mit den drei untersuchten *Ataxin-3*-Polymorphismen

In den nachfolgenden Darstellungen wurden Zusammenhänge der verschiedenen Allelausprägungen der *Ataxin-3*-Polymorphismen mit dem gemessenen Signal des Gesamt-Ataxin-3-Proteins analysiert. Eingeschlossen waren für den Polymorphismus A⁶⁶⁹/G⁶⁶⁹ 18 SCA3-Patienten und vier RISCA mit bekannter Ausprägung. Der Polymorphismus G⁹⁸⁷/C⁹⁸⁷ und C¹¹¹⁸/A¹¹¹⁸ wurde für zwölf SCA3-Patienten und drei RISCA erfolgreich ermittelt. Die Einteilung der Kohortenzugehörigkeit erfolgte über die Allelausprägungen. Die Prüfung der Korrelationen der Kohorten und der Linearität in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen wurde mit den Messwerten der SCA3-Patienten (schwarz), der RISCA (rot) und der gemeinsamen Kohorte (violett) vorgenommen.

Keine signifikante Korrelation der Polymorphismen A⁶⁶⁹/G⁶⁶⁹, G⁹⁸⁷/C⁹⁸⁷ und C¹¹¹⁸/A¹¹¹⁸ mit den Leveln des Gesamt-Ataxin-3-Proteins

Nach dem Shapiro-Wilk-Test waren die RISCA- (p-Wert: 0,7117) und die SCA3-Patienten-Kohorte (p-Wert: 0,0503) des Genotyps A⁶⁶⁹/G⁶⁶⁹ sowie die SCA3-Patienten- (p-Wert: 0,9524) und die Gesamtkohorte des Genotyps A⁶⁶⁹/A⁶⁶⁹ (p-Wert: 0,9279) normalverteilt. Diese bestand für die Polymorphismen G⁹⁸⁷/C⁹⁸⁷ und C¹¹¹⁸/A¹¹¹⁸ für die SCA3-Patienten- (p-Wert: 0,3728) und die Gesamtkohorte (p-Wert: 0,0602) der heterozygoten Ausprägung G⁹⁸⁷/C¹¹¹⁸-C⁹⁸⁷/A¹¹¹⁸.

Für die genotypischen Ausprägungsunterschiede der Polymorphismen bestand kein signifikanter Unterschied der Proteinlevel des Gesamt-Ataxin-3-Proteins (Abbildung 3.21a,c). In der Kohortenanalyse des Polymorphismus A⁶⁶⁹/G⁶⁶⁹ zeigten sich signifikant geringere Gesamt-Ataxin-3-Protein-Level der RISCA- (p-Wert: 0,0491), der SCA3-Patienten- (p-Wert: 0,0035) und der Gesamtkohorte (p-Wert: 0,0008) der Ausprägung A⁶⁶⁹/G⁶⁶⁹ gegenüber der Kontrollkohorte (Abbildung 3.21a). Eine signifikante Abnahme der Gesamt-Ataxin-3-Protein-Level detektierte sich für die RISCA- (p-Wert: 0,0137), die SCA3-Patienten- (p-Wert: 0,0154) und die Gesamtkohorte (p-Wert: 0,0019) der Allelausprägung G⁹⁸⁷/C¹¹¹⁸-C⁹⁸⁷/A¹¹¹⁸ (Abbildung 3.21c). In der Prüfung einer linearen Korrelation zeigte sich für keine Allelausprägung der jeweiligen Kohorte und des jeweiligen

Polymorphismus ein signifikanter Zusammenhang in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen mit dem Gesamt-Ataxin-3-Protein-Level (Abbildung 3.21b,d).

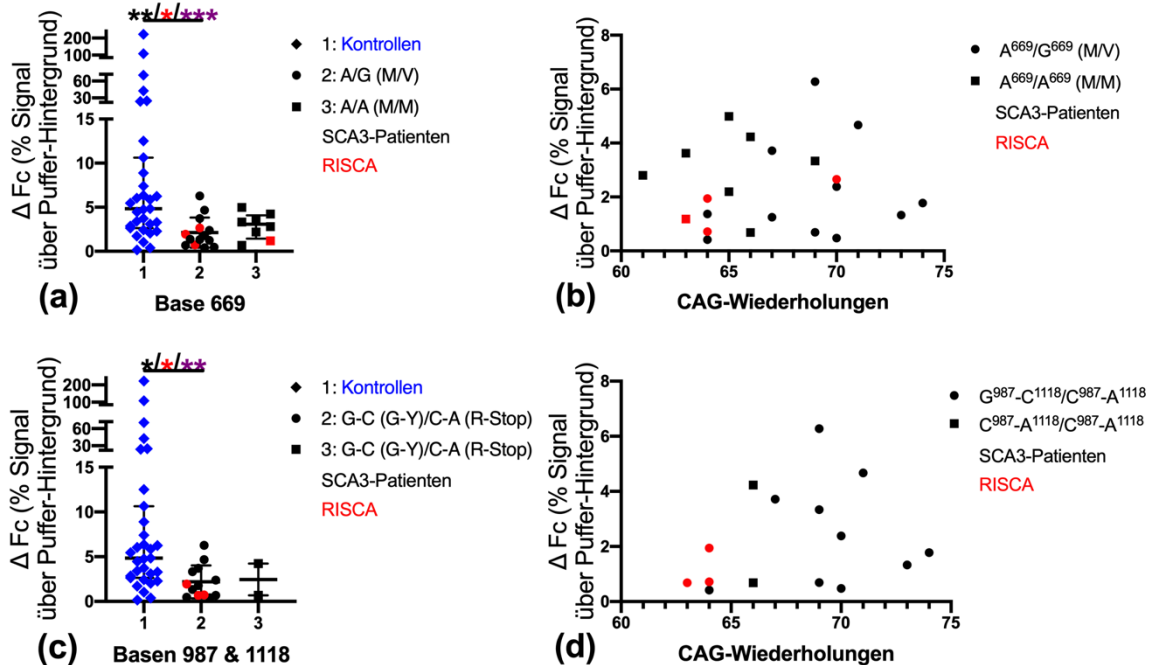


Abbildung 3.21: Korrelationen des Gesamt-Ataxin-3-Proteins mit den Ataxin-3-Polymorphismen A^{669}/G^{669} , G^{987}/C^{987} und C^{1118}/A^{1118}

Aufgetragen wurden die verschiedenen Allelausprägungen der Polymorphismen (a+b) A^{669}/G^{669} , (c+d) G^{987}/C^{987} und C^{1118}/A^{1118} (a+c) in Kohorten oder (b+d) linear in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen gegen das gemessene ΔFc -Signal des Gesamt-Ataxin-3-Proteins. Kontrollen, RISCA und SCA3-Patienten sind farblich und die Ausprägungen der Polymorphismen durch Symbole gekennzeichnet (s. Legende). (a+c) Im direkten Vergleich der identifizierten Ausprägungen der Polymorphismen zeigte sich keine signifikante Korrelation für die SCA3-Patienten-, die RISCA- oder die Gesamtkohorte. (a) Es wurden für die RISCA- (p-Wert: 0,0491), SCA3-Patienten- (p-Wert: 0,0035) und Gesamtkohorte (p-Wert: 0,0008) der Ausprägung A^{669}/G^{669} gegenüber der Kontrollkohorte signifikant niedrigere Gesamt-Ataxin-3-Protein-Level detektiert. (c) Signifikant war das höhere Gesamt-Ataxin-3-Signal der Kontrollkohorte gegenüber der RISCA- (p-Wert: 0,0137), der SCA3-Patienten- (p-Wert: 0,0154) und der Gesamtkohorte (p-Wert: 0,0019) des heterozygoten Genotyps $G^{987}/C^{1118}-C^{987}/A^{1118}$. (b+d) Die Prüfung einer linearen Korrelation in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen zeigte keinen Allel-spezifischen Zusammenhang des jeweiligen Polymorphismus in der SCA3-Patienten-, der RISCA- oder der Gesamtkohorte mit dem gemessenen Gesamt-Ataxin-3-Protein-Level.

3.3.4 Korrelationen des Gesamt-Ataxin-3-Proteins mit den drei untersuchten *Park2*-Polymorphismen

Ob die Allelausprägung der *Park2*-Polymorphismen die Expression des Gesamt-Ataxin-3-Proteins beeinflusst, wurde im nächsten Abschnitt untersucht. Für alle drei Polymorphismen G^{601}/A^{601} , G^{1239}/C^{1239} und G^{1281}/A^{1281} wurden 18 SCA3-Patienten und drei RISCA mit erfolgreicher Sequenzierung eingeschlossen. Die

Einteilung der Kohorten erfolgte nach der Allelausprägung. Die Untersuchung von Zusammenhängen zwischen den Kohorten und einer Linearität in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen mit dem Gesamt-Ataxin-3-Protein-Level erfolgte für die SCA3-Patienten-, die RISCA und die gemeinsame Kohorte.

Keine signifikanten Korrelationen der Polymorphismen G^{601}/A^{601} , G^{1239}/C^{1239} und G^{1281}/A^{1281} mit den Leveln des Gesamt-Ataxin-3-Proteins

Nach dem Shapiro-Wilk-Test erwiesen sich die SCA3-Patienten- (p-Wert: 0,3694) und die Gesamtkohorte (p-Wert: 0,9288) des Genotyps G^{601}/G^{601} als normalverteilt. Dies galt ebenso für die RISCA- (p-Wert: 0,0411), die SCA3-Patienten- (p-Wert: 0,0156) und die Gesamtkohorte (p-Wert: 0,3955) des Genotyps G^{1239}/G^{1239} sowie die SCA3-Patienten- (p-Wert: 0,0137) und die Gesamtkohorte (p-Wert: 0,2119) des Genotyps G^{1239}/C^{1239} . Für die RISCA- (p-Wert: 0,4427), die SCA3-Patienten- (p-Wert: 0,2774) und die Gesamtkohorte (p-Wert: p-Wert: 0,1164) des Genotyps G^{1281}/G^{1281} berechnete sich eine Normalverteilung.

Bei einmaliger Ausprägung der Genotypen G^{601}/A^{601} , A^{601}/A^{601} und A^{1281}/A^{1281} ließ sich statistisch keine Korrelation zwischen den Allelausprägungen mit dem Gesamt-Ataxin-3-Protein-Level prüfen.

In keiner der durchgeführten Kohortenanalysen wurden signifikante Korrelationen zwischen Ausprägungen der Polymorphismen in der jeweiligen Kohorte berechnet (Abbildung 3.22a,c,e).

Nach der Nutzung des Mann-Whitney-Tests zeigten sich für die RISCA- (p-Wert: 0,0165), die SCA3-Patienten- (p-Wert: 0,0079) und die Gesamtkohorte (p-Wert: 0,0014) der Ausprägung G^{601}/G^{601} signifikant geringere Gesamt-Ataxin-3-Protein-Level als in der Kontrollkohorte. (Abbildung 3.22a). In der Analyse des Polymorphismus G^{1239}/C^{1239} ließ sich das für die RISCA- (p-Wert: 0,0411), die SCA3-Patienten (p-Wert: 0,0156) und die Gesamtkohorte (p-Wert: 0,0042) der homozygoten G^{1239}/G^{1239} -Ausprägung sowie für die SCA3-Patienten- (p-Wert: 0,0137) und die Gesamtkohorte (p-Wert: 0,0059) der heterozygoten Ausprägung berechnen. Die Kohorte des Genotyps G^{1239}/C^{1239} exprimierte tendenziell weniger Gesamt-Ataxin-3-Protein gegenüber der Kohorte des Genotyps G^{1239}/G^{1239} (Abbildung 3.22c). Signifikant niedrigere Gesamt-Ataxin-3-Level im Vergleich zu der

Kontrollkohorte zeigten die RISCA- (p-Wert: 0,0411), die SCA3-Patienten- (p-Wert: 0,0029) und die Gesamtkohorte (p-Wert: 0,1164) des Genotyps G^{1281}/G^{1281} (Abbildung 3.22e). Ein linearer Zusammenhang der identifizierten Genotypen des jeweiligen Polymorphismus für die jeweilige Kohorte konnte nach Berechnung der Korrelationskoeffizienten nach Pearson bzw. Spearman nicht nachvollzogen werden (Abbildung 3.22b,d,f). Die Kohorten der Genotypen G^{1239}/G^{1239} und G^{1239}/C^{1239} deuteten die Tendenz einer PLK in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen mit dem Gesamt-Ataxin-3-Protein an (Abbildung 3.22d).

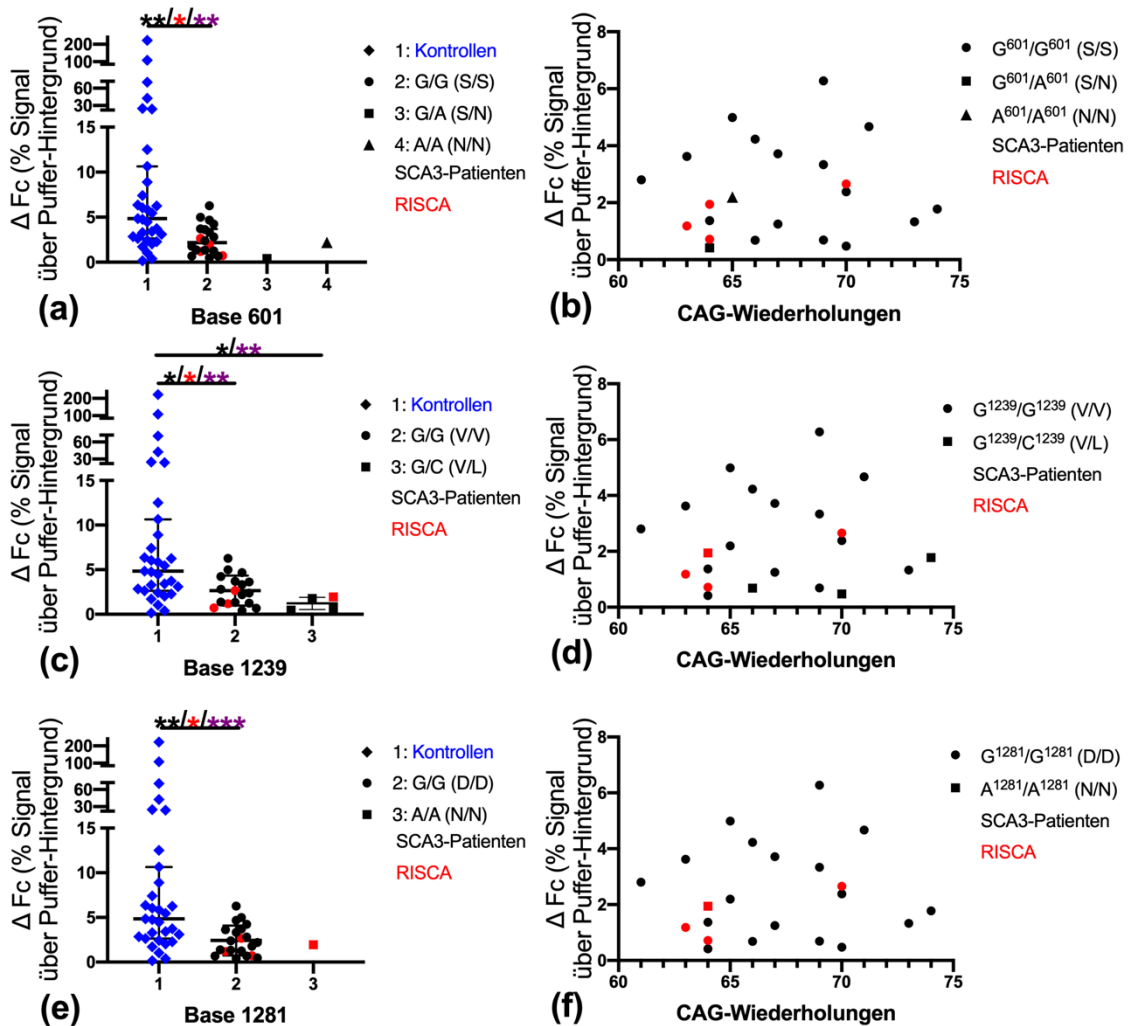


Abbildung 3.22: Korrelationen des Gesamt-Ataxin-3-Proteins mit den *Park2*-Polymorphismen G^{601}/A^{601} , G^{1239}/C^{1239} und G^{1281}/A^{1281}

Aufgetragen wurden die verschiedenen Allelausprägungen der Polymorphismen (a+b) G^{601}/A^{601} , (c+d) G^{1239}/C^{1239} und (e+f) G^{1281}/A^{1281} (a,c,e) in Kohorten oder (b,d,f) linear in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen gegen das gemessene ΔFc -Signal des Gesamt-Ataxin-3-Proteins. (a) Es wurden für die RISCA- (p-Wert: 0,0165), die SCA3-Patienten- (p-Wert: 0,0079) und die Gesamtkohorte (p-Wert: 0,0014) der Ausprägung G^{601}/G^{601} gegenüber der Kontrollkohorte signifikant

niedrigere Gesamt-Protein-3-Level detektiert. (c) Signifikant erhöht war das gemessene Signal des Gesamt-Ataxin-3-Proteins der Kontrollkohorte gegenüber der RISCA- (p-Wert: 0,0411), der SCA3-Patienten (p-Wert: 0,0156) und der Gesamtkohorte (p-Wert: 0,0042) der homozygoten G¹²³⁹/G¹²³⁹-Ausprägung sowie für die SCA3-Patienten- (p-Wert: 0,0137) und Gesamtkohorte (p-Wert: 0,0059) der heterozygoten Ausprägung des Polymorphismus. Die Kohorte des Genotyps G¹²³⁹/C¹²³⁹ exprimierte tendenziell weniger Gesamt-Ataxin-3-Protein gegenüber der Kohorte des Genotyps G¹²³⁹/G¹²³⁹. (e) Die RISCA- (p-Wert: 0,0411), die SCA3-Patienten- (p-Wert: 0,0029) und die Gesamtkohorte (p-Wert: 0,1164) des Genotyps G¹²⁸¹/G¹²⁸¹ zeigten ein signifikant niedrigeres Gesamt-Ataxin-3-Protein-Level als das der Kontrollkohorte. (b,d,f) Die Prüfung einer linearen Korrelation in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen zeigte keinen Allel-spezifischen Zusammenhang des jeweiligen Polymorphismus in der SCA3-Patienten-, der RISCA- und der Gesamtkohorte mit dem gemessenen Gesamt-Ataxin-3-Protein-Level. (d) Die Genotypen G¹²³⁹/G¹²³⁹ und G¹²³⁹/C¹²³⁹ zeigten die Tendenz einer PLK.

3.3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der Korrelationsprüfungen des Gesamt-Ataxin-3-Proteins

Die nachfolgende Tabelle 3.4 fasst die Ergebnisse, der unter 3.3 erläuterten Analysen zusammen. Sie dienen der Beantwortung der Hauptfragestellung, ob das Gesamt-Ataxin-3-Protein als Prognose- oder Verlaufsbiomarker einsetzbar ist.

Tabelle 3.4: Zusammenfassung der Korrelationsprüfungen für das Gesamt-Ataxin-3-Protein

Die verschiedenen Allelausprägungen sind zur Kennzeichnung ihrer Signifikanz unterschiedlich farblich gekennzeichnet.

Welcher Verteilung folgten die Δ Fc Gesamt-Ataxin-3-Protein-Level (in % über dem Pufferhintergrund) in der jeweiligen Kohorte?	
SCA3-Patienten	3,48 (IQA: 1,36-4,74)
RISCA	1,94 (IQA: 1,18-2,66)
Kontrollen	4,84 (IQA: 2,74-9,76)
Gab es einen Zusammenhang der klinischen Verlaufparameter mit dem Gesamt-Ataxin-3-Protein-Level?	
Krankheitsstatus	– kein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll-, RISCA- und SCA3-Patienten-Kohorte – breite Streuung der Messwerte der Kontrollkohorte
AAO	– keine Korrelation mit AAO
Krankheitsdauer	– keine Korrelation mit Krankheitsdauer
SARA-Score	– signifikant geringeres Level der SCA3-Patienten mit ≤ 12 Punkten (p-Wert: *)
CSDP	– signifikant geringeres Level der SCA3-Patienten mit ≥ 2,0 SARA-Score-Punkte/Erkrankungsjahr (p-Wert: *)

Hatte die genetische Ausprägung der SCA3-Patienten- und RISCA-Kohorte einen Einfluss auf die gemessenen Gesamt-Ataxin-3-Protein-Level?	
CAG-Wiederholungen	<p>≤ 64 CAG-Wiederholungen:</p> <ul style="list-style-type: none"> – signifikant geringere Level der RISCA- (p-Wert: *) und Gesamtkohorte (p-Wert: **)
Ataxin-3-Polymorphismen A ⁶⁶⁹ /G ⁶⁶⁹ , G ⁹⁸⁷ /C ⁹⁸⁷ und C ¹¹¹⁸ /A ¹¹¹⁸	<p>Genotypen A⁶⁶⁹/G⁶⁶⁹ und G⁹⁸⁷/C¹¹¹⁸-C⁹⁸⁷/A¹¹¹⁸:</p> <ul style="list-style-type: none"> – signifikant geringere Level der SCA3-Patienten- (p-Wert: **, *), RISCA- (p-Wert: *, *) und Gesamtkohorten (p-Wert: **, **)
Park2-Polymorphismen G ⁶⁰¹ /A ⁶⁰¹ , G ¹²³⁹ /C ¹²³⁹ und G ¹²⁸¹ /A ¹²⁸¹	<p>Genotypen G⁶⁰¹/G⁶⁰¹, G¹²³⁹/G¹²³⁹, G¹²³⁹/C¹²³⁹, G¹²⁸¹/G¹²⁸¹:</p> <ul style="list-style-type: none"> – signifikant geringere Level der SCA3-Patienten- (p-Wert: **, *, *, **), RISCA- (p-Wert: *, *, *) und Gesamtkohorten (p-Wert: **, **, **, ***)

3.4 Korrelationen des expandierten Ataxin-3-Proteins

Die quantitative und qualitative Bestimmung des expandierten Ataxin-3-Proteins erfolgte mittels des TR-FRET-Assays unter Nutzung des Tb-markierten Anti-Ataxin-3-1H9- und des D2-markierten MW1-Antikörpers in Proben von 24 SCA3-Patienten, fünf RISCA und 31 Kontrollen. Es ergab sich für das ΔFc der SCA3-Patienten ein Median von 41,27 (IQA: 14,05-119,93), für die RISCA ein arithmetisches Mittel von 81,49 (SD: $\pm 75,82$) und für die Kontrollen ein Median von 16,66 (IQA: 8,42-36,57) (Tabelle 3.5 und Abbildung 3.23). Die Werte der RISCA-Kohorte waren nach dem Shapiro-Wilk-Test normalverteilt (p-Wert: 0,4424). Um eine mögliche Funktion als Surrogatmarker für therapeutische RCTs zu untersuchen, wurden die gemessenen Proteinlevel mit klinischen und genetischen Parametern korreliert.

Zunächst wurden die Kohorten der SCA3-Patienten, der RISCA und der Kontrollen miteinander verglichen, um die Rolle des Krankheitsstatus zu prüfen.

Nach Anwendung des Mann-Whitney-Tests lag ein signifikant höheres Level des expandierten Ataxin-3-Proteins der SCA3-Patienten- gegenüber der Kontrollkohorte vor (p-Wert: 0,0324). Die RISCA-Kohorte zeigte tendenziell höhere Level des expandierten Ataxin-3-Proteins als die Kontroll- und niedrigere Level als die SCA3-Patienten-Kohorte (Abbildung 3.23).

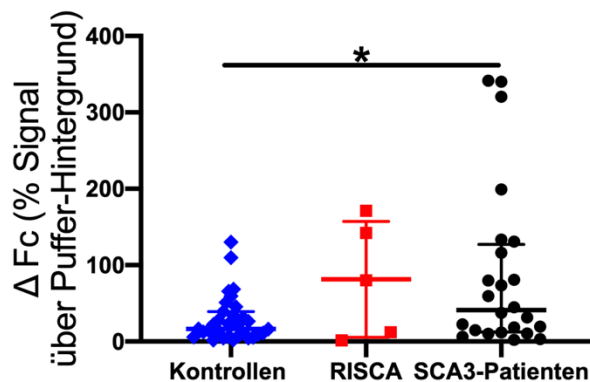


Abbildung 3.23: Korrelation des expandierten Ataxin-3-Proteins mit dem Erkrankungsstatus

Aufgetragen wurden die Kohorten der Kontrollen, RISCA und SCA3-Patienten gegen das gemessene ΔFc -Signal des expandierten Ataxin-3-Proteins. Nach Ermittlung einer Normalverteilung stellte die dicke horizontale Mittellinie das arithmetische Mittel bzw. den Median und die beiden dünnen Linien ober- und unterhalb die SD bzw. den IQA dar. Es errechnete sich ein signifikant höheres Level des expandierten Ataxin-3-Proteins der SCA3-Patienten- gegenüber der Kontrollkohorte (p-Wert: 0,0324). Die RISCA-Kohorte zeigte tendenziell höhere Level des expandierten Ataxin-3-Proteins gegenüber der Kontroll- und geringere Level gegenüber der SCA3-Patienten-Kohorte.

3.4.1 Korrelationen des expandierten Ataxin-3-Proteins mit den klinischen Parametern

Die gemessenen ΔFc -Signale des expandierten Ataxin-3-Proteins wurden in den Analysen dieses Abschnitts mit dem AAO, der Krankheitsdauer, dem SARA-Score und der CSDP korreliert. Die Kohortenanalyse wurde mit der unter 3.2.1 erläuterten Aufteilung der SCA3-Patienten vorgenommen. Für die SCA3-Patienten wurde ein linearer Zusammenhang der klinischen Parameter mit dem gemessenen Proteinsignal untersucht.

Signifikant erhöhtes Level des expandierten Ataxin-3-Proteins für ein AAO von ≤ 40 Jahren

Neben der RISCA- war die SCA3-Patienten-Kohorte mit einem AAO von ≥ 45 Jahren normalverteilt (p-Wert: 0,2187). In dieser Analyse mit Anwendung des Mann-Whitney-Tests ergab sich ein signifikant erhöhtes Level des expandierten Ataxin-3-Proteins für die SCA3-Patienten-Kohorte mit einem AAO von ≤ 40 Jahren gegenüber der Kontrollkohorte (p-Wert: 0,0223) (Abbildung 3.24a). Die Ermittlung des linearen Korrelationskoeffizienten nach Spearman ergab keinen

Zusammenhang des expandierten Ataxin-3-Proteins mit dem AAO (Abbildung 3.24b).

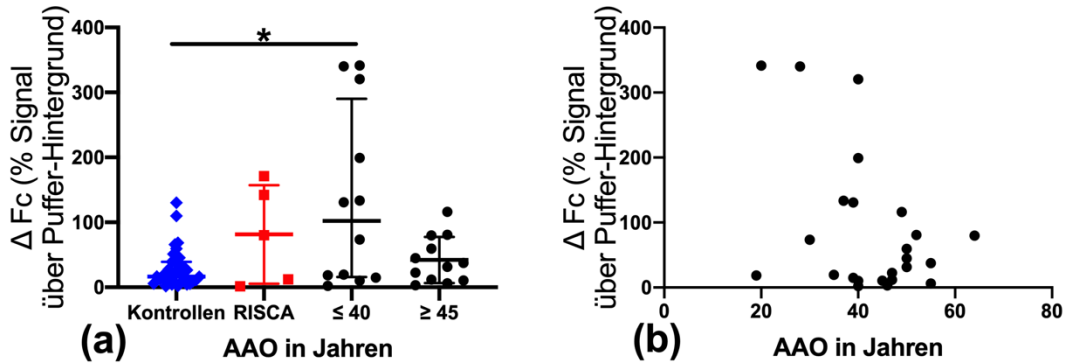


Abbildung 3.24: Korrelation des expandierten Ataxin-3-Proteins mit dem AAO

Aufgetragen wurden die (a) Kohorten der Kontrollen, RISCA und SCA3-Patienten und (b) das AAO der SCA3-Patienten linear gegen das gemessene ΔFc -Signal des expandierten Ataxin-3-Proteins. (a) In der Kohortenanalyse zeigten sich für die SCA3-Patienten-Kohorte mit einem AAO ≤ 40 Jahre signifikant höhere Level des expandierten Ataxin-3-Proteins (p -Wert: 0,0223). (b) Ein signifikanter linearer Zusammenhang lag nicht vor.

Signifikant erhöhtes Level des expandierten Ataxin-3-Proteins bei einer Krankheitsdauer von ≥ 10 Jahren und signifikante PLK mit dieser

In der Kohortenanalyse berechnete sich nach Nutzung des Mann-Whitney-Tests ein deutlich höheres Level des expandierten Ataxin-3-Proteins für eine Krankheitsdauer von ≥ 10 Jahren gegenüber der Kontrollkohorte (p -Wert: 0,0100) (Abbildung 3.25a). Die Ermittlung des linearen Korrelationskoeffizienten nach Spearman zeigte eine signifikante PLK des expandierten Ataxin-3-Proteins bei fortlaufender Krankheitsdauer (p -Wert: 0,0332) (Abbildung 3.25b).

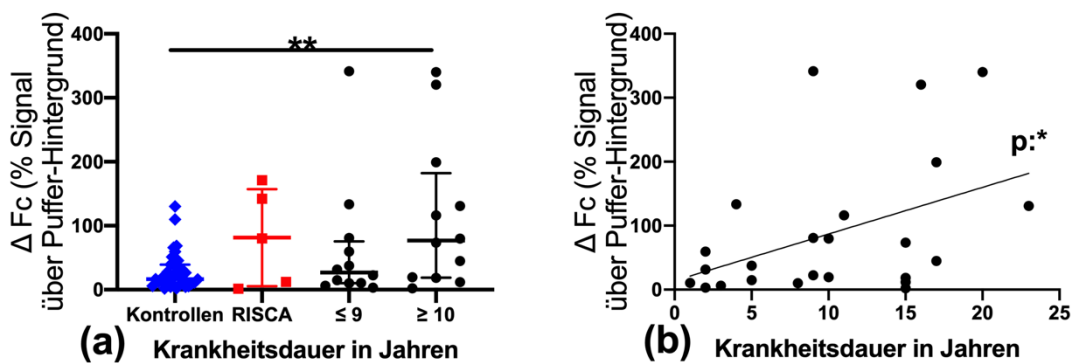


Abbildung 3.25: Korrelation des expandierten Ataxin-3-Proteins mit der Krankheitsdauer

Aufgetragen wurden die (a) Kohorten der Kontrollen, RISCA und SCA3-Patienten und (b) die Krankheitsdauer der SCA3-Patienten linear gegen das gemessene ΔFc -Signal des expandierten Ataxin-3-Proteins. (a) Für die SCA3-Patienten-Kohorte mit einer Krankheitsdauer von ≥ 10 Jahre zeigte sich ein signifikant höheres expandiertes Ataxin-3-Protein-Level gegenüber der Kontrollkohorte (p-Wert: 0,0100). (b) Es bestand eine signifikante PLK der Level des expandierten Ataxin-3-Proteins mit der Krankheitsdauer.

Signifikant höchste Level des expandierten Ataxin-3-Proteins für einen SARA-Score von ≥ 24 Punkten

Neben der RISCA- war die SCA3-Patienten-Kohorte mit einem SARA-Score von ≥ 24 Punkten nach Nutzung des Shapiro-Wilk-Tests normalverteilt (p-Wert: 0,2575).

Nach Anwendung des Mann-Whitney-Tests hatte die stark betroffene SCA3-Patienten-Kohorte mit ≥ 24 Punkten im Vergleich zu der Kontrollkohorte (p-Wert: $<0,0001$), der mild (p-Wert: 0,0283) und moderat betroffenen (p-Wert: 0,002) SCA3-Patienten-Kohorten ein signifikant höheres Level des expandierten Ataxin-3-Proteins. Für die RISCA-Kohorte wurde dieselbe signifikante Korrelation für das expandierte Ataxin-3-Protein durch den ungepaarten t-Test bestätigt (p-Wert: 0,0305) (Abbildung 3.26a). Die gemessenen Level des expandierten Ataxin-3-Proteins deuteten die Tendenz einer PLK mit dem SARA-Score an (Abbildung 3.26b).

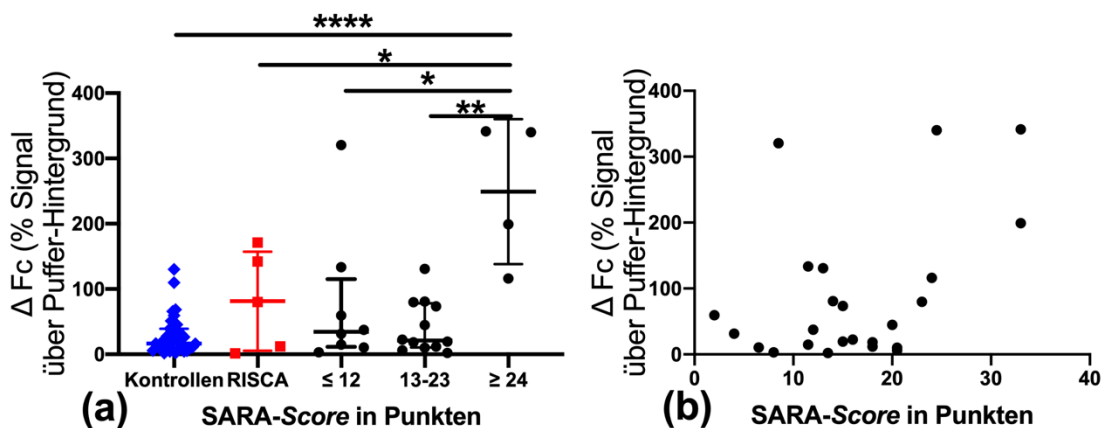


Abbildung 3.26: Korrelation des expandierten Ataxin-3-Proteins mit dem SARA-Score
 Aufgetragen wurden die (a) Kohorten der Kontrollen, RISCA und SCA3-Patienten und (b) der SARA-Score der SCA3-Patienten linear gegen das gemessene ΔFc -Signal des expandierten Ataxin-3-Proteins. (a) Die schwer betroffenen SCA3-Patienten mit ≥ 24 Punkten zeigten gegenüber der Kontroll- (p-Wert: $<0,0001$), der RISCA- (p-Wert: 0,0305), der mild (p-Wert: 0,0283) und der moderat (p-Wert: 0,002) betroffenen SCA3-Patienten-Kohorten ein signifikant höheres Level des

expandierten Ataxin-3-Proteins. (b) Tendenziell war eine PLK der gemessenen Level des expandierten Ataxin-3-Proteins mit dem SARA-Score zu sehen.

Signifikant erhöhtes Level des expandierten Ataxin-3-Proteins bei einer CSDP von $\leq 1,8$ SARA-Score-Punkten pro Erkrankungsjahr

Die Analysen mit dem Mann-Whitney-Test zeigten bei der SCA3-Patienten-Kohorte mit einem langsameren Krankheitsfortschritt von $\leq 1,8$ SARA-Score-Punkten pro Erkrankungsjahr gegenüber der Kontrollkohorte ein signifikant höheres Level des expandierten Ataxin-3-Proteins (p-Wert: 0,0397). Tendenziell zeigte sich für die SCA3-Patienten-Kohorte mit einer CSDP von $\geq 2,0$ SARA-Score-Punkten pro Erkrankungsjahr erhöhte Level des expandierten Ataxin-3-Proteins. (Abbildung 3.27a). Ein signifikanter linearer Zusammenhang stellte sich nicht dar (Abbildung 3.27b).

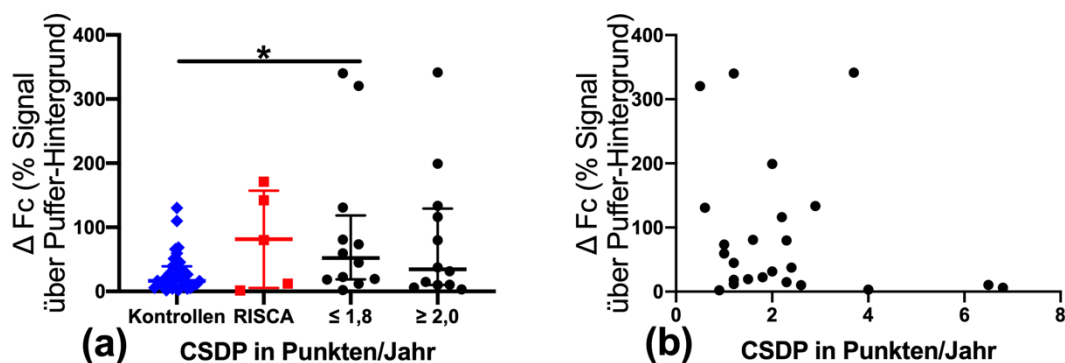


Abbildung 3.27: Korrelation des expandierten Ataxin-3-Proteins mit der CSDP

Aufgetragen wurden die (a) Kohorten der Kontrollen, RISCA und SCA3-Patienten und (b) die CSDP der SCA3-Patienten linear gegen das gemessene ΔFc -Signal des expandierten Ataxin-3-Proteins. (a) Gegenüber der Kontrollkohorte zeigten die SCA3-Patienten-Kohorte mit einer CSDP von $\leq 1,8$ SARA-Score-Punkten pro Erkrankungsjahr signifikant (p-Wert: 0,0397) und die SCA3-Patienten-Kohorte mit einer CSDP von $\geq 2,0$ SARA-Score-Punkten pro Erkrankungsjahr tendenziell erhöhte Level des expandierten Ataxin-3-Proteins. (b) Eine signifikante lineare Korrelation wurde nicht ermittelt.

Insgesamt zeigten sich höhere Level des expandierten Ataxin-3-Proteins bei längerer Krankheitsdauer, einem frühen AAO, hohen SARA-Score-Punkten und einer langsamen CSDP.

3.4.2 Korrelation des expandierten Ataxin-3-Proteins mit den CAG-Wiederholungen

Im nächsten Abschnitt wurde die Abhängigkeit der gemessenen Level des expandierten Ataxin-3-Proteins von der Anzahl der CAG-Wiederholungen geprüft. Eingeschlossen waren 21 SCA3-Patienten und vier RISCA mit bekannter Anzahl der CAG-Wiederholungen. Korrelationen der Kohorten und der Linearität wurden mit den Messwerten der SCA3-Patienten (schwarz), der RISCA (rot) und der gemeinsamen Kohorte (violett) vorgenommen.

In der mit dem Mann-Whitney-Test durchgeführten Kohortenanalyse zeigte sich ein signifikant höheres Level des expandierten Ataxin-3-Proteins der SCA3-Patienten- (p-Wert: 0,0015), der RISCA- (p-Wert: 0,0013) und der Gesamtkohorte (p-Wert: <0,0001) mit ≤ 64 CAG-Wiederholungen gegenüber der Kontrollkohorte. Die Abnahme des expandierten Ataxin-3-Protein-Levels dieser Gesamtkohorte zur Gesamtkohorte mit 65 bis 69 CAG-Wiederholungen war signifikant (p-Wert: 0,0097) (Abbildung 3.28a). Die Ermittlung des linearen Korrelationskoeffizienten nach Spearman zeigte für keine Kohorte einen Zusammenhang der gemessenen Level des expandierten Ataxin-3-Proteins und der CAG-Wiederholungen (Abbildung 3.28b).

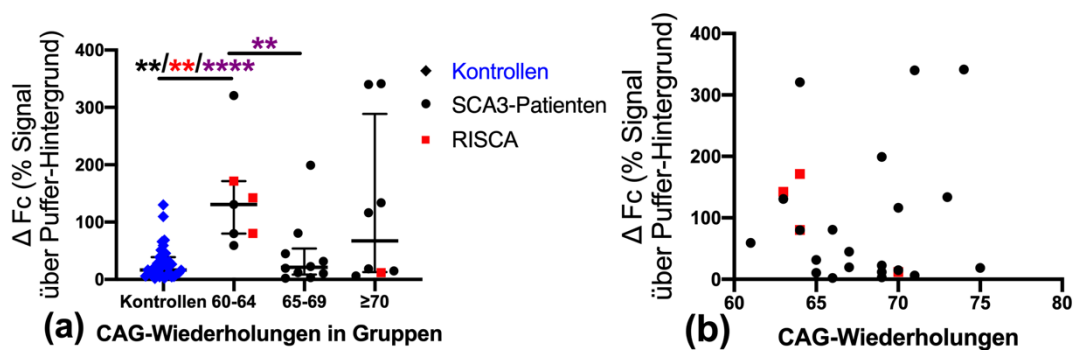


Abbildung 3.28: Korrelation des expandierten Ataxin-3-Proteins mit den CAG-Wiederholungen

Aufgetragen wurden die (a) Kohorten der Kontrollen und unterschiedlicher CAG-Wiederholungsanzahl sowie (b) die CAG-Wiederholungen der SCA3-Patienten und RISCA linear gegen das gemessene ΔFc -Signal des expandierten Ataxin-3-Proteins. Kontrollen, RISCA und SCA3-Patienten sind farblich und durch Symbole gekennzeichnet (s. Legende). Korrelationen der SCA3-Patienten sind schwarz, der RISCA rot und der gemeinsamen Kohorte violett markiert. (a) Die dicke horizontale Mittellinie stellt den Median und die beiden dünnen Linien ober- und unterhalb dieser den IQA dar. Nach Nutzung des Mann-Whitney-Tests ergab sich ein signifikant höheres Level des expandierten Ataxin-3-Proteins der SCA3-Patienten- (p-Wert: 0,0015), der RISCA- (p-Wert: 0,0013) und der Gesamtkohorte (p-Wert: <0,0001) mit ≤ 64 CAG-Wiederholungen

gegenüber der Kontrollkohorte dar. Diese Gesamtkohorte hatte gegenüber der Gesamtkohorte mit 65-69 CAG-Wiederholungen ebenso ein signifikant höheres Level des expandierten Ataxin-3-Proteins (p-Wert: 0,0097). (b) Die Berechnung eines linearen Korrelationskoeffizienten erbrachte kein signifikantes Ergebnis.

3.4.3 Korrelationen des expandierten Ataxin-3-Proteins mit den drei untersuchten *Ataxin-3*-Polymorphismen

In den nachfolgenden Analysen wurden Zusammenhänge der verschiedenen Allelausprägungen der *Ataxin-3*-Polymorphismen mit den gemessenen Konzentrationsleveln des expandierten Ataxin-3-Proteins geprüft. Eingeschlossen waren für den Polymorphismus A⁶⁶⁹/G⁶⁶⁹ 18 SCA3-Patienten und vier RISCA mit bekannter Ausprägung. Für den Polymorphismus G⁹⁸⁷/C⁹⁸⁷ und C¹¹¹⁸/A¹¹¹⁸ waren nach dem gleichen Kriterium zwölf SCA3-Patienten und drei RISCA eingeschlossen. Die Einteilung der Kohortenzugehörigkeit erfolgte über die Allelausprägungen. Die Prüfung der Korrelationen der Kohorten und der Linearität in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen wurde mit den Messwerten der SCA3-Patienten (schwarz), der RISCA (rot) und der gemeinsamen Kohorte (violett) vorgenommen.

Signifikant höhere Level des expandierten Ataxin-3-Proteins der Genotypen A⁶⁶⁹/G⁶⁶⁹ und G⁹⁸⁷-C¹¹¹⁸/C⁹⁸⁷-A¹¹¹⁸

Nach Nutzung des Shapiro-Wilk-Tests war die Gesamtkohorte des Genotyps A⁶⁶⁹/A⁶⁶⁹ (p-Wert: 0,1802) normalverteilt. Diese bestand bei den Polymorphismen G⁹⁸⁷/C⁹⁸⁷ und C¹¹¹⁸/A¹¹¹⁸ für die Gesamtkohorte der heterozygoten Ausprägung G⁹⁸⁷/C¹¹¹⁸-C⁹⁸⁷/A¹¹¹⁸ (p-Wert: 0,1093).

Im direkten Vergleich der Kohorten mit unterschiedlichen Allelausprägungen der Polymorphismen berechnete sich für die SCA3-Patienten- (p-Wert: 0,0007) und die Gesamtkohorte (p-Wert: <0,0001) des Genotyps A⁶⁶⁹/G⁶⁶⁹ ein signifikant höheres Level des expandierten Ataxin-3-Proteins gegenüber der Kontrollkohorte (Abbildung 3.29a). Auch der heterozygote Genotyp G⁹⁸⁷/C¹¹¹⁸-C⁹⁸⁷/A¹¹¹⁸ der Polymorphismen G⁹⁸⁷/C⁹⁸⁷ und C¹¹¹⁸/A¹¹¹⁸ zeigte gegenüber der Kontrollkohorte in der SCA3-Patienten- (p-Wert: 0,0079), der RISCA- (p-Wert: 0,0013) und der Gesamtkohorte (p-Wert: 0,0005) signifikant höhere Level des expandierten Ataxin-3-Proteins (Abbildung 3.29c). Die Prüfung einer Linearität mit dem Level des

expandierten Ataxin-3-Proteins erbrachte für keine Allelausprägung der jeweiligen Kohorte und des jeweiligen Polymorphismus in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen einen signifikanten Zusammenhang (Abbildung 3.29b,d).

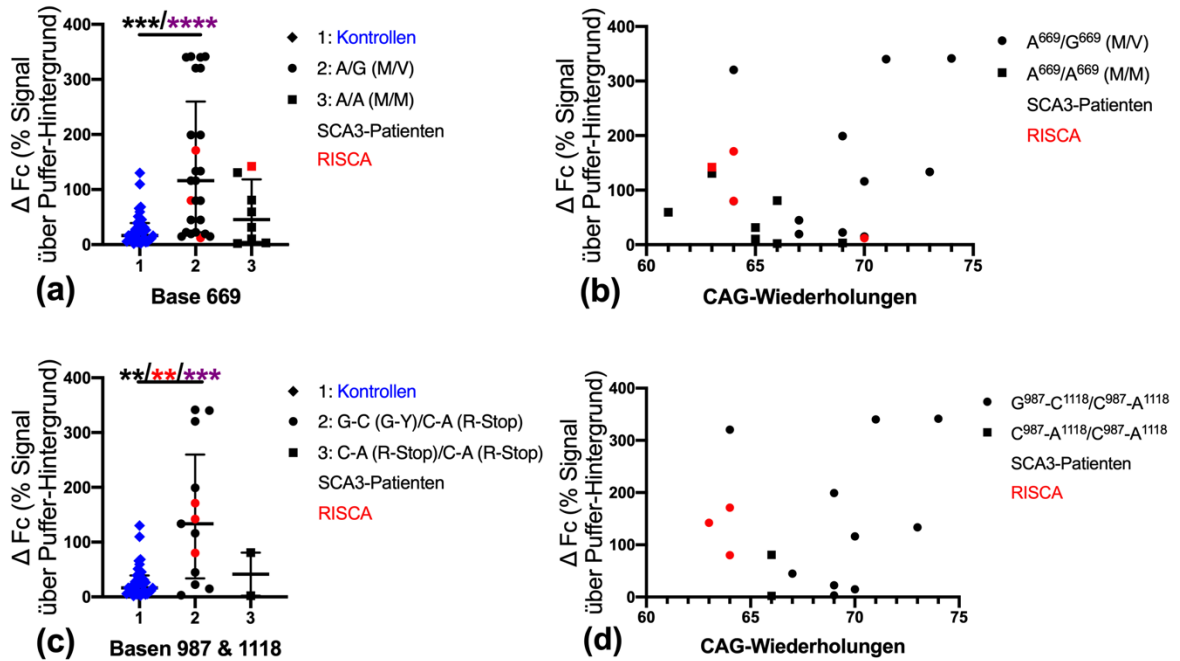


Abbildung 3.29: Korrelationen des expandierten Ataxin-3-Proteins mit den Ataxin-3-Polymorphismen A^{669}/G^{669} , G^{987}/C^{987} und C^{1118}/A^{1118}

Aufgetragen wurden die verschiedenen Allelausprägungen der Polymorphismen (a+b) A^{669}/G^{669} , (c+d) G^{987}/C^{987} und C^{1118}/A^{1118} (a+c) in Kohorten oder (b+d) linear in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen gegen das gemessene ΔFc -Signal des expandierten Ataxin-3-Proteins. Kontrollen, RISCA und SCA3-Patienten sind farblich und die Ausprägungen der Polymorphismen durch Symbole gekennzeichnet (s. Legende). (a+c) Im direkten Vergleich der identifizierten Ausprägungen der Polymorphismen zeigte sich keine signifikante Korrelation für die SCA3-Patienten-, die RISCA- und die Gesamtkohorte. (a) Es wurden für die SCA3-Patienten- (p-Wert: 0,0007) und Gesamtkohorte (p-Wert: <0,0001) der Ausprägung A^{669}/G^{669} gegenüber der Kontrollkohorte signifikant höhere Level des expandierten Ataxin-3-Proteins detektiert. (c) Für den heterozygoten Genotyp G^{987}/C^{1118} - C^{987}/A^{1118} waren in der SCA3-Patienten- (p-Wert: 0,0079), der RISCA- (p-Wert: 0,0013) und der Gesamtkohorte (p-Wert: 0,0005) die gemessenen Level des expandierten Ataxin-3-Proteins signifikant höher als in der Kontrollkohorte. (b+d) Die Prüfung einer linearen Korrelation in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen zeigte keinen Allel-spezifischen Zusammenhang des jeweiligen Polymorphismus in der SCA3-Patienten-, der RISCA- und der Gesamtkohorte mit dem gemessenen Level des expandierten Ataxin-3-Proteins.

3.4.4 Korrelationen des expandierten Ataxin-3-Proteins mit den drei untersuchten *Park2*-Polymorphismen

Im abschließenden Teil der Korrelationsberechnungen für das expandierte Ataxin-3-Protein wurde sein Expressionslevel in Abhängigkeit der Ausprägung der drei *Park2*-Polymorphismen G^{601}/A^{601} , G^{1239}/C^{1239} und G^{1281}/A^{1281} überprüft.

Eingeschlossen wurden 18 SCA3-Patienten und drei RISCA deren Genotyp ermittelt werden konnte. Die Untersuchung von Zusammenhängen zwischen den Kohorten und einer Linearität in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen mit dem Level des expandierten Ataxin-3-Proteins erfolgte für die SCA3-Patienten-, die RISCA und die gemeinsame Kohorte.

Signifikant höhere Level des expandierten Ataxin-3-Proteins der Genotypen G^{601}/G^{601} , G^{1239}/G^{1239} , G^{1239}/C^{1239} und G^{1281}/G^{1281}

Nach Nutzung des Shapiro-Wilk-Tests erwiesen sich die RISCA-Kohorten des Genotyps G^{601}/G^{601} (p-Wert: 0,7599), G^{1239}/G^{1239} (p-Wert: 0,9465) und G^{1281}/G^{1281} (p-Wert: 0,9465) sowie die SCA3-Patienten- (p-Wert: 0,3668) und Gesamtkohorte (p-Wert: 0,7403) des Genotyps G^{1239}/C^{1239} normalverteilt.

Bei einmaliger Ausprägung der Genotypen G^{601}/A^{601} , A^{601}/A^{601} und A^{1281}/A^{1281} ließ sich für diese keine Korrelation zwischen den Allelausprägungen mit dem Level des expandierten Ataxin-3-Proteins prüfen.

Im direkten Vergleich der Level des expandierten Ataxin-3-Proteins der verschiedenen Allelausprägungen zeigten diese untereinander für den jeweiligen Polymorphismus keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 3.30a,c,e). Für die SCA3-Patienten- (p-Wert: 0,0202), die RISCA- (p-Wert: 0,0372) und die Gesamtkohorte (p-Wert: 0,0052) des Genotyps G^{601}/G^{601} ergab sich nach Nutzung des Mann-Whitney-Tests ein signifikant höheres Level des expandierten Ataxin-3-Proteins gegenüber der Kontrollkohorte (Abbildung 3.30a). In der Analyse des Polymorphismus G^{1239}/C^{1239} ließ sich dies gegenüber der Kontrollkohorte für die SCA3-Patienten- (p-Wert: 0,0204) und die Gesamtkohorte (p-Wert: 0,0101) des Genotyps G^{1239}/G^{1239} sowie für die Gesamtkohorte des Genotyps der heterozygoten Ausprägung des Polymorphismus (p-Wert: 0,0274) darstellen (Abbildung 3.30c). Signifikant erhöhte Level des expandierten Ataxin-3-Proteins exprimierten die SCA3-Patienten- (p-Wert: 0,0089) und die Gesamtkohorte (p-Wert: 0,0048) des Genotyps G^{1281}/G^{1281} (Abbildung 3.30e). Für keine Allelausprägung des jeweiligen Polymorphismus der analysierten Kohorten konnte ein signifikanter linearer Zusammenhang in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen mit den

Leveln des expandierten Ataxin-3-Proteins festgestellt werden (Abbildung 3.30b,d,f).

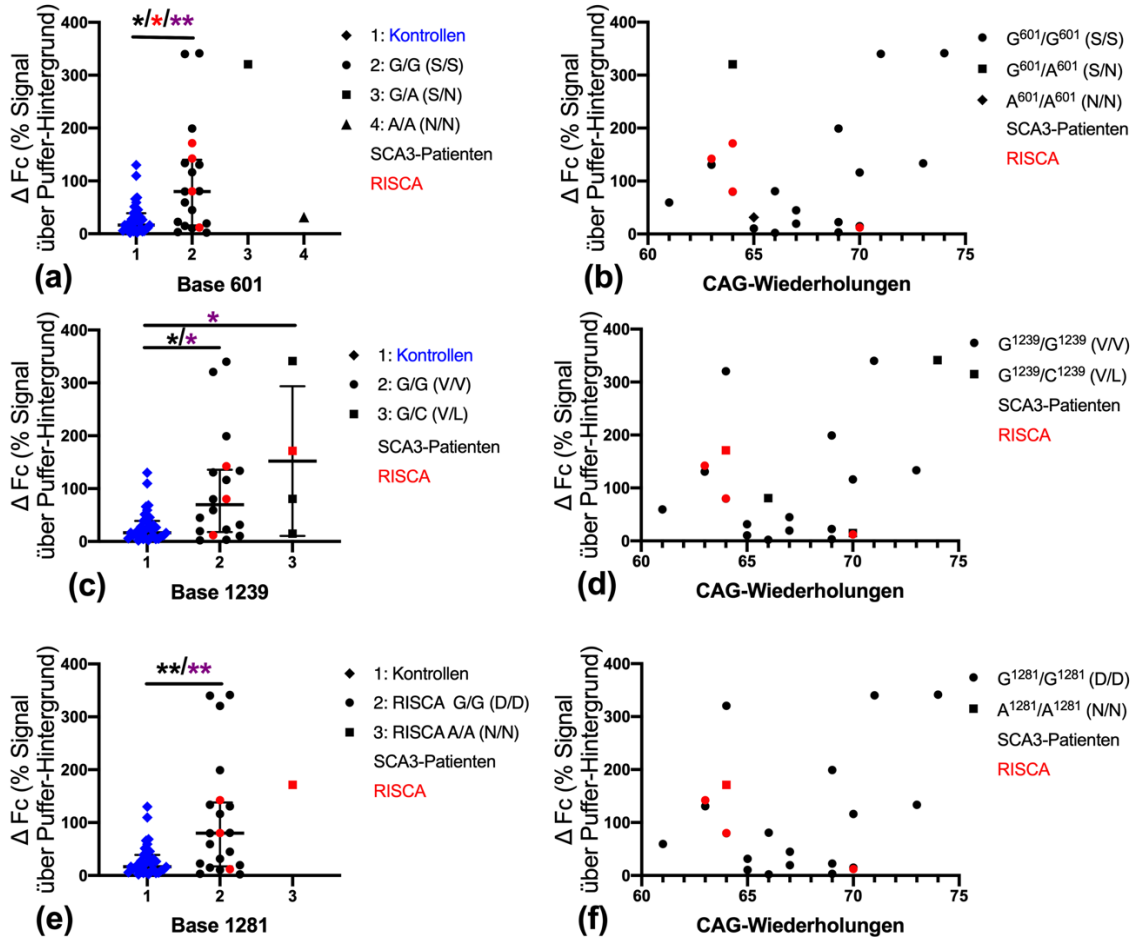


Abbildung 3.30: Korrelationen des expandierten Ataxin-3-Proteins mit den *Park2*-Polymorphismen G^{601}/A^{601} , G^{1239}/C^{1239} und G^{1281}/A^{1281}

Aufgetragen wurden die verschiedenen Allelausprägungen der Polymorphismen (a+b) G^{601}/A^{601} , (c+d) G^{1239}/C^{1239} und (e+f) G^{1281}/A^{1281} (a,c,e) in Kohorten oder (b,d,f) linear in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen gegen das gemessene ΔFc -Signal des expandierten Ataxin-3-Proteins. (a) Nach Nutzung des Mann-Whitney-Tests war das gemessene Level des expandierten Ataxin-3-Proteins der Kontrollkohorte signifikant geringer gegenüber der RISCA- (p-Wert: 0,0372), der SCA3-Patienten- (p-Wert: 0,0202) und der Gesamtkohorte (p-Wert: 0,0052) des Genotyps G^{601}/G^{601} . (c) Signifikant niedriger war das gemessene Level des expandierten Ataxin-3-Proteins der Kontrollkohorte gegenüber der SCA3-Patienten- (p-Wert: 0,0204) und der Gesamtkohorte (p-Wert: 0,0101) der homozygoten Ausprägung G^{1239}/G^{1239} sowie für die Gesamtkohorte (p-Wert: 0,0274) der heterozygoten Ausprägung des Polymorphismus. (e) Die SCA3-Patienten- (p-Wert: 0,0089) und die Gesamtkohorte (p-Wert: 0,0048) des Genotyps G^{1281}/G^{1281} zeigten ein signifikant höheres Level des expandierten Ataxin-3-Proteins als das der Kontrollkohorte. (b,d,f) Die Prüfung einer linearen Korrelation in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen zeigte keinen Allel-spezifischen Zusammenhang des jeweiligen Polymorphismus in der SCA3-Patienten-, der RISCA- und der Gesamtkohorte mit dem gemessenen Level des expandierten Ataxin-3-Proteins.

3.4.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der Korrelationsprüfungen des expandierten Ataxin-3-Proteins

Die nachfolgende Tabelle 3.5 fasst die Ergebnisse, der unter 3.4 erläuterten Analysen zusammen. Sie dienen der Beantwortung der Hauptfragestellung, ob das expandierte Ataxin-3-Protein als Prognose- oder Verlaufsbiomarker einsetzbar ist.

Tabelle 3.5: Zusammenfassung der Korrelationsprüfungen für das expandierte Ataxin-3-Protein

Die verschiedenen Allelausprägungen sind zur Kennzeichnung ihrer Signifikanz unterschiedlich farblich gekennzeichnet.

Welcher Verteilung folgten die ΔFc -Level des expandierten Ataxin-3-Proteins (in % über dem Pufferhintergrund) in der jeweiligen Kohorte?	
SCA3-Patienten	41,27 (IQA: 14,05-119,93)
RISCA	81,49 (SD: $\pm 75,82$)
Kontrollen	16,66 (IQA: 8,42-36,57)
Gab es einen Zusammenhang der klinischen Verlaufparameter mit dem Level des expandierten Ataxin-3-Proteins?	
Krankheitsstatus	– signifikant höheres Level der SCA3-Patienten gegenüber den Kontrollen (p-Wert: *)
AAO	– signifikant höheres Level der SCA3-Patienten mit AAO ≤ 40 Jahre (p-Wert: *)
Krankheitsdauer	– signifikant höheres Level der SCA3-Patienten mit ≥ 10 Jahre (p-Wert: **) – signifikante PLK (p-Wert: *)
SARA-Score	– signifikant höchstes Level der SCA3-Patienten mit ≥ 24 Punkten (p-Wert: ****/*/*/**)
CSDP	– signifikant höheres Level der SCA3-Patienten mit $\leq 1,8$ SARA-Score-Punkten/Erkrankungsjahr (p-Wert: *)
Hatte die genetische Ausprägung der SCA3-Patienten- und RISCA-Kohorte einen Einfluss auf die gemessenen Level des expandierten Ataxin-3-Proteins?	
CAG-Wiederholungen	≤ 64 CAG-Wiederholungen: – signifikant höheres Level der SCA3-Patienten- (p-Wert: **), RISCA- (p-Wert: **) und Gesamtkohorte (p-Wert: ****, **) gegenüber Kontrollen/65-69 CAG-Wiederholungen
Ataxin-3-Polymorphismen A^{669}/G^{669} , G^{987}/C^{987} und C^{1118}/A^{1118}	Genotypen A^{669}/G^{669} und G^{987}/C^{1118} , C^{987}/A^{1118} : – signifikant höhere Level der SCA3-Patienten- (p-Wert: ***, **), RISCA- (p-Wert: **) und Gesamtkohorten (p-Wert: ****, ***)
Park2-Polymorphismen G^{601}/A^{601} , G^{1239}/C^{1239} und G^{1281}/A^{1281}	Genotypen G^{601}/G^{601} , G^{1239}/G^{1239} , G^{1239}/C^{1239} , G^{1281}/G^{1281} – signifikant höhere Level der SCA3-Patienten- (p-Wert: *, *, **), RISCA- (p-Wert: *) und Gesamtkohorten (p-Wert: **, *, *, **)

3.5 Korrelationen des Parkin-Proteins

Durcan et al. beobachteten eine erhöhte Degradation von Parkin in Anwesenheit des expandierten Ataxin-3-Proteins (Durcan et al. 2011). Im nächsten Abschnitt wurde geprüft, ob die gemessenen Parkin-Protein-Werte mit klinischen Parametern oder der genotypischen Ausprägung korrelierten. Die TR-FRET-Messung wurde in Proben von 24 SCA3-Patienten, fünf RISCA und 31 Kontrollen mit dem Tb-markierten Anti-Parkin-PRK8-Antikörper und dem D2-markierten Anti-Parkin-Antikörper vorgenommen. Es ergab sich für die SCA3-Patienten ein Median des ΔFc von 602,37 (IQA: 280,40-873,74), für die RISCA ein arithmetisches Mittel von 81,49 (SD: $\pm 75,82$) und für die Kontrollen ein Median von 16,66 (IQA: 8,42-36,57) (Tabelle 3.6 und Abbildung 3.31). Zunächst wurden die Kohorten der SCA3-Patienten, der RISCA und der Kontrollen miteinander verglichen, um die Rolle des Krankheitsstatus für die Parkin-Protein-Expression zu prüfen. Es ergaben sich nach Berechnungen mit dem Mann-Whitney-Test keine signifikanten Expressionsunterschiede der Parkin-Protein-Level zwischen den Kohorten. Auffallend waren die breit gestreuten Messwerte der Kontrollkohorte. RISCA 2, der einzige Träger beider Genotypen G^{1239}/C^{1239} und A^{1281}/A^{1281} , hatte den höchsten Parkin-Protein-Wert der RISCA-Kohorte. Eine Normalverteilung lag nach Nutzung des Shapiro-Wilk-Tests für die RISCA-Kohorte vor (p-Wert:0,0808) (Abbildung 3.31).

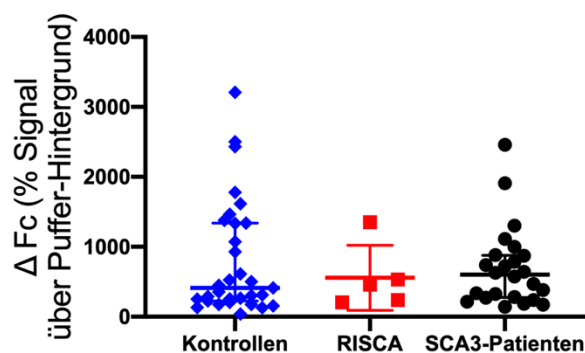


Abbildung 3.31: Korrelation des Parkin-Proteins mit dem Krankheitsstatus

Aufgetragen wurden die Kohorten der Kontrollen, RISCA und SCA3-Patienten gegen das gemessene ΔFc -Signal des Parkin-Proteins. Nach Ermittlung einer Normalverteilung stellte die dicke horizontale Mittellinie stellt das arithmetische Mittel bzw. den Median und die beiden dünnen Linien ober- und unterhalb die SD bzw. den IQA dar. Mit dem Mann-Whitney-Test berechnete sich kein signifikanter Unterschied der Parkin-Protein-Level zwischen den drei Kohorten. Es fiel eine breite Streuung der Parkin-Protein-Messwerte der Kontrollkohorte auf. Den höchsten Messwert

für das Parkin-Proteinlevel der RISCA-Kohorte hatte RISCA 2, der als einziger der Gesamtkohorte die Ausprägung G¹²³⁹/C¹²³⁹ und A¹²⁸¹/A¹²⁸¹ vorwies.

3.5.1 Korrelationen des Parkin-Proteins mit den klinischen Parametern

Die mittels des TR-FRET-Assays gemessenen ΔFc -Signale des Parkin-Proteins wurden im nächsten Abschnitt mit dem AAO, der Krankheitsdauer, dem SARA-Score und der CSDP korreliert. Die Kohortenanalyse wurde mit der unter 3.2.1 erläuterten Aufteilung der SCA3-Patienten zusammen mit den Kontrollen und den RISCA vorgenommen. Für die SCA3-Patienten wurde ein linearer Zusammenhang der klinischen Parameter mit dem gemessenen Proteinsignal untersucht.

Keine signifikante Korrelation der Parkin-Protein-Level mit dem AAO

Neben der RISCA- waren die SCA3-Patienten-Kohorten mit einem AAO von ≤ 40 (p-Wert: 0,0909) und ≥ 45 Jahren (p-Wert: 0,0678) normalverteilt. In der Kohortenanalyse ließen sich keine signifikanten Unterschiede der Parkin-Protein-Level berechnen. Im Vergleich zu den anderen Kohorten zeigte die SCA3-Patienten-Kohorte mit einem AAO von ≥ 45 Jahren die Tendenz geringerer Parkin-Protein-Werte (Abbildung 3.32a). In der Ermittlung des linearen Korrelationskoeffizienten nach Spearman zeigte sich die Tendenz einer NLK der Parkin-Protein-Level (Abbildung 3.32b).

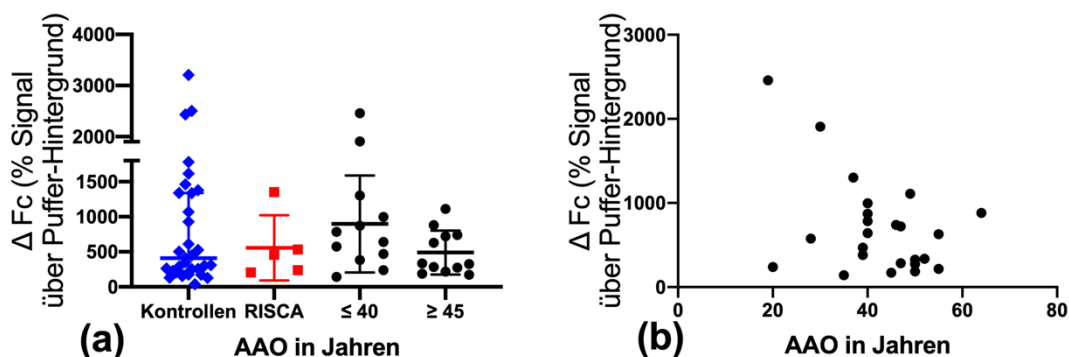


Abbildung 3.32: Korrelation des Parkin-Proteins mit dem AAO

Aufgetragen wurden die (a) Kohorten der Kontrollen, RISCA und SCA3-Patienten und (b) das AAO der SCA3-Patienten linear gegen das gemessene ΔFc -Signal des Parkin-Proteins. (a) Es berechneten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kohorten. Die SCA3-Patienten-

Kohorte mit einem AAO von ≥ 45 Jahren zeigte tendenziell niedrigere Level des Parkin-Proteins als die SCA3-Patienten-Kohorte mit einem AAO von ≤ 40 Jahren. (b) In der Darstellung eines linearen Zusammenhangs zeigte sich die Tendenz einer NLK mit dem AAO.

Keine signifikante Korrelation der Parkin-Protein-Level mit der Krankheitsdauer

Die SCA3-Patienten-Kohorte mit einer Krankheitsdauer von ≥ 10 Jahren war neben der RISCA-Kohorte nach dem Shapiro-Wilk-Test normalverteilt (p-Wert: 0,0793). Signifikante Expressionsunterschiede des Parkin-Proteins ließen sich zwischen den Kohorten nicht berechnen. Die Kohorte mit einer Krankheitsdauer von ≥ 10 Jahren zeigte gegenüber der RISCA- und der SCA3-Patienten-Kohorte mit der Krankheitsdauer von ≤ 9 Jahren tendenziell höhere Parkin-Protein-Werte (Abbildung 3.33a). Ein signifikanter linearer Zusammenhang mit der Krankheitsdauer stellte sich nicht dar (Abbildung 3.33b).

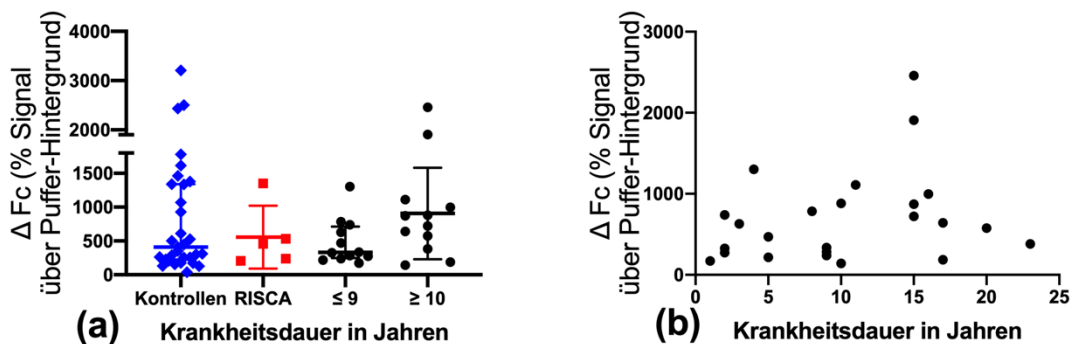


Abbildung 3.33: Korrelation des Parkin-Proteins mit der Krankheitsdauer

Aufgetragen wurden die (a) Kohorten der Kontrollen, RISCA und SCA3-Patienten und (b) die Krankheitsdauer der SCA3-Patienten linear gegen das gemessene ΔFc -Signal des Parkin-Proteins. Die SCA3-Patienten-Kohorte mit ≥ 10 Jahren Krankheitsdauer zeigte die Tendenz höherer Parkin-Protein-Level gegenüber der RISCA- und der SCA3-Patienten-Kohorte mit ≤ 9 Jahren Krankheitsdauer. (b) Die Prüfung einer linearen Korrelation erbrachte keinen signifikanten Zusammenhang.

Keine signifikante Korrelation der Parkin-Protein-Level mit dem SARA-Score

Nach Anwendung des Shapiro-Wilk-Tests waren neben der RISCA-, die SCA3-Patienten-Kohorten mit ≤ 12 (p-Wert: 0,1754) und ≥ 24 Punkten (p-Wert: 0,7963) normalverteilt. Zwischen den Kohorten ließen sich keine signifikanten

Unterschiede des Parkin-Protein-Llevels berechnen (Abbildung 3.34a). Ein linearer Zusammenhang ließ sich nicht darstellen (Abbildung 3.34b).

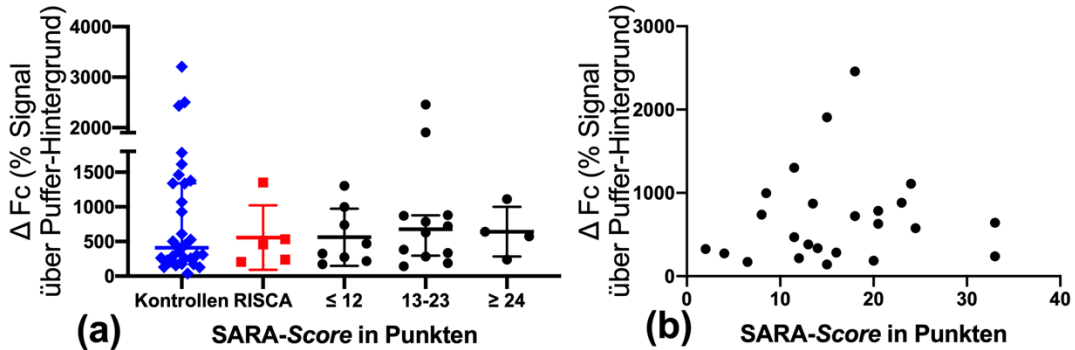


Abbildung 3.34: Korrelation des Parkin-Protein mit dem SARA-Score

Aufgetragen wurden die (a) Kohorten der Kontrollen, RISCA und SCA3-Patienten und (b) dem SARA-Score der SCA3-Patienten linear gegen das gemessene ΔFc -Signal des Parkin-Proteins. (a) Signifikante Unterschiede der Parkin-Protein-Level zwischen den Kohorten ließen sich nicht berechnen. (b) Die Darstellung eines signifikanten linearen Zusammenhanges war nicht möglich.

Keine signifikante Korrelation der Parkin-Protein-Level mit der CSDP

In der Kohortenanalyse zeigten sich zwischen diesen keine signifikanten Unterschiede der Expression des Parkin-Proteins. Die SCA3-Patienten-Kohorte mit einer CSDP von $\geq 2,0$ SARA-Score-Punkten pro Erkrankungsjahr war nach Nutzung des Shapiro-Wilk-Tests neben der RISCA-Kohorte normalverteilt (p-Wert: 0,4706) (Abbildung 3.35a). Eine lineare Korrelation der CSDP und der Parkin-Protein-Messwerte der SCA3-Patienten-Kohorte lag nach Ermittlung des Korrelationskoeffizienten nach Spearman nicht vor (Abbildung 3.35b).

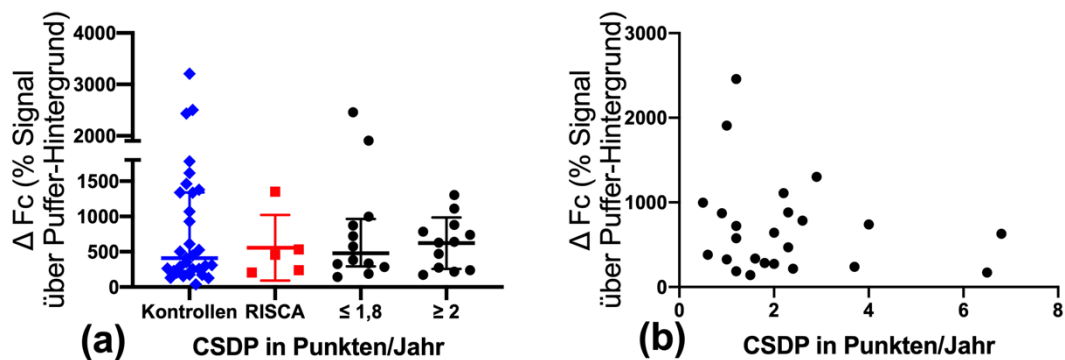


Abbildung 3.35: Korrelation des Parkin-Proteins mit der CSDP

Aufgetragen wurden die (a) Kohorten der Kontrollen, RISCA und SCA3-Patienten und (b) der CSDP der SCA3-Patienten linear gegen das gemessene ΔFc -Signal des Parkin-Proteins. (a) In der Kohortenanalyse berechneten sich keine signifikanten Unterschiede der Expressionslevel

des Parkin-Proteins. (b) Die Prüfung einer linearen Korrelation ergab keinen signifikanten Zusammenhang mit der Ausprägung der CSDP.

3.5.2 Korrelation des Parkin-Proteins mit den CAG-Wiederholungen

Die nächste Analyse ging der Fragestellung nach, ob die Anzahl der CAG-Wiederholungen eine Auswirkung auf das detektierbare Signal des Parkin-Proteins hatte. Eingeschlossen waren 21 SCA3-Patienten und vier RISCA mit bekannter Anzahl der CAG-Wiederholungen. Korrelationen der Kohorten und der Linearität wurden mit den Messwerten der SCA3-Patienten (schwarz), der RISCA (rot) und der gemeinsamen Kohorte (violett) vorgenommen. Es lag nach Anwendung des Shapiro-Wilk-Tests für die RISCA- (p-Wert: 0,8527) und SCA3-Patienten-Kohorte (p-Wert: 0,2060) mit ≤ 64 CAG-Wiederholungen und die SCA3-Patienten-Kohorten mit 65 bis 69 (p-Wert: 0,8604) und ≥ 70 CAG-Wiederholungen (p-Wert: 0,1428) eine Normalverteilung vor. Zwischen den Kohorten errechneten sich keine signifikanten Unterschiede nach Anwendung des Mann-Whitney-Tests (Abbildung 3.36a). Die Darstellung eines linearen Zusammenhangs zeigte eine leichte Tendenz der Zunahme des Parkin-Proteins bei steigender Anzahl der CAG-Wiederholungen. (Abbildung 3.36b).

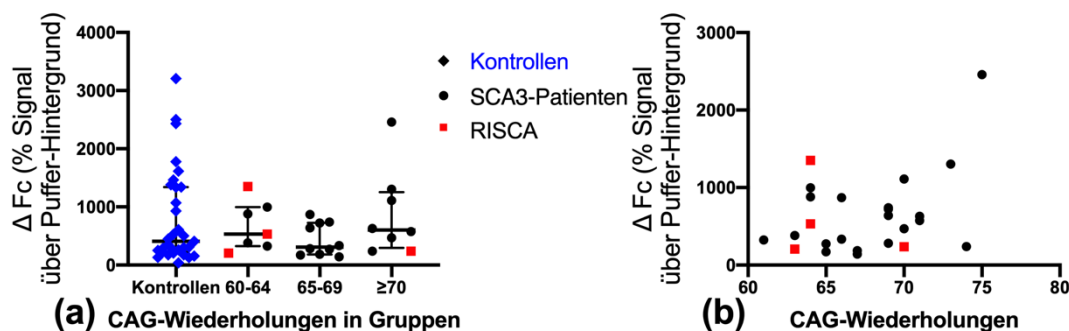


Abbildung 3.36: Korrelation des Parkin-Proteins und mit den CAG-Wiederholungen
 Aufgetragen wurden die (a) Kohorten der Kontrollen und unterschiedlicher CAG-Wiederholungsanzahl sowie (b) die CAG-Wiederholungen der SCA3-Patienten und RISCA linear gegen das gemessene ΔFc -Signal des Parkin-Proteins. Kontrollen, RISCA und SCA3-Patienten sind farblich und durch Symbole gekennzeichnet (s. Legende). Korrelationen der SCA3-Patienten sind schwarz, der RISCA rot und der gemeinsamen Kohorte violett markiert. (a) Die dicke horizontale Mittellinie stellt den Median und die beiden dünnen Linien ober- und unterhalb dieser den IQA dar. (a+b) Es berechnete sich kein signifikanter Zusammenhang des Parkin-Protein-Levels mit der Anzahl der CAG-Wiederholungen. (b) Tendenziell war eine PLK mit der Anzahl der CAG-Wiederholungen zu erkennen.

3.5.3 Korrelationen des Parkin-Proteins mit den drei untersuchten *Ataxin-3*-Polymorphismen

In den nachfolgenden Analysen wurde ein möglicher Zusammenhang der verschiedenen Allelausprägungen der *Ataxin-3*-Polymorphismen mit den gemessenen Parkin-Protein-Werten ermittelt. Eingeschlossen waren für den Polymorphismus A⁶⁶⁹/G⁶⁶⁹ 18 SCA3-Patienten und vier RISCA mit bekannter Ausprägung. Für die Polymorphismen G⁹⁸⁷/C⁹⁸⁷ und C¹¹¹⁸/A¹¹¹⁸ waren zwölf SCA3-Patienten und drei RISCA eingeschlossen. Die Einteilung der Kohortenzugehörigkeit erfolgte über die Allelausprägungen. Die Prüfung der Korrelationen der Kohorten und der Linearität in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen wurde mit den Messwerten der SCA3-Patienten (schwarz), RISCA (rot) und der gemeinsamen Kohorte (violett) vorgenommen.

Keine signifikanten Korrelationen der Polymorphismen A⁶⁶⁹/G⁶⁶⁹, G⁹⁸⁷/C⁹⁸⁷ und C¹¹¹⁸/A¹¹¹⁸ mit den gemessenen Parkin-Protein-Leveln

Nach Nutzung des Shapiro-Wilk-Tests waren die RISCA- (p-Wert: 0,4954), die SCA3-Patienten- (p-Wert: 0,3932) und Gesamtkohorte des Genotyps G⁶⁶⁹/A⁶⁶⁹ (p-Wert: 0,1403) sowie die SCA3-Patienten- (p-Wert: 0,1220) und die Gesamtkohorte (p-Wert: 0,0561) des Genotyps A⁶⁶⁹/A⁶⁶⁹ normalverteilt. Diese bestand für die Polymorphismen G⁹⁸⁷/C⁹⁸⁷ und C¹¹¹⁸/A¹¹¹⁸ für die RISCA- (p-Wert: 0,5370), die SCA3-Patienten- (p-Wert: 0,5675) und die Gesamtkohorte (p-Wert: 0,1795) der heterozygoten Ausprägung G⁹⁸⁷/C¹¹¹⁸-C⁹⁸⁷/A¹¹¹⁸. Es bestand für keine der Allelausprägungen der drei Polymorphismen ein signifikanter Unterschied in der Expression des Parkin-Proteins sowie ein signifikanter linearer Zusammenhang (Abbildung 3.37a,b,c,d). Der Genotyp C⁹⁸⁷/A¹¹¹⁸-C⁹⁸⁷/A¹¹¹⁸ zeigte die Tendenz niedrigerer Parkin-Protein-Level (Abbildung 3.37c).

3.5.4 Korrelationen des Parkin-Proteins mit den drei untersuchten *Park2*-Polymorphismen

Im abschließenden Teil der Korrelationsberechnungen für das Parkin-Protein wurde sein Expressionslevel in Abhängigkeit der Ausprägung der drei *Park2*-Polymorphismen G⁶⁰¹/A⁶⁰¹, G¹²³⁹/C¹²³⁹ und G¹²⁸¹/A¹²⁸¹ überprüft. Eingeschlossen

Ergebnisse

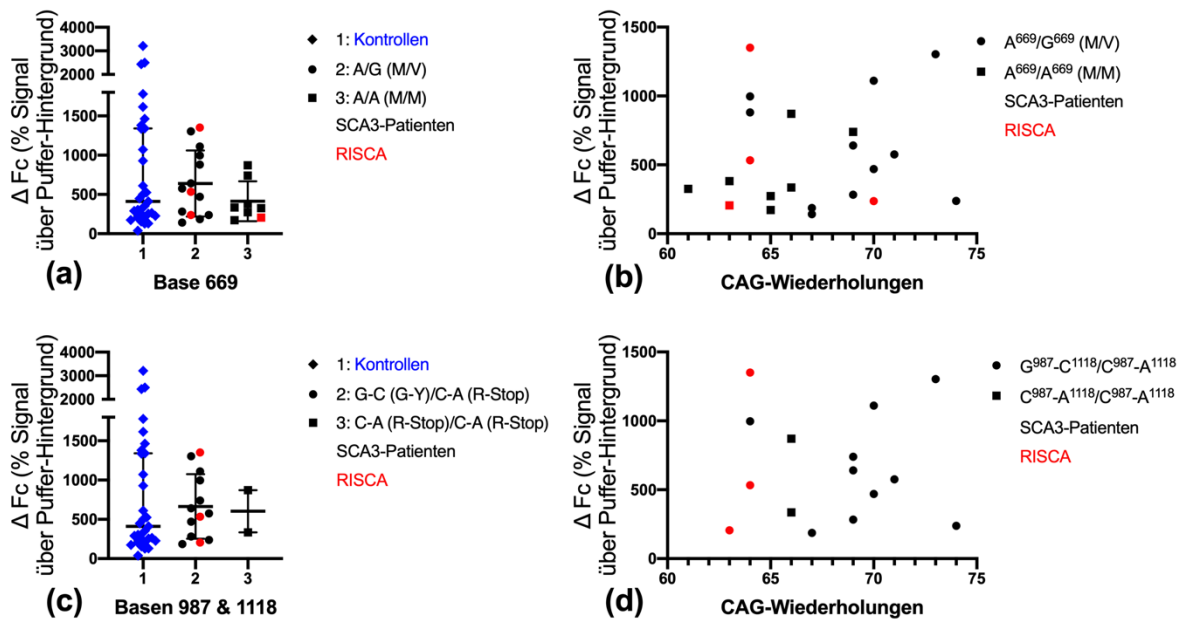


Abbildung 3.37: Korrelationen des Parkin-Proteins mit den Ataxin-3-Polymorphismen A⁶⁶⁹/G⁶⁶⁹, G⁹⁸⁷/C⁹⁸⁷ und C¹¹¹⁸/A¹¹¹⁸

Aufgetragen wurden die verschiedenen Allelausprägungen der Polymorphismen (a+b) A⁶⁶⁹/G⁶⁶⁹, (c+d) G⁹⁸⁷/C⁹⁸⁷ und C¹¹¹⁸/A¹¹¹⁸ (a+c) in Kohorten oder (b+d) linear in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen gegen das gemessene ΔFc -Signal des Parkin-Proteins. Kontrollen, RISCA und SCA3-Patienten sind farblich und die Ausprägungen der Polymorphismen durch Symbole gekennzeichnet (s. Legende). (a+c) Die unterschiedlichen Allelausprägungen der drei Polymorphismen zeigten keinen signifikanten Unterschied des Expressionslevels des Parkin-Proteins in der RISCA-, der SCA3-Patienten- und der Gesamtkohorte. (c) Tendenziell zeigte der Genotyp C⁹⁸⁷/A¹¹¹⁸-C⁹⁸⁷/A¹¹¹⁸ niedrigere Parkin-Protein-Level. (b+d) Die Darstellung einer linearen Korrelation war nicht möglich.

wurden 18 SCA3-Patienten und drei RISCA deren Genotyp ermittelt werden konnte. Die Untersuchung von Zusammenhängen zwischen den Kohorten und einer Linearität in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen mit dem Parkin-Protein-Level erfolgte für die SCA3-Patienten (schwarz), die RISCA (rot) und die gemeinsame Kohorte (violett).

Keine signifikanten Korrelationen des Parkin-Protein-Levels mit den Polymorphismen G⁶⁰¹/A⁶⁰¹, G¹²³⁹/C¹²³⁹ und G¹²⁸¹/A¹²⁸¹

Nach Nutzung des Shapiro-Wilk-Tests erwiesen sich die RISCA- (p-Wert: 0,1404) und die SCA3-Patienten-Kohorte (p-Wert: 0,1152) des Genotyps G⁶⁰¹/G⁶⁰¹ als normalverteilt. Dies traf ebenso für die RISCA- (p-Wert: 0,1662), die SCA3-Patienten- (p-Wert: 0,2130) und die Gesamtkohorte (p-Wert: 0,0667) des Genotyps G¹²³⁹/G¹²³⁹ sowie die SCA3-Patienten- (p-Wert: 0,8214) und die Gesamtkohorte (p-Wert: 0,0893) des Genotyps G¹²³⁹/C¹²³⁹ zu. Für den Genotyp

G^{1281}/G^{1281} waren die RISCA- (p-Wert: 0,1662) und die SCA3-Patienten-Kohorte (p-Wert: 0,0778) normalverteilt.

Bei einmaliger Ausprägung der Genotypen G^{601}/A^{601} , A^{601}/A^{601} und A^{1281}/A^{1281} ließ sich für diese keine Korrelation zwischen den Allelausprägungen mit den Parkin-Protein-Leveln prüfen.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede der Expressionslevel des Parkin-Proteins für die Allelausprägungen der drei Polymorphismen berechnet werden (Abbildung 3.38a,c,e). Tendenziell wurden für die SCA3-Patienten-Kohorte des Genotyps G^{1281}/G^{1281} höhere Parkin-Protein-Level gemessen als für die RISCA-Kohorte desselben Genotyps (Abbildung 3.38e). Ein signifikanter linearer Zusammenhang konnte nicht berechnet werden (Abbildung 3.38b,d,f). RISCA 2, Träger der Allelausprägung G^{1239}/C^{1239} und A^{1281}/A^{1281} , hatte die höchsten Parkin-Protein-Level aller RISCA und der Kohorte des Genotyps G^{1239}/C^{1239} (Abbildung 3.38c,e).

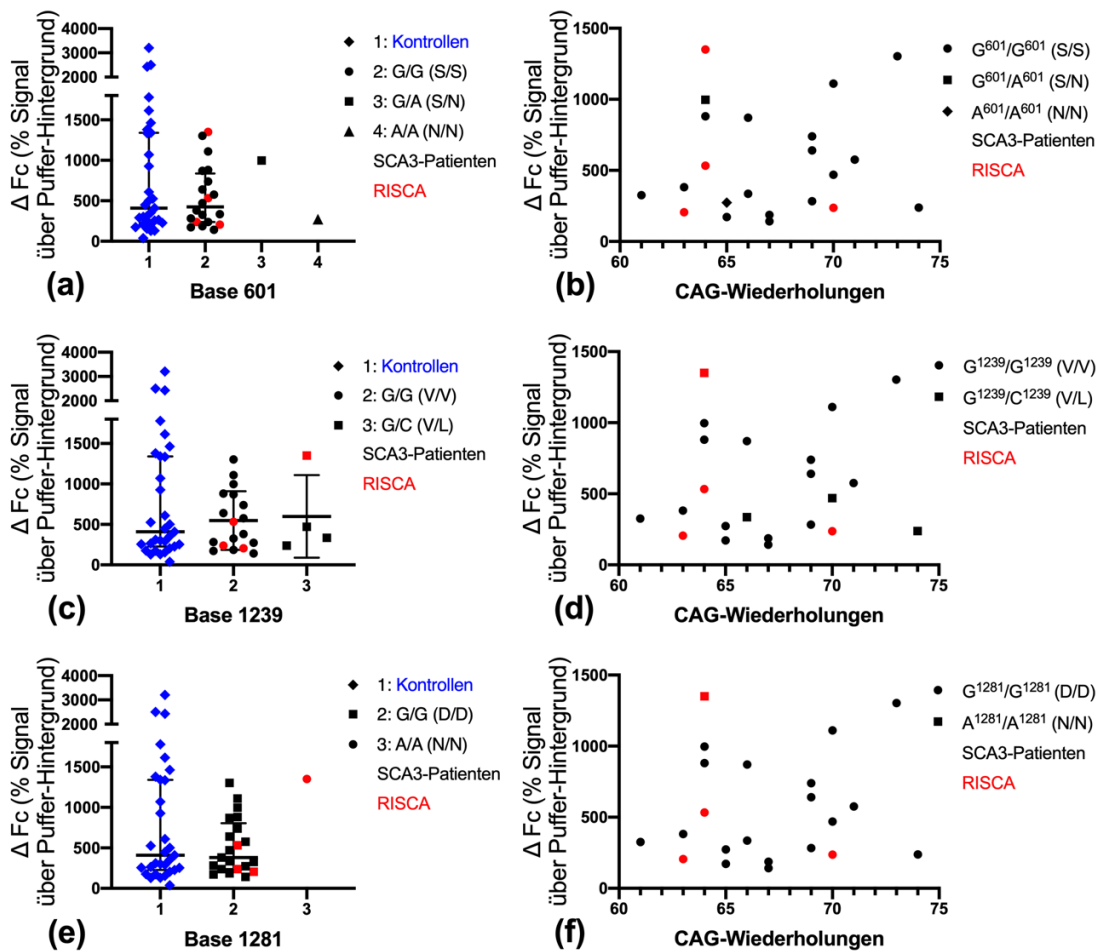


Abbildung 3.38: Korrelationen des Parkin-Proteins mit den *Park2*-Polymorphismen G^{601}/A^{601} , G^{1239}/C^{1239} und G^{1281}/A^{1281}

Aufgetragen wurden die verschiedenen Allelausprägungen der Polymorphismen (a+b) G^{601}/A^{601} , (c+d) G^{1239}/C^{1239} und (e+f) G^{1281}/A^{1281} (a,c,e) in Kohorten oder (b,d,f) linear in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen gegen das gemessene ΔFc -Signal des Parkin-Proteins. (a,c,e) Signifikante Expressionsunterschiede der verschiedenen Allelausprägungen ließen sich nicht berechnen. (e) Die SCA3-Patienten-Kohorte des Genotyps G^{1281}/G^{1281} zeigte tendenziell höhere Parkin-Protein-Werte als die RISCA-Kohorte desselben Genotyps. (c+e) RISCA 2, Träger der Allelausprägung G^{1239}/C^{1239} und A^{1281}/A^{1281} , hatte die höchsten Parkin-Protein-Werte aller RISCA und der Kohorte des Genotyps G^{1239}/C^{1239} . (b,d,f) In der Berechnung des linearen Korrelationskoeffizienten konnte kein signifikanter Zusammenhang ermittelt werden.

3.5.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der Korrelationsprüfungen des Parkin-Proteins

Die nachfolgende Tabelle 3.6 fasst die Ergebnisse, der unter 3.5 erläuterten Analysen zusammen. Sie sollten klären, ob das Parkin-Protein als Biomarker in der SCA3 genutzt werden kann.

Tabelle 3.6: Zusammenfassung der Korrelationsprüfungen für das Parkin-Protein

Die verschiedenen Allelausprägungen sind zur Kennzeichnung ihrer Signifikanz unterschiedlich farblich gekennzeichnet.

Welcher Verteilung folgten die Δ Fc-Level des Parkin-Proteins (in % über dem Pufferhintergrund) in der jeweiligen Kohorte?	
SCA3-Patienten	602,37 (IQA: 280,40-873,74)
RISCA	81,49 (SD: \pm 75,82)
Kontrollen	16,66 (IQA: 8,42-36,57)
Gab es einen Zusammenhang der klinischen Verlaufsparemeter mit dem Level des Parkin-Proteins?	
Krankheitsstatus	– keine signifikante Korrelation des Parkin-Protein-Levels mit einem der klinischen Verlaufsparemeter
AAO	
Krankheitsdauer	
SARA-Score	
CSDP	
Hatte die genetische Ausprägung der SCA3-Patienten- und RISCA-Kohorte einen Einfluss auf die gemessenen Level des Parkin-Proteins?	
CAG-Wiederholungen	– keine signifikante Korrelation des Parkin-Protein-Levels mit der Anzahl der CAG-Wiederholungen, der <i>Ataxin-3</i> - oder <i>Park2</i> -Polymorphismen
<i>Ataxin-3</i> -Polymorphismen A ⁶⁶⁹ /G ⁶⁶⁹ , G ⁹⁸⁷ /C ⁹⁸⁷ und C ¹¹¹⁸ /A ¹¹¹⁸	
<i>Park2</i> -Polymorphismen G ⁶⁰¹ /A ⁶⁰¹ , G ¹²³⁹ /C ¹²³⁹ und G ¹²⁸¹ /A ¹²⁸¹	

3.6 Korrelationen der Proteine untereinander

Durcan et al. beschrieben in ihrer Studie eine vermehrte Degradation und geringere Level von Parkin in Anwesenheit des expandierten Ataxin-3-Proteins (Durcan und Fon 2011). Dies führte zu den nächsten Analysen, bei denen geprüft wurde, ob Zusammenhänge der Proteinlevel untereinander vorlagen. Da die Assays verschiedenen Sensitivitäten für ihre Proteine vorwiesen, konnten die Werte nicht mittels einer Kohortenanalyse verglichen werden. Es wurde ein linearer Zusammenhang untersucht. Hierfür wurden die Messwerte zweier Proteine nach Kohorten getrennt gegeneinander aufgetragen. Für den Vergleich vom expandierten mit dem Gesamt-Ataxin-3-Protein (Abbildung 3.39a) und dem expandierten Ataxin-3-Protein mit dem Parkin-Protein (Abbildung 3.39b) ergaben sich keine signifikanten Zusammenhänge. Tendenziell zeigten die Kontrollen und SCA3-Patienten eher niedrige Werte des Gesamt-Ataxin-3-Proteins bei hohen Werten des expandierten Ataxin-3-Proteins (Abbildung 3.39a) Es berechnete

sich keine signifikante Korrelation bei dem Vergleich des Gesamt-Ataxin-3-Proteins mit dem Parkin-Protein, jedoch konnte die Tendenz eines negativen linearen Zusammenhangs für das Parkin-Protein bei steigenden Gesamt-Ataxin-3-Protein-Werten nachgewiesen werden (Abbildung 3.39c).

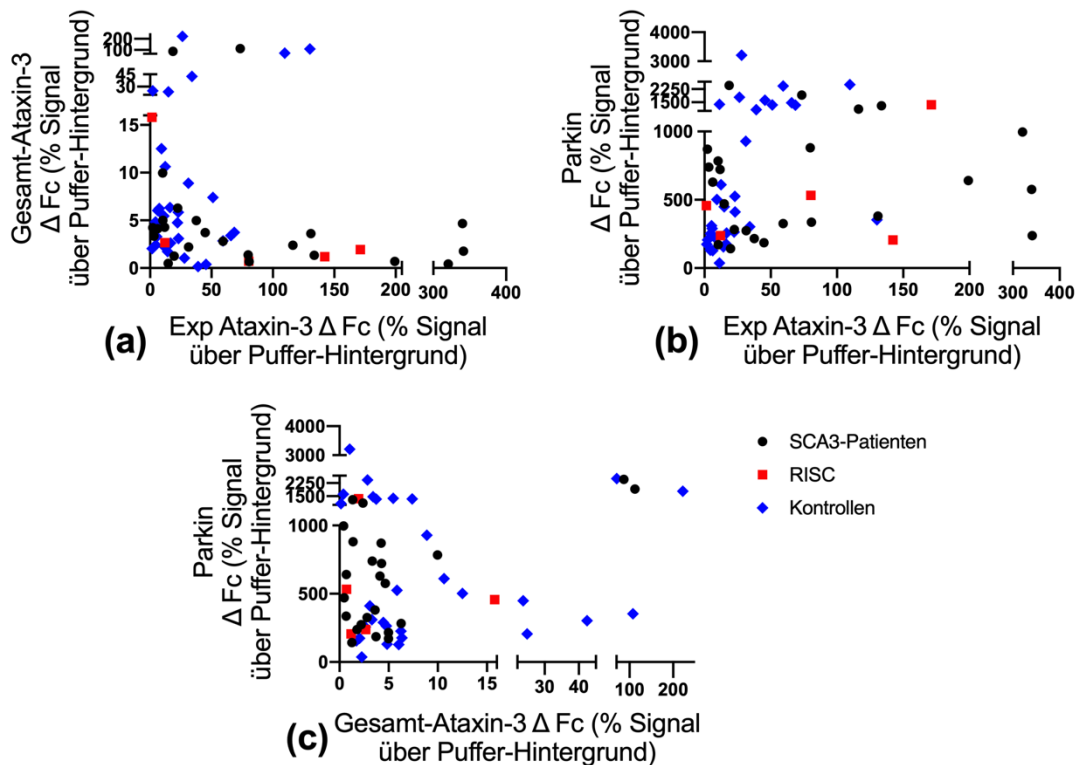


Abbildung 3.39: Korrelation der Proteine untereinander

Aufgetragen wurde (a) das gemessene Δ Fc-Signal des expandierten Ataxin-3-Proteins gegen das gemessene Δ Fc-Signal des Gesamt-Ataxin-3-Proteins, (b) das gemessene Δ Fc-Signal des expandierten Ataxin-3-Proteins gegen das gemessene Δ Fc-Signal des Parkin-Proteins und (c) das gemessene Δ Fc-Signal des Gesamt-Ataxin-3-Proteins gegen das gemessene Δ Fc-Signal des Parkin-Proteins. SCA3-Patienten, RISC und Kontrollen sind durch unterschiedliche Farben und Symbole gekennzeichnet (s. Legende). (a,b,c) Es ließ sich für keine Kohorte ein signifikanter linearer Zusammenhang der beiden Proteinlevel berechnen. (a+c) Es zeigte sich die Tendenz einer NLK der (a) Gesamt-Ataxin-3- bzw. (c) Parkin-Protein-Werte gegenüber der (a) expandierten Ataxin-3- bzw. (c) Gesamt-Ataxin-3-Werte.

3.7 Verlaufsdynamik der Proteine

Vier SCA3-Patienten und ein RISCAs stellten sich nach einer Zeitspanne von einem (AX 12), zwei (AX 3, AX 11, RISCAs 3) oder drei Jahren (AX 5) ein zweites Mal im Promotionszeitraum vor. Durch eine zweite Probenentnahme konnte die Verlaufsdynamik der Proteinmesswerte in Abhängigkeit der Entwicklung des SARA-Scores untersucht werden. Dieser wurde durch die Neurologen der

Ataxie-Ambulanz der Neurologischen Poliklinik des Universitätsklinikums Tübingen erhoben. Bei zwei SCA3-Patienten kam es zu einer Punktezunahme des SARA-Scores von 4,5 Punkten. Beim dritten SCA3-Patienten nahm der Score um 0,5 Punkte zu und bei dem vierten SCA3-Patienten um 0,5 Punkte ab. Der SARA-Score des RISCA veränderte sich nicht (Abbildung 3.40a). Mittels des gepaarten t-Tests berechnete sich keine signifikante Änderung der Score-Punktzahlen. Für das Gesamt-Ataxin-3-Protein berechnete sich keine signifikante Verlaufsänderung, da Zunahmen und Abnahmen der Messwerte vorlagen (Abbildung 3.40b). Die Level des expandierten Ataxin-3-Proteins nahmen in der Zweitprobe bei allen eingeschlossenen Personen ab, sodass die Tendenz seiner Abnahme vorlag (Abbildung 3.40c). Die Verlaufspuren des Parkin-Proteins zeigten niedrigere Werte als die der vorherigen Proben, sodass ohne signifikanten gepaarten t-Test eine Tendenz der abnehmender Level zu sehen war (Abbildung 3.40d).

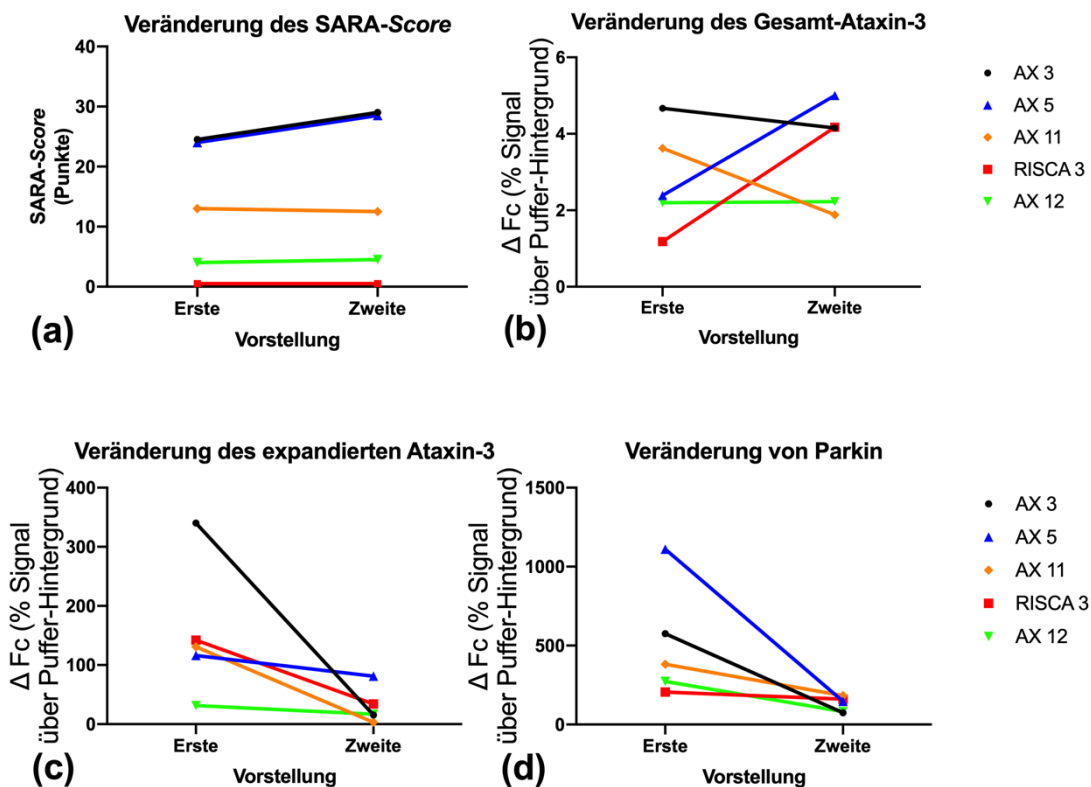


Abbildung 3.40: Verlaufsdaten des SARA-Scores und der gemessenen Proteinlevel
 Aufgetragen wurden (a) der SARA-Score, (b) die gemessenen ΔFc -Signale des Gesamt-Ataxin-3-Proteins, (c) die gemessenen ΔFc -Signale des expandierten Ataxin-3-Proteins und (d) die gemessenen ΔFc -Signale des Parkin-Proteins der ersten und zweiten Vorstellung. Die vier SCA3-

Patienten und der RISCA sind durch verschiedene Symbole und Farben gekennzeichnet. (a) Zwei SCA3-Patienten zeigten eine Zunahme des SARA-Scores. Bei den anderen drei Personen zeigte er sich in einem Rahmen von 0,5 Punkten tendenziell konstant. (b) Durch ab- und zunehmende Messwerte war keine signifikante Dynamik zu berechnen. (c) Es zeigte sich die Tendenz einer Abnahme der Level des expandierten Ataxin-3-Proteins. Die Abnahme fiel für die SCA3-Patienten mit dem Anstieg des SARA-Scores am deutlichsten aus. (d) Es zeigte sich eine nicht-signifikante Abnahme der Parkin-Protein-Level im Verlauf, die für die beiden SCA3-Patienten mit zunehmendem SARA-Score am deutlichsten ausgeprägt war.

In einem zweiten Ansatz wurden die Messungen der Verlaufsproben für alle drei Proteine von zwei SCA3-Patienten und dem RISCA wiederholt. Von den anderen zwei SCA3-Patienten lag nicht genügend Material für die Wiederholung vor. In dieser Messung konnten die für Abbildung 3.40 beschriebenen Tendenzen nicht bestätigt werden. Die Messwerte der drei Proteine zeigten eine tendenzielle Zunahme (Abbildung 3.41a,b,c), lediglich bei einem SCA3-Patienten, AX 11, nahmen die Parkin-Protein-Werte im Verlauf ab (Abbildung 3.41c).

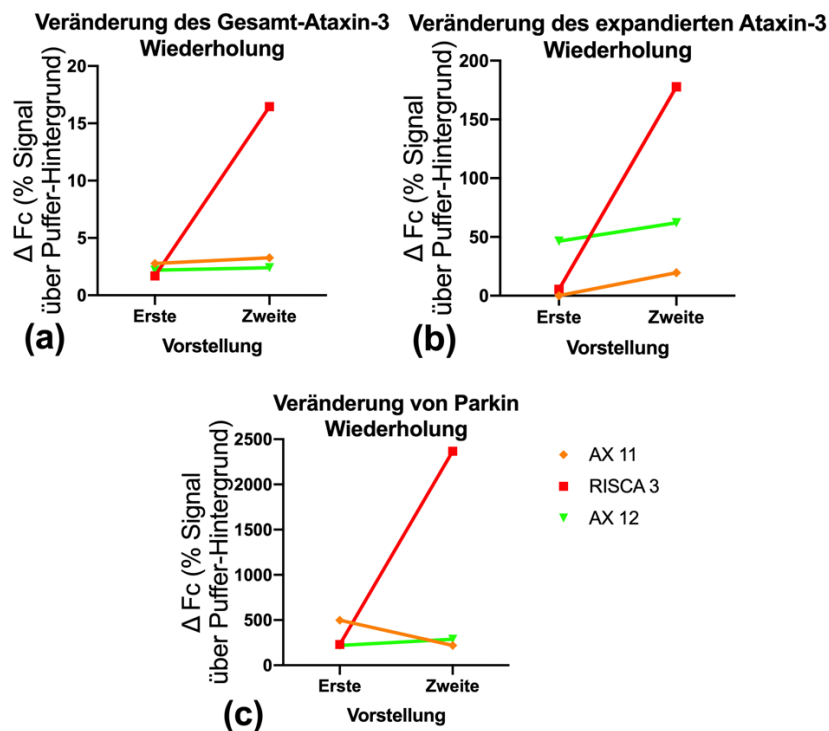


Abbildung 3.41: Wiederholte Messung der Verlaufsproben

Aufgetragen wurden (a) die gemessenen ΔFc -Signale des Gesamt-Ataxin-3-Proteins, (b) die gemessenen ΔFc -Signale des expandierten Ataxin-3-Proteins und (c) die gemessenen ΔFc -Signale des Parkin-Proteins der ersten und zweiten Vorstellung. (a+b+c) Es zeigten sich in der Wiederholung der Messungen tendenziell zunehmende Werte für alle drei gemessenen Proteinlevel. Die Zunahme fiel für den RISCA jeweils am stärksten aus. (c) Nur der Parkin-Protein-Wert von AX 11 zeigte sich in der Wiederholung fallend.

3.8 Einflüsse auf die Messungen

3.8.1 Entwicklung der Pipettiergenauigkeit

Das Pipettieren der erforderlichen Volumina des TR-FRET-Assays war hinsichtlich der Genauigkeit anspruchsvoll und eine mögliche Quelle für fehlerhafte Messungen. Bei jedem pipettierten Ansatz wurden die Duplikate der Proben miteinander verglichen und der Pipettierfehler berechnet. Wichen die gemessenen ΔF -Signale um mehr als 10% voneinander ab, wurde die Messung wiederholt. Die Entwicklung des Pipettierfehlers bzw. der Pipettiergenauigkeit über die Zeit und ob die Anzahl der pipettierten Proben eine Rolle für die Messwerte spielte, wurde in der folgenden Abbildung 3.42 rechnerisch überprüft. Die Pipettiergenauigkeit zeigte sich im Studienzeitraum weitestgehend konstant mit einem Median von 95,78%. Die beste Pipettiergenauigkeit wurde am 10.02.16 mit 97,59% und die schlechteste am 16.10.15 mit 89,92% erreicht. Im Vergleich mit der Anzahl der pipettierten Proben (Wert ohne Duplikate) zeigte sich keine Abhängigkeit mit der Genauigkeit (Abbildung 3.42).

3.8.2 Potenzielles Bias durch die verschiedenen Zentren

Die Proben wurden aus den drei Zentren Bonn, Paris und Tübingen gesammelt, die in der nachfolgenden Analyse anonymisiert betrachtet wurden. Für die Studie gab es keine standardisierten Verfahren der Blutentnahme, der Lymphozytenisolierung und der Lagerung der Proben. Ein Zentrum verwendete CPDA-Röhrchen zur Entnahme, ein anderes nutzte CPT-Röhrchen. Die Lymphozyten eines Zentrums waren bei -80 °C für mehrere Jahre gelagert, ehe sie für die Studie verwendet wurden. Ob diese Unterschiede eine Rolle in den Messungen der Proteinlevel spielten, wurde mittels einer Kohortenanalyse überprüft. Hierfür wurden die Messwerte der SCA3-Patienten, RISCA und Kontrollen je Zentrum zusammengefasst. Für das Gesamt-Ataxin-3-Protein hatte die Kohorte aus dem zweiten Zentrum nach Nutzung des Shapiro-Wilk-Tests eine Normalverteilung (p -Wert: 0,2823). Diese Kohorte zeigte im Vergleich mit den anderen beiden Zentren die schmalste Streuung und tendenziell geringsten Gesamt-Ataxin-3-Protein-Werte. Signifikante Unterschiede ließ sich nicht berechnen (Abbildung 3.43a).

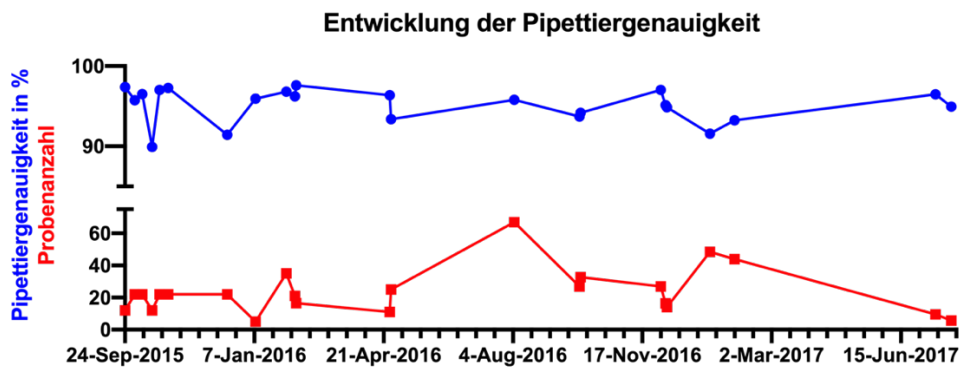


Abbildung 3.42: Entwicklung der Pipettiergenauigkeit

Aufgetragen wurden im Zeitraum der Messungen die Pipettiergenauigkeit in % (blaue Kurve), sowie die dazugehörige Anzahl der Proben (ohne Duplikate, rote Kurve). Die Pipettiergenauigkeit zeigte sich im gesamten Zeitraum konstant in einem Bereich von 89% bis 98% (mit einem Median von 95,78%). Die Anzahl der Proben folgte der Dynamik der Pipettiergenauigkeit in diesem Zeitraum nicht, sodass kein Zusammenhang zwischen diesen beiden Größen zu eruieren war.

In der Kohortenanalyse des expandierten Ataxin-3-Proteins waren die Kohorten aus dem zweiten (p-Wert: 0,7124) und dritten Zentrum (p-Wert: 0,1878) nach Anwendung des Shapiro-Wilk-Tests normalverteilt. Hier zeigten die Werte des ersten Zentrums die größte Streuung. Ein signifikanter Unterschied der Proteinlevel zwischen den Kohorten berechnete sich nicht (Abbildung 3.43b).

In der Analyse des Parkin-Proteins war die Kohorte aus dem dritten Zentrum normalverteilt (p-Wert: 0,2194). Hier berechneten sich mit dem Mann-Whitney-Test signifikant erhöhte Parkin-Protein-Level des dritten Zentrums im Vergleich zum ersten (p-Wert: <0,0001) und zweiten Zentrum (p-Wert: 0,0047). Die Werte des dritten Zentrums zeigten eine breitere Streuung (Abbildung 3.43c).

Im nächsten Schritt wurden exemplarisch die Korrelationsprüfungen des Parkin-Proteins mit dem AAO und der Krankheitsdauer unter Ausschluss der Werte des dritten Zentrums erneut vorgenommen. Die Kontrollkohorte umfasste 26 Proben und die RISCA-Kohorte weiterhin fünf. Die Kohortenstärke der SCA3-Patienten war reduziert. Für das AAO umfasste die Kohorte mit ≤ 40 Jahren neun Patienten und mit ≥ 45 Jahren zehn Patienten. Bei der Analyse der Krankheitsdauer waren zehn Patienten Teil der Kohorte mit ≤ 9 -jährigen und neun Patienten Teil der Kohorte mit ≥ 10 -jährigen Krankheitsdauer.

In der Kohortenanalyse für das AAO waren die RISCA- (p-Wert: 0,0808) und die SCA3-Patienten-Kohorte mit einem AAO von ≤ 40 Jahren (p-Wert: 0,8418) nach

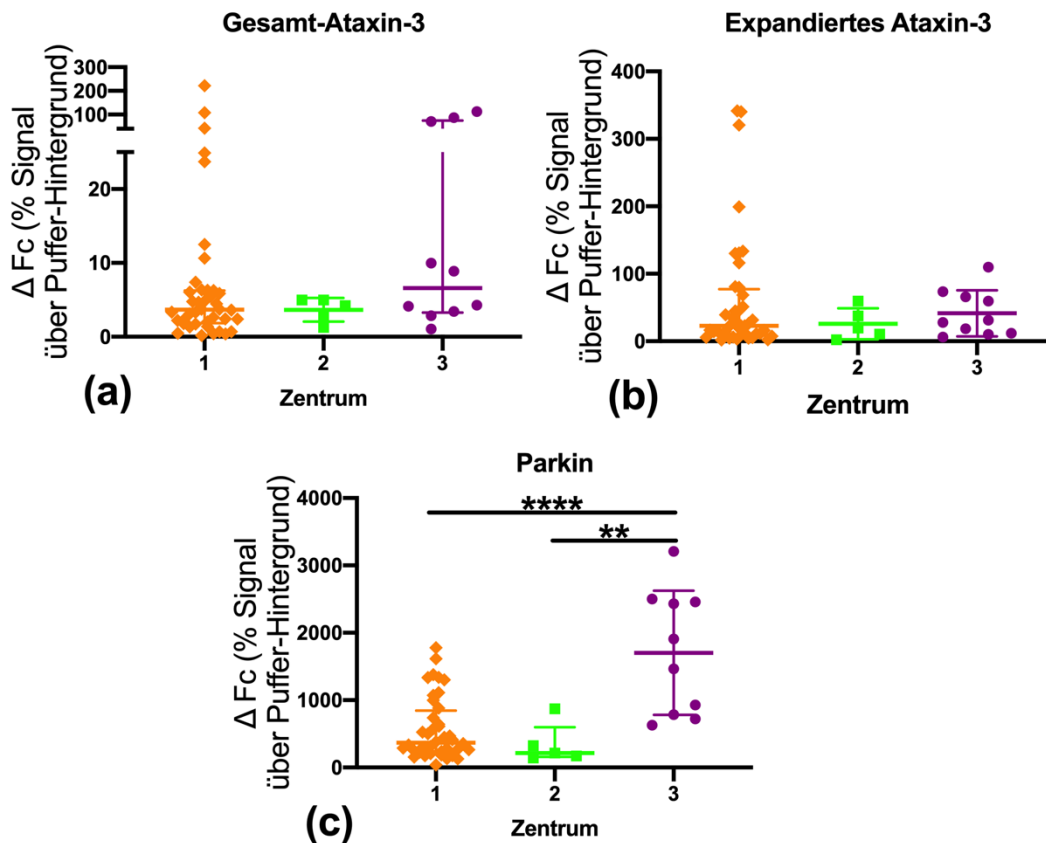


Abbildung 3.43: Vergleich der Proteinmessungen in Abhängigkeit der Zentren

Aufgetragen wurden die Kohorten der Zentren gegen (a) das gemessene ΔFc -Signal des Gesamt-Ataxin-3-Proteins, (b) das gemessene ΔFc -Signal des expandierten Ataxin-3-Proteins und (c) das gemessene ΔFc -Signal des Parkin-Proteins. Nach Ermittlung einer Normalverteilung stellte die dicke horizontale Mittellinie das arithmetische Mittel bzw. den Median und die beiden dünnen Linien ober- und unterhalb die SD bzw. den IQA dar. (a+b) Es berechneten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zentren. (a) Die Werte des zweiten Zentrums zeigten die geringste Streuung und tendenziell die niedrigsten Messwerte für das Gesamt-Ataxin-3-Protein. (b) Für Zentrum 1 bestand die größte Streuung der Messwerte der expandierten Ataxin-3-Proteins. (c) Nach Nutzung des Mann-Whitney-Tests hatte die Kohorte des dritten Zentrums im Vergleich zum ersten (p-Wert: $<0,0001$) und zweiten Zentrum (p-Wert: $0,0047$) signifikant höhere Parkin-Protein-Level. Die Werte des dritten Zentrums zeigten die breiteste Streuung.

Nutzung des Shapiro-Wilk-Tests normalverteilt. Es berechnete sich weiterhin kein signifikanter Unterschied der Parkin-Protein-Level zwischen den Kohorten. Die Tendenz höherer Parkin-Protein-Level der Kohorte mit einem AAO von ≥ 45 Jahren war im Vergleich zu der anderen SCA3-Patienten-Kohorte (vgl. Abbildung 3.32a) nicht mehr auszumachen (Abbildung 3.44a). In der Kohortenanalyse zur Korrelationsprüfung mit der Krankheitsdauer war neben der RISSA- die SCA3-Patienten-Kohorte mit einer Dauer von ≥ 10 Jahren (p-Wert: $0,5364$) nach dem Shapiro-Wilk-Test normalverteilt. Es berechneten sich keine signifikanten

Unterschiede des Parkin-Protein-Level zwischen den Kohorten. Die SCA3-Patienten mit einer Krankheitsdauer von ≥ 10 Jahren zeigten weiterhin die Tendenz höherer Parkin-Protein-Werte im Vergleich zu der anderen SCA3-Patienten-Kohorte (vgl. Abbildung 3.33a, Abbildung 3.44b).

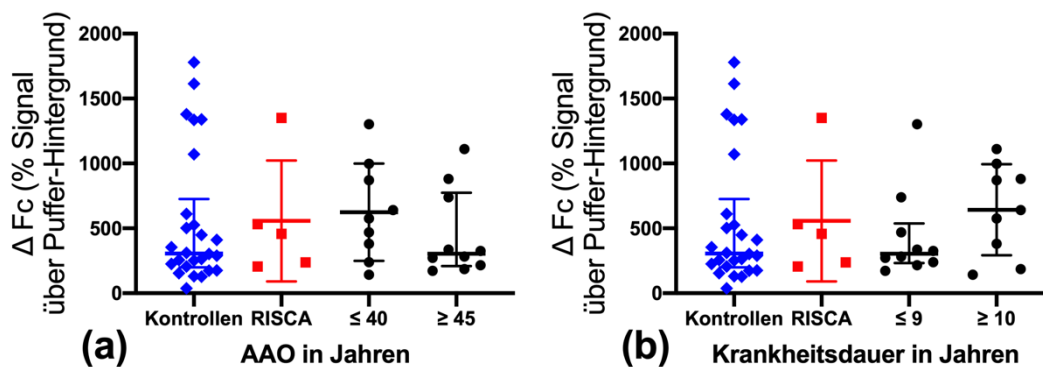


Abbildung 3.44: Vergleich der Korrelationen des Parkin-Proteins mit dem AAO und der Krankheitsdauer unter Ausschluss der Messwerte aus dem dritten Zentrum
 Aufgetragen wurden die Kohorten der Kontrollen, RISCA und SCA3-Patienten (a) des AAO und (b) der Krankheitsdauer gegen das gemessene ΔFc -Signal des Parkin-Proteins. (a+b) Zwischen den Kohorten berechneten sich keine signifikanten Unterschiede der Parkin-Protein-Level. (a) Nach Ausschluss der Messwerte des dritten Zentrums zeigten sich für das AAO keine Tendenz. (b) Für die Kohorte mit einer Krankheitsdauer von ≥ 10 Jahren stellten sich im Vergleich zu der SCA3-Patienten-Kohorte mit der Krankheitsdauer von ≤ 9 Jahren tendenziell höhere Parkin-Protein-Werte dar.

3.8.3 Kontrollstudien zu Blutröhrchensystemen und

Blutentnahmezeitpunkten

Durch die beobachteten Varianzen der Messwerte der verschiedenen Zentren wurden weitere Kontrollstudien durchgeführt, die die Variablen der verwendeten Blutröhrchensysteme und den Umstand, ob die Probe nüchtern oder nicht nüchtern entnommen wurde, prüften.

Vergleichsstudie der CPDA- und EDTA-Röhrchen bzw. nüchterne und nicht nüchterne Blutentnahme

Für diese Vergleichsstudie wurden fünf männliche und fünf weibliche Mitglieder des Instituts für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik des Universitätsklinikums Tübingen rekrutiert. Es wurden in nüchternem Zustand je zwei EDTA- und CPDA-Röhrchen Blut abgenommen. Dreißig Minuten nach einem gemeinsamen Frühstück folgte die zweite Blutentnahme, bei der wiederum zwei

EDTA- und CPDA-Röhrchen Blut abgenommen wurden. In den Proben wurden das Gesamt-Ataxin-3- und Parkin-Protein bestimmt. Die Analyse der Dynamik zeigte für das Gesamt-Ataxin-3-Protein in den CPDA- (Abbildung 3.45a) und in den EDTA-Röhrchen (Abbildung 3.45b) keinen signifikanten gleichgerichteten Unterschied in Abhängigkeit der Nahrungsaufnahme. Tendenziell fielen zuvor sehr hohe Gesamt-Ataxin-3-Protein-Werte nach der Nahrungsaufnahme ab (Abbildung 3.45ab). Niedrige Messwerte blieben konstant (Abbildung 3.45ab) oder stiegen an (Abbildung 3.45ab). Die Signalstärke unterschied sich je nach verwendetem Röhrchensystem. Die Messwerte der nicht nüchternen Proben waren laut Berechnung mit dem Wilcoxon-Test in den EDTA-Röhrchen signifikant niedriger als in den CPDA-Röhrchen (p-Wert: 0,0488).

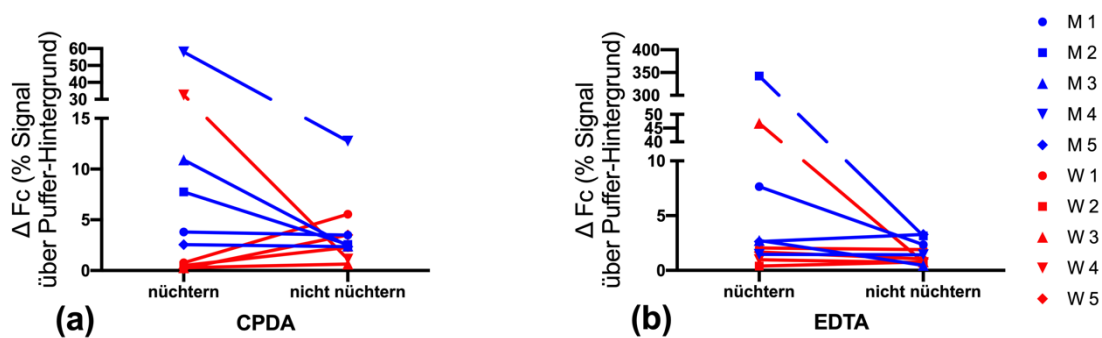


Abbildung 3.45: Kontrollstudie des Gesamt-Ataxin-3-Proteins in CPDA- und EDTA-Röhrchen vor und nach Nahrungsaufnahme

Aufgetragen wurden die zwei Zeitpunkte der Blutentnahme gegen das gemessene ΔFc -Signal des Gesamt-Ataxin-3-Proteins (a) in CPDA-Röhrchen und (b) in EDTA-Röhrchen. Männer (blau) und Frauen (rot) sind farblich gekennzeichnet. Die einzelnen Probanden erhalten verschiedene Symbole (s. Legende). Es war in beiden Abbildungen keine signifikante Dynamik in Abhängigkeit zur Nahrungsaufnahme zu berechnen. Hohe Nüchtern-Messwerte waren eher abfallend, wohingegen niedrige Nüchtern-Messwerte nach der Nahrungsaufnahme konstant blieben oder zunahmen. Das gemessene Signal des Gesamt-Ataxin-3-Proteins war in den EDTA-Röhrchen nach Nahrungsaufnahme im Vergleich zu den CPDA-Röhrchen signifikant geringer (p-Wert: 0,0488).

Für das Parkin-Protein zeigte sich in beiden Blutröhrchensystemen keine von der Nahrungsaufnahme abhängige signifikante gleichförmige Dynamik der Messwerte (Abbildung 3.46ab). Die Messwerte waren vorwiegend abfallend, jedoch zeigten sich in beiden Blutröhrchensystemen einzelne deutliche Steigerungen nach der Nahrungsaufnahme. Ein signifikanter Unterschied in der gemessenen Signalstärke der beiden verwendeten Blutröhrchensysteme bestand nicht.

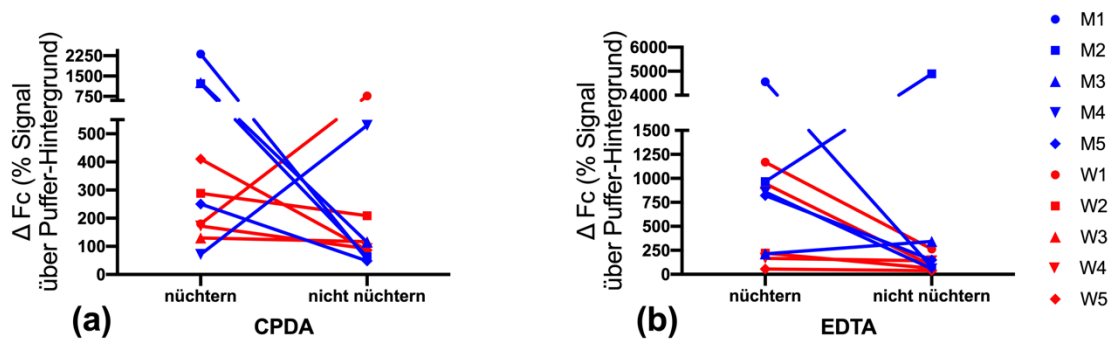


Abbildung 3.46: Kontrollstudie des Parkin-Proteins in CPDA- und EDTA-Röhrchen vor und nach Nahrungsaufnahme

Aufgetragen wurden die zwei Zeitpunkte der Blutentnahme gegen das gemessene ΔFc -Signal des Parkin-Proteins (a) in CPDA-Röhrchen und (b) in EDTA-Röhrchen. In beiden Darstellungen war keine signifikante gleichförmige Dynamik in Abhängigkeit zur Nahrungsaufnahme zu berechnen. Tendenziell lag bei den meisten Proben (8 von 10) ein Abfall der Parkin-Protein-Messwerte vor. Bei jeweils zwei Proben in (a) und (b) waren starke Anstiege nach Nahrungsaufnahme zu messen. Zwischen den Blutröhrchensystemen bestanden keine signifikanten Unterschiede der gemessenen Signalstärke des Parkin-Proteins.

Vergleichsstudie der CPDA- und CPT-Röhrchen bzw. nüchterne und nicht nüchterne Blutentnahme

In einer zweiten Vergleichsstudie wurde der Einfluss der Nahrungsaufnahme, mit Protokollierung der zu sich genommenen Nahrung, durchgeführt. Anstelle der EDTA-Röhrchen wurden CPT-Röhrchen verwendet, um ein anderes in der Studie verwendetes Blutröhrchensystem hinsichtlich seiner Eigenschaften zu testen. Es wurden wie bei den CPDA- auch von den CPT-Röhrchen zwei Stück pro Blutentnahmezeitpunkt verwendet. In dieser Studie waren drei männliche und drei weibliche Mitarbeiter des Instituts für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik des Universitätsklinikums Tübingen als Kontrollen eingeschlossen. Folgendes Frühstücksprotokoll wurde abgegeben (Tabelle 3.7):

Tabelle 3.7: Protokoll des zu sich genommenen Frühstücks der Kontrollen

	Brötchen	Herzhaft	Süß	Orangensaft	Kaffee	Wasser
M1	2		X	X	X	
M2	2	X		X	mit Milch	
M3	2	X		X		X
F1	1,5	X	X		mit Milch	
F2	2	X		X		
F3	1	X	X		X	

In der Messung des Gesamt-Ataxin-3-Proteins zeigte sich in den CPDA-Röhrchen ein tendenzieller Abfall der Messwerte nach Nahrungsaufnahme. Der Messwert von M3 war ansteigend. Laut dem selbst konzipierten Frühstücksprotokoll war er der einzige, der Wasser getrunken hat (Abbildung 3.47a). Die Dynamik der Messwerte in den CPT-Röhrchen war teilweise abweichend der Dynamik der Messwerte in den CPDA-Röhrchen. Hier zeigten je drei Kontrollen eine Abnahme bzw. Zunahme des Gesamt-Ataxin-3-Protein-Levels, jedoch keine Konstanz (Abbildung 3.47b). Ein signifikanter Unterschied der gemessenen ΔFc -Signale zwischen den Röhrchensystemen ergaben sich zu keinem Blutentnahmezeitpunkt.

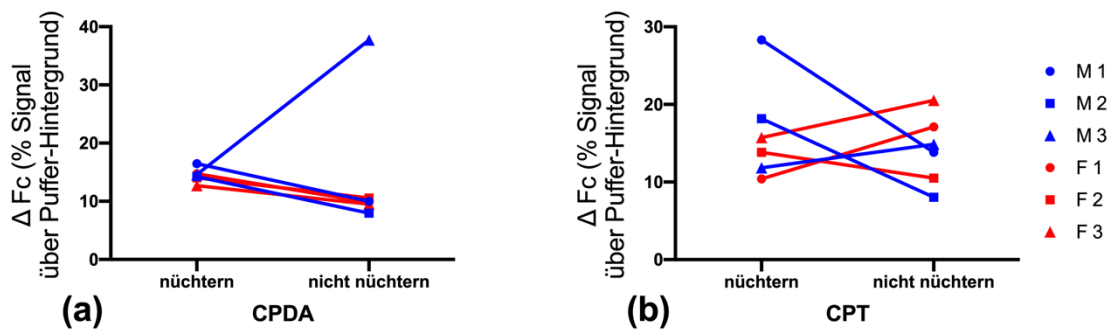


Abbildung 3.47: Kontrollstudie des Gesamt-Ataxin-3-Proteins in CPDA- und CPT-Röhrchen vor und nach Nahrungsaufnahme

Aufgetragen wurden die Zeitpunkte der Blutentnahme gegen das gemessene ΔFc -Signal des Gesamt-Ataxin-3-Proteins (a) in CPDA-Röhrchen und (b) in CPT-Röhrchen. (a) Tendenziell zeigten die gemessenen Werte eine Abnahme nach der Nahrungsaufnahme. Bei einer Kontrolle war ein Anstieg zu messen. (b) Es wurde bei jeweils drei Kontrollen eine Zu- bzw. Abnahme des Gesamt-Ataxin-3-Proteins gemessen. Eine Konstanz der Messwerte war nicht aufzuzeigen. (a+b) Zwischen den beiden Röhrchensystemen ließ sich kein signifikanter Unterschied des gemessenen Signals berechnen.

Für die Messung der Parkin-Protein-Level ergab sich in den CPDA-Röhrchen in Abhängigkeit der Nahrungsaufnahme keine gleichförmige Dynamik. Jeweils drei Kontrollen zeigten eine Zu- bzw. Abnahme der Parkin-Protein-Messwerte. Eine Konstanz über beide Messzeitpunkte war nicht zu detektieren (Abbildung 3.48a). Für die Messwerte in den CPT-Röhrchen lag nach dem Frühstück die Tendenz eines Anstiegs der Parkin-Protein-Werte vor. Bei F3 nahm der Parkin-Protein-Wert nach dem Frühstück ab. Sie hatte beim Frühstück laut Protokoll am wenigsten aller Kontrollen gegessen (Abbildung 3.48b). Zum zweiten Blutentnahmezeitpunkt war das gemessene Signal in den CPT-Röhrchen nach Nutzung des Wilcoxon-Tests signifikant höher als in den CPDA-Röhrchen (p-Wert: 0,0312).

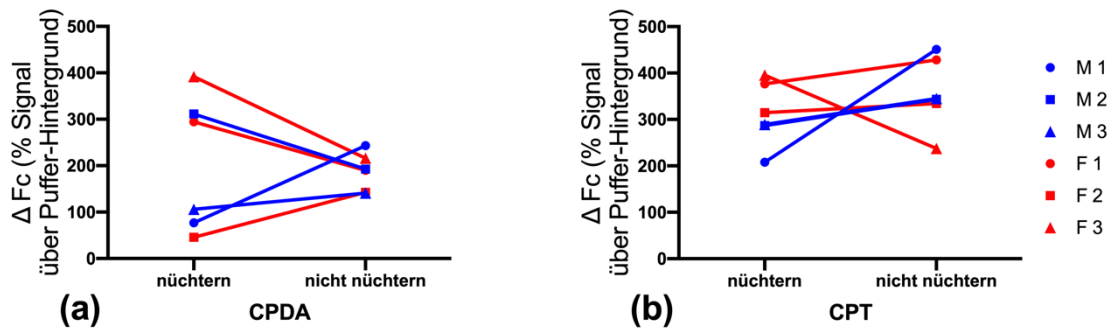


Abbildung 3.48: Kontrollstudie des Parkin-Proteins in CPDA- und EDTA-Röhrchen vor und nach Nahrungsaufnahme

Aufgetragen wurden die Zeitpunkte der Blutentnahme gegen das gemessene ΔFc -Signal des Parkin-Proteins (a) in CPDA-Röhrchen und (b) in CPT-Röhrchen. (a) Es war keine signifikante gleichförmige Dynamik der Proben zu berechnen. Kein Parkin-Protein-Level war zu beiden Messzeitpunkten konstant. (b) Tendenziell lag eine Zunahme der Parkin-Protein-Werte nach der Nahrungsaufnahme vor. Bei F3 wurde eine Abnahme gemessen. Das gemessene Signal des Parkin-Proteins war nach Nahrungsaufnahme im Vergleich zu den CPDA-Röhrchen signifikant höher in den CPT-Röhrchen (p -Wert: 0,0312).

3.8.4 Zusammenfassung der Proteinkorrelationen untereinander, der Verlaufspuren und der Einflüsse auf die Messungen

In der nachfolgenden Tabelle 3.8 werden die Ergebnisse der Abschnitte 3.6, 3.7 und 3.8 zusammengefasst. Die Korrelationen der Proteine untereinander beantworteten die Fragestellung eines signifikanten Unterschieds der gemessenen Level aufgrund der vorbeschriebenen Interaktionen der Proteine untereinander. Die Untersuchung der Verlaufspuren sollte die Fragestellung eines Zusammenhangs der Klinik mit den Proteinleveln anhand einer longitudinalen Analyse spezifischer beantworten. Abschließend wurden verschiedene Einflüsse untersucht, die möglicherweise dazu führten, dass Ergebnisse nicht vergleichbar waren. Dies sollte die Fragestellung beantworten, ob eine Standardisierung der verschiedenen Versuchsschritte notwendig ist.

Tabelle 3.8: Zusammenfassung der Proteinkorrelationen untereinander, der Dynamik der Verlaufspuren und der Einflüsse auf die Messergebnisse

Zeigte die vorbeschriebene molekulare Interaktion der Proteine einen direkten messbaren Zusammenhang der Proteinlevel untereinander?	
Expandiertes und Gesamt-Ataxin-3-Protein	– Tendenz einer PLK des expandierten gegenüber des Gesamt-Ataxin-3-Proteins
Expandiertes Ataxin-3- und Parkin-Protein	– kein signifikanter linearer Zusammenhang
Gesamt-Ataxin-3- und Parkin-Protein	– Tendenz einer NLK der Parkin- gegenüber der Gesamt-Ataxin-3-Protein-Werte
Gab es in den Verlaufspuren derselben Patienten eine signifikante Verlaufskorrelation mit dem SARA-Score?	
Erste Messung (AX 3, AX 5, AX 11, RISCA 3, AX 12)	Gesamt-Ataxin-3-Protein: – keine gleichförmige Dynamik Expandiertes Ataxin-3- und Parkin-Protein: – tendenzielle Abnahme der Werte im Verlauf
Zweite Messung (AX 11, RISCA 3, AX 12)	Expandiertes, Gesamt-Ataxin-3- und Parkin-Protein: – tendenzielle Zunahme der Werte im Verlauf
Spielte die Entwicklung der Pipettiergenauigkeit und die Probenanzahl der TR-FRET-Assays eine Rolle auf die Qualität der Messwerte?	
– Pipettiergenauigkeit im gesamten Promotionszeitraum konstant (Median 95,78%) – Dynamik der Pipettiergenauigkeit folgte nicht der Anzahl der analysierten Proben	
Hatten die verschiedenen Verfahren der Blutentnahme, Lymphozytenisolierung und Probenlagerung der drei unterschiedlichen Zentren einen Einfluss auf die Qualität der Messwerte der Proben?	
Korrelation der Zentrumskohorten	– kein signifikanter Unterschied der Messwerte des expandierten und Gesamt-Ataxin-3-Proteins – signifikant höhere Level des Parkin-Proteins des dritten Zentrums (p-Wert: ****/**)
Wiederholte Auswertungen ohne Messwerte des dritten Zentrums	– keine signifikante Korrelation des Parkin-Protein-Levels mit dem AAO und der Krankheitsdauer – Tendenzen aus 3.5.1 schwächer
Spielten die unterschiedlichen Blutröhrchensysteme und der Umstand, ob eine Probe nüchtern oder nicht nüchtern entnommen wurde, eine Rolle auf die Messwerte?	
EDTA- vs. CPDA-Röhrchen	Gesamt-Ataxin-3-Protein: – keine gleichförmige Dynamik – signifikant geringeres Signal der EDTA-Röhrchen nach Nahrungsaufnahme (p-Wert: *) Parkin-Protein: – tendenzielle Abnahme der Messwerte – keine Signalunterschiede der Röhrchensysteme
CPT- vs. CPDA-Röhrchen	Gesamt-Ataxin-3-Protein: – tendenzielle Abnahme der Messwerte in CPDA- , ungleichförmige Dynamik in CPT-Röhrchen – keine Signalunterschiede der Röhrchensysteme Parkin-Protein: – keine gleichförmige Dynamik – signifikant höheres Signal der CPT-Röhrchen nach Nahrungsaufnahme (p-Wert: *)

4 Diskussion

Die SCA3 ist eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung, die auf einer pathologischen Erhöhung der Anzahl der CAG-Wiederholungen auf dem *Ataxin-3*-Gen beruht (Takiyama et al. 1993; Kawaguchi et al. 1994). Das translatierte expandierte Ataxin-3-Protein und seine veränderte Rolle in einer Reihe von zellulären Stoffwechselwegen führen zu einer erhöhten Neurotoxizität (Matos, de Almeida und Nobrega 2019). Der Schwerpunkt dieser Promotion ist die Interaktion mit Parkin, das durch das expandierte Ataxin-3-Protein ubiquitiniert und vermehrt abgebaut wird (Durcan et al. 2011).

Es gibt keine krankheitsmodifizierende Therapie der SCA3 (Duarte-Silva und Maciel 2018) und keine aussagekräftigen Surrogatmarker für randomisierte-klinische Studien (*randomized clinical trial*, RCT). Vor diesem Hintergrund beschäftigte sich diese Promotion mit der Identifizierung möglicher Verlaufs- und Prognosebiomarker. Die Analysen möglicher *Traitmarker* umfasste die Anzahl der CAG-Wiederholungen und eine Auswahl von *Ataxin-3*- und *Park2*-Polymorphismen im Zusammenhang mit klinischen Verlaufsparemtern. Für die Ermittlung von Surrogat- und *Statemarkern* wurden die Proteinlevel des expandierten und Gesamt-Ataxin-3- sowie des Parkin-Proteins mit spezifischen TR-FRET-Assays gemessen und mit klinischen und genetischen Parametern verglichen. Abschließend erfolgte die Analyse möglicher Einflussfaktoren auf die TR-FRET-Messwerte durch unterschiedliche Verfahren der Probenentnahme, -verarbeitung und -lagerung, um die Notwendigkeit einer Standardisierung zu prüfen.

4.1 Die Analyse der CAG-Wiederholungen, *Ataxin-3*- und *Park2*-Polymorphismen als genetische Biomarker

Die Analyse von *genetic modifiers* ist ein ergänzender Bestandteil dieser Promotion zur Ermittlung weiterer Einflüsse auf den Krankheitsverlauf der SCA3. Zum einen sollten vorher beschriebene Korrelationen überprüft und zum anderen neue Zusammenhänge aufgedeckt werden. Die in diese Promotion

eingeschlossene Kohorte der SCA3-Patienten umfasste 18 und die Kohorte der RISCA vier Personen. Im Vergleich zu anderen Studien, die sich exemplarisch mit der Rolle der CAG-Wiederholungen (n=90, (Maruyama et al. 1995)), der *Ataxin-3*- (n=70, (Maciel et al. 1999)) und der *Park2*-Polymorphismen (n=125 (Lucking et al. 2003) befassten, waren die vorliegenden Kohortenstärken deutlich geringer und ethnologisch monomorph. Die ermittelten tendenziellen Zusammenhänge signifikante Korrelationen in dieser kleinen Kohorte müssen in stärkeren und diverseren Kohorten überprüft und bestätigt werden.

Als diagnostischer Biomarker eignet sich in der SCA3 die Anzahl der pathologisch erhöhten CAG-Wiederholungen. Diese lassen bei 100%-iger Penetranz eine klare Diagnosestellung zu (Sequeiros, Seneca und Martindale 2010; Morales Saute und Bannach Jardim 2015). Außerdem kann durch die Anzahl zu 50% das AAO festgelegt und die Schwere des klinischen Verlaufs abgeschätzt werden. In vorherigen Studien wurde ein früheres AAO und schwererer Phänotyp bei größerer Anzahl der CAG-Wiederholungen beschrieben (Maruyama et al. 1995; Maciel et al. 1995). Dies konnte für die in diese Promotion eingeschlossene kleine Kohorte bestätigt werden. Mit dem AAO lag eine signifikante negative lineare Korrelation (NLK) (p-Wert: **) und mit dem SARA-Score eine positive lineare Korrelation (PLK) vor. Darüber hinaus nahm die *cross-sectional disease progression* (CSDP), die mittlere Fortschrittrate der Erkrankung ($\frac{\text{SARA-Score (Punkte)}}{\text{Erkrankungsdauer (Jahre)}}$), mit der Anzahl der CAG-Wiederholungen signifikant zu (p-Wert: *). Man kann die CAG-Wiederholungen für diese Kohorte mit einem schnelleren Krankheitsverlauf assoziieren.

Die genaue Analyse der Anzahl der CAG-Wiederholungen leistet einen relevanten Beitrag für die genetische und klinische Beratung im Hinblick auf den Symptombeginn, der Geschwindigkeit des Krankheitsfortschrittes und der Schwere des klinischen Bildes.

In dieser Promotion wurden für die Allelausprägungen der Polymorphismen A⁶⁶⁹/G⁶⁶⁹, G⁹⁸⁷/C⁹⁸⁷ und C¹¹¹⁸/A¹¹¹⁸ des *Ataxin-3*-Gens ein Zusammenhang mit den klinischen Verlaufparametern und ein modifizierender Effekt in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen überprüft. Maciel et al. zeigten, dass der Genotyp nor G⁹⁸⁷-C¹¹¹⁸/exp C⁹⁸⁷-A¹¹¹⁸ zu einer signifikanten Zunahme der Antizipation,

also einem früheren AAO und schwereren Phänotyp der Folgegeneration, führt. Für den Polymorphismus A^{669}/G^{669} ist kein Zusammenhang mit dem klinischen Verlauf beschrieben (Maciel et al. 1999). Der genaue Haplotyp aller drei Polymorphismen war aus methodischen Gründen in dieser Promotion nicht zu ermitteln, sodass die Analysen für den Polymorphismus A^{669}/G^{669} und die Polymorphismen G^{987}/C^{987} und C^{1118}/A^{1118} separat abliefen.

Die Ausprägung A^{669}/G^{669} trugen elf (61,1%) und die Ausprägung A^{669}/A^{669} sieben (38,9%) SCA3-Patienten. Es konnte Allel-spezifisch gezeigt werden, dass eine NLK des AAO (p-Wert: *) und insgesamt höhere Punktzahlen des SARA-Scores (p-Wert: *) signifikant für die Kohorte des Genotyps A^{669}/G^{669} vorlagen. Es erschließt sich, dass das AAO neben der Anzahl der CAG-Wiederholungen in der untersuchten kleinen Kohorte durch den Genotyp A^{669}/G^{669} mit beeinflusst wird. Der Phänotyp bei diesem Genotyp scheint bei höheren SARA-Score-Punktzahlen schwerwiegender zu verlaufen. Allerdings muss in Betracht gezogen werden, dass diese Kohorte eine im Mittel vier Jahre längere Krankheitsdauer vorwies und dies ein Grund für die höheren SARA-Score-Punkte sein kann (A^{669}/G^{669} : 11,64 Jahre; A^{669}/A^{669} : 7,71 Jahre). Beide vorliegenden Allelausprägungen zeigten die Tendenz einer PLK in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen mit dem SARA-Score. Es ist kein modifizierender Effekt des einzelnen Genotyps auf die CAG-Wiederholungen anzunehmen.

Bei der Verteilung der Ausprägungen der Polymorphismen G^{987}/C^{987} und C^{1118}/A^{1118} lag bei zehn SCA3-Patienten der Genotyp $G^{987}-C^{1118}/\text{exp } C^{987}-A^{1118}$ (83,3%) und zwei der Genotyp $C^{987}-A^{1118}/\text{exp } C^{987}-A^{1118}$ (16,7%) vor. Diese beiden SCA3-Patienten waren auch Träger der Variante A^{669}/A^{669} , zeigten aber im Vergleich zu den anderen SCA3-Patienten keine besonderen Auffälligkeiten in ihrem Krankheitsverlauf. Es konnte Allel-spezifisch eine signifikante NLK mit dem AAO (p-Wert: *) und eine signifikante PLK mit der CSDP (p-Wert: *) des Genotyps $G^{987}-C^{1118}/\text{exp } C^{987}-A^{1118}$ gezeigt werden. Es kann eine zusätzliche Beeinflussung dieser beiden Parameter durch die Ausprägung der Polymorphismen neben der Anzahl der CAG-Wiederholungen erschlossen werden. Diese Ergebnisse passen zu den Beobachtungen von Maciel et al., die für den Genotyp $G^{987}-C^{1118}/\text{exp } C^{987}-A^{1118}$ eine vermehrte Antizipation beschreiben.

Diese geht mit einem früheren AAO und schwerwiegenderem Phänotyp einher (Maciel et al. 1999). Die höhere CSDP kann in diesem Zusammenhang als ein schwerer klinischer Verlauf gesehen werden. Zu beachten ist die kleine Kohortenstärke von zwei SCA3-Patienten der anderen vorliegenden Allelausprägung $\text{nor } C^{987}\text{-A}^{1118}/\text{exp } C^{987}\text{-A}^{1118}$.

Neben den Polymorphismen des *Ataxin-3*-Gens wurden die drei Polymorphismen G^{601}/A^{601} , G^{1239}/C^{1239} und G^{1281}/A^{1281} des *Park2*-Gens auf ihren Einfluss des klinischen Verlaufs der SCA3 untersucht. Herr Dr. rer. nat. Weber analysierte in seiner Diplomarbeit die Auswirkungen der verschiedenen Ausprägungen der *Park2*-Polymorphismen auf die Interaktion von Parkin und dem Ataxin-3-Protein sowie einem Einfluss auf die Klinik der SCA3-Patienten. Er stellte fest, dass SCA3-Patienten mit dem Genotyp C^{1239}/C^{1239} in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen ein um drei Jahre früheres AAO haben als SCA3-Patienten mit derselben CAG-Wiederholungsanzahl einer anderen Genotypvariante (unveröffentlichte Diplomarbeit Jonasz J. Weber 2011 und persönliche Kommunikation).

Die SCA3-Patienten-Kohorte dieser Promotion war für den Polymorphismus G^{601}/A^{601} mit einer Verteilung von 16 Ausprägungen des Genotyps G^{601}/G^{601} (88,8%) und einmaliger Ausprägung der Genotypen G^{601}/A^{601} (5,6%) und A^{601}/A^{601} (5,6%) relativ monomorph. Bei einer 100%-igen Ausprägung des Genotyps G^{1281}/G^{1281} für den Polymorphismus G^{1281}/A^{1281} war sie absolut monomorph. Die ermittelte signifikante NLK für das AAO (p-Wert: $*(G^{601}/G^{601})$) und die signifikante PLK mit dem SARA-Score (p-Wert: $*(G^{601}/G^{601})$) sind deswegen nicht aussagekräftig im Hinblick eines Allel-spezifischen Effekts. Die Verteilung der beiden Polymorphismen dieser Kohorte stimmt mit zuvor beschriebenen Verteilungen von Lücking et al. und Ros et al. überein (Lücking et al. 2003; Ros, Ampuero und Garcia de Yébenes 2008), wobei die komplett monomorphe Kohorte für G^{1281}/A^{1281} nicht beschrieben wurde. Die Kohortenstärke bei Lücking et al. umfasste 125 und bei Ros et al. 98 Kontrollen, sodass die geringe Kohortenstärke dieser Promotion und ein Gründereffekt durch die relative geographische Nähe der Populationen aus Tübingen, Bonn und Paris als Ursachen angenommen werden können.

Die Ausprägungen des Polymorphismus G^{1239}/C^{1239} verteilten sich auf 15 SCA3-Patienten des Genotyps G^{1239}/G^{1239} (83,3%) und drei des Genotyps G^{1239}/C^{1239} (16,7%).

In den statistischen Analysen der Allelausprägungen zeigten sich nur tendenzielle Zusammenhänge. Der Genotyp G^{1239}/C^{1239} wies eine tendenzielle NLK in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen mit dem AAO auf. Da der Genotyp C^{1239}/C^{1239} nicht vorlag, konnte die Beobachtung von Herrn Dr. rer. nat. Weber eines früheren AAO für diesen Genotyp nicht nachvollzogen werden (unveröffentlichte Diplomarbeit Jonasz J. Weber 2011). Aufgrund dieser Tendenz kann vermutet werden, dass die heterozygote Ausprägung des Polymorphismus G^{1239}/C^{1239} einen milden modifizierenden Effekt auf das AAO hat. Tendenziell zeigte sich in dieser Kohorte für den Genotyp G^{1239}/G^{1239} eine PLK mit dem SARA-Score in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen. Dieser Zusammenhang ist in der Literatur nicht vorbeschrieben und in dieser Promotion nicht signifikant. Damit ist er ein potenzieller Forschungsgegenstand zukünftiger Studien mit stärkeren Kohorten (Abbildung 4.1).

Neben den untersuchten Polymorphismen ist auf genetischer Ebene ein Zusammenhang der Anzahl der CAG-Wiederholungen des *Ataxin-2*-Gens mit dem Auftreten von Faszikulationen assoziiert (de Mattos et al. 2019). Bei gleichzeitigem Vorkommen des Ataxin-2-Proteins in den Ataxin-3-Protein-Aggregaten (Uchihara et al. 2001) ist dies möglicherweise ein Kandidat eines Verlaufsbiomarkers für die SCA3. Um dies ausreichend zu prüfen, sollten neben der Sequenzierung und Ermittlung der Anzahl der CAG-Wiederholungen des *Ataxin-2*-Gens eine sensitive und spezifische Methode zur Detektion des Ataxin-2-Protein-Levels etabliert werden. Diese können wie in der vorliegenden Promotion mit den klinischen Verlaufsparemtern korreliert werden.

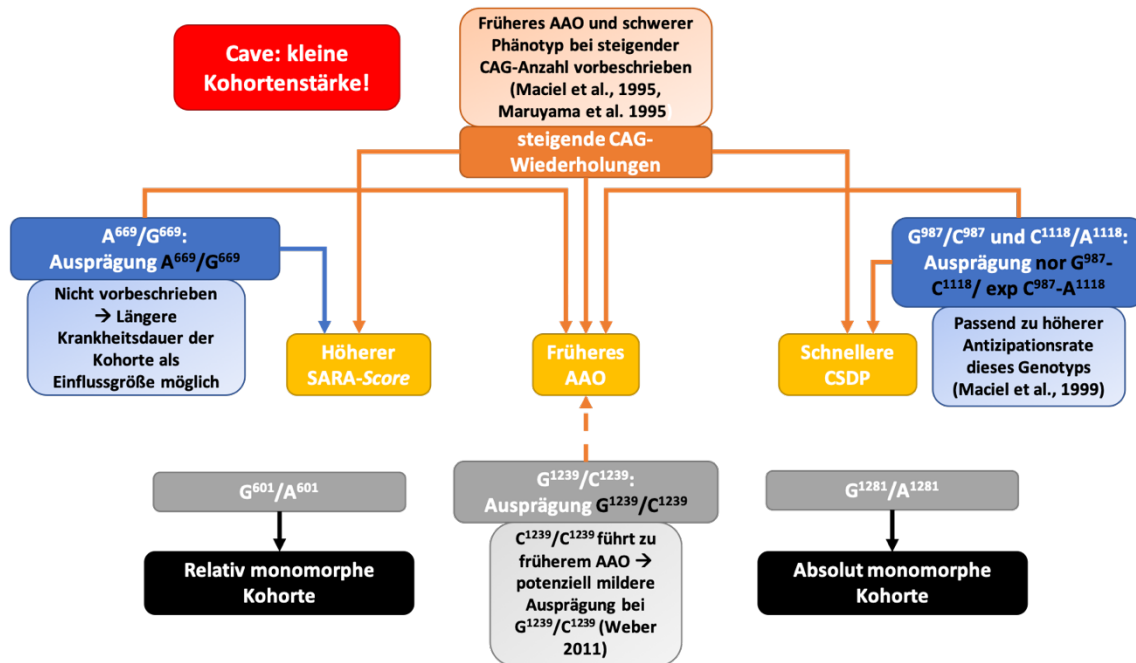


Abbildung 4.1: Einfluss der genetischen Ausprägungen auf die klinischen Parameter
 Gelb: klinische Parameter; Orange: CAG-Wiederholungen und Korrelationen der Genotypen, die mit der Anzahl der CAG-Wiederholungen zusammenhängen; Blau: Polymorphismen des *Ataxin-3*-Gens; Grau: Polymorphismen des *Park2*-Gens; Durchgezogene Pfeile: Signifikante Korrelation; gestrichelte Pfeile: Tendenzieller Zusammenhang.
 Es zeigte sich ein früheres AAO, ein höherer SARA-Score und eine schnellere CSDP bei steigender Anzahl der CAG-Wiederholungen. Vorherige Beobachtungen konnten für diese kleine Kohorte bestätigt werden. Modifizierende Genotypen könnten die Genotypen A^{669}/G^{669} (keine Vorbeschreibung eines Zusammenhangs mit der Klinik) und $nor G^{987}\text{-}C^{1118}/exp C^{987}\text{-}A^{1118}$ des *Ataxin-3*-Gens (vermehrte Antizipation passend vorbeschrieben) sein, die signifikante Korrelationen mit den klinischen Parametern zeigten. Der Genotyp G^{1239}/C^{1239} des *Park2*-Gens zeigte die Tendenz eines früheren AAO in Abhängigkeit der CAG-Wiederholungen. Für C^{1239}/C^{1239} ist dieser Zusammenhang vorbeschrieben, sodass die heterozygote Variante möglicherweise einen milderen Effekt zeigt. Zu beachten ist die geringe Aussagekraft bei kleiner vorliegender Kohortenstärke und der Notwendigkeit diese für folgende Analysen zu erweitern.

4.2 Prüfung des Gesamt-Ataxin-3-, des expandierten Ataxin-3- und des Parkin-Proteins als Verlaufsbio-marker

Durch die Etablierung des neuen TR-FRET-Assays (3.1.2) zur Detektion des Gesamt-Ataxin-3-Proteins, war es möglich seine Level mit den klinischen Verlaufsparemtern und genetischen Ausprägungen der CAG-Wiederholungen und Polymorphismen des *Ataxin-3*- und *Park2*-Gens zu korrelieren. In dieser Messung sind das expandierte Ataxin-3-Protein und das Ataxin-3-Protein mit einer physiologischen Anzahl an Glutaminen enthalten. Es ist kein Zusammenhang des physiologischen Ataxin-3-Proteins mit dem Krankheitsverlauf der SCA3

bekannt. Im Gegenteil zeigten Alves et al., dass eine Überexpression des physiologischen Ataxin-3-Proteins keine Besserung und eine Runterregulierung zu keiner Verschlechterung des Phänotyps in einem SCA3-Rattenmodell führte (Alves et al. 2010). Die Beobachtung, dass eine Überexpression des physiologischen Ataxin-3-Proteins den Phänotyp nicht bessert, konnten Hübener und Rieß in einem SCA3-Mausmodell machen (Hubener und Riess 2010). Trotz des fehlenden beschriebenen Einflusses auf den Verlauf der SCA3 gibt es eine Interaktion des physiologischen und expandierten Ataxin-3-Proteins. In den Aggregaten des expandierten Ataxin-3 befindet sich die physiologische Form des Proteins und es kommt es zu einer direkten Bindung beider Proteine. Diese fällt bei höherer Anzahl der Glutamine stärker aus (Jia et al. 2008). Ob sich diese Interaktion auf die gemessenen Level des Gesamt-Ataxin-3-Proteins niederschlug, wird nun erörtert.

Im Vergleich der Kohorten der Kontrollen, RISCA und SCA3-Patienten fiel zunächst auf, dass die Messwerte der Kontrollkohorte breiter gestreut und zum Teil deutlich höher waren. Der höchste Messwert der RISCA-Kohorte war von RISCA 4. Ob er Träger des expandierten Allels ist, war aufgrund fehlender DNA unklar. Im Vergleich mit den niedrigen Proteinleveln der mutationstragenden RISCA und der SCA3-Patienten liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei ihm um eine gesunde Kontrolle handelt. Aufgrund der Streuung der Kontrollkohorte schienen die Messwerte der RISCA- und der SCA3-Patienten-Kohorte tendenziell niedriger zu sein.

Im Vergleich der Messwerte des expandierten und Gesamt-Ataxin-3-Protein (Abbildung 3.39a) konnte als leichte Tendenz in der Kontroll- und SCA3-Patienten-Kohorte ein Abfall der Gesamt-Ataxin-3-Protein-Level bei hohen Leveln des expandierten Ataxin-3-Proteins dargestellt werden. Dies passt zu der Beobachtung, dass die Gesamt-Ataxin-3-Protein-Level der SCA3-Patienten-Kohorte niedriger gegenüber der Kontrollkohorte waren (Abbildung 3.15) und dass das expandierte Ataxin-3-Protein bei den SCA3-Patienten gegenüber den Kontrollen erhöht war (Abbildung 3.23). Zurückgeführt werden kann dies auf einen vermehrten Einschluss des physiologischen Ataxin-3-Proteins in die Ataxin-3-Protein-Aggregate (Jia et al. 2008). Es liegt weniger lösliches und somit messbares, physiologisches

Ataxin-3-Protein vor und dies könnte zu einer Signalminderung des Gesamt-Ataxin-3-Proteins führen (Abbildung 4.2).

In der Analyse mit den Verlaufsparemtern der Erkrankung konnten keine signifikanten Zusammenhänge zwischen den SCA3-Patienten-Kohorten gemessen werden. Gegenüber der Kontrollkohorte detektierte sich signifikant weniger Gesamt-Ataxin-3-Protein in den SCA3-Patienten-Kohorten mit einem SARA-Score von ≤ 12 Punkten (p-Wert: *) und einer CSDP von $\geq 2,0$ SARA-Score-Punkten pro Erkrankungsjahr (p-Wert: *). Die Schlussfolgerung, dass die mild betroffenen SCA3-Patienten eine schnellere CSDP haben, kann nicht getroffen werden. Nur zwei SCA3-Patienten gehörten diesen beiden Kohorten an und die Signifikanzen sind auf fehlende Ausreißer-Messwerte zurückzuführen. In der longitudinalen Analyse von vier SCA3-Patienten und einem RISCA zeigten die Level des Gesamt-Ataxin-3-Proteins in der ersten Messung eine ungerichtete Dynamik. In der Wiederholung hatte diese einen ansteigenden Verlauf. Diese Proteinlevel können durch die widersprüchlichen Messergebnisse nicht für eine spezifischere Aussage bezüglich eines Zusammenhangs mit dem Krankheitsverlauf herangezogen werden.

Wie bei den Analysen mit den klinischen Verlaufsparemtern zeigten die verschiedenen Allelausprägungen bzw. Kohorten unterschiedlicher Anzahl der CAG-Wiederholungen keine signifikanten Unterschiede in ihren Gesamt-Ataxin-3-Protein-Levels. Für die Gesamtkohorte des Genotyps G^{1239}/C^{1239} konnte gegenüber der Gesamtkohorte der Ausprägung G^{1239}/G^{1239} ein tendenziell geringeres Level des Gesamt-Ataxin-3-Proteins ermittelt werden. Herr Dr. rer. nat. Weber berichtete in seiner Diplomarbeit, dass das Vorliegen von L380-Parkin bei dem Genotyp C^{1239}/C^{1239} zu einer verminderten Degradation des expandierten Ataxin-3-Proteins führt (unveröffentlichte Diplomarbeit Jonasz J. Weber 2011). Durch das vermehrt vorliegende expandierte Ataxin-3-Protein kann es zu einer stärkeren Bindung des physiologischen Ataxin-3-Proteins mit diesem kommen. Dies führt zu einer Verminderung des löslichen, messbaren Anteils des physiologischen Ataxin-3-Proteins (Abbildung 4.2). Ob diese Interaktion bei einer heterozygoten Ausprägung des Polymorphismus als Erklärung für niedrigere Gesamt-Ataxin-3-Protein-Level ausreicht, muss in einer stärkeren Kohorte überprüft

werden. Die zwei SCA3-Patienten des *Ataxin-3*-Haplotyps $nor A^{669}\text{-}C^{987}\text{-}A^{1118}$ /exp $A^{669}\text{-}C^{987}\text{-}A^{1118}$ zeigten keine Auffälligkeiten hinsichtlich ihres Gesamt-Ataxin-3-Protein-Levels.

Die signifikant geringeren Level des Gesamt-Ataxin-3-Proteins der Kohorten mit den Allelausprägungen A^{669}/G^{669} und $G^{987}/C^{1118}\text{-}C^{987}/A^{1118}$ des *Ataxin-3*-Gens und G^{601}/G^{601} , G^{1239}/G^{1239} , G^{1239}/C^{1239} und G^{1281}/G^{1281} des *Park2*-Gens gegenüber der Kontrollkohorte kommen vermutlich durch die größere Kohortenstärke der jeweiligen Variante zu Stande.

Zusammenfassend kann keine Änderung des Gesamt-Ataxin-3-Protein-Levels im Krankheitsverlauf festgestellt werden, was eine Funktion des Gesamt-Ataxin-3-Proteins als Verlaufsbiomarker für die SCA3 potenziell ausschließt. Aufgrund der kleinen Kohortenstärken muss dies nochmal überprüft werden. Die tendenziell geringeren Level des Gesamt-Ataxin-3-Proteins der SCA3-Patienten- gegenüber der Kontrollkohorte könnten unterstützend zur Diagnosestellung herangezogen werden. Im Hinblick auf die eindeutige genetische Diagnostik ist der Mehrwert dieser Analyse fraglich. In dieser Promotion kann kein signifikanter Einfluss der genetischen Ausprägungen der Polymorphismen und der Anzahl der CAG-Wiederholungen auf das Gesamt-Ataxin-3-Level festgestellt werden.

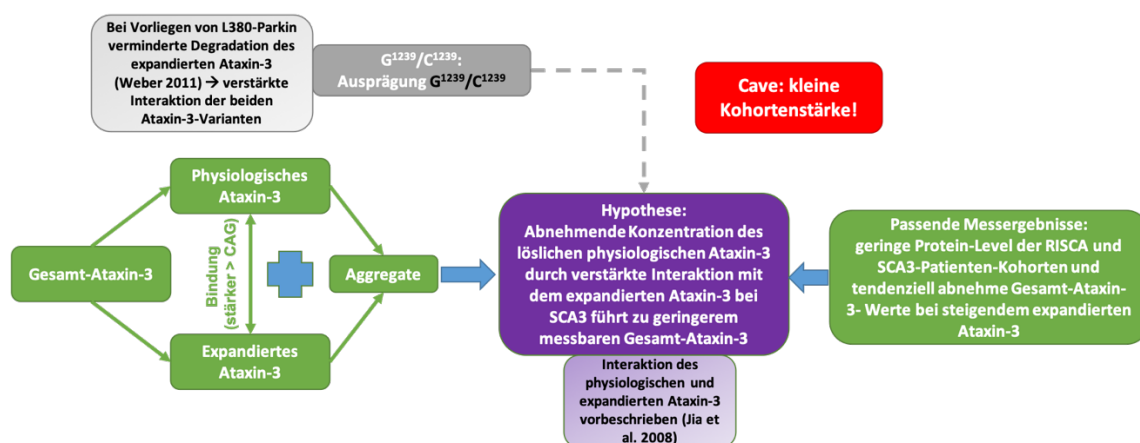


Abbildung 4.2: Hypothese: Abnahme des löslichen physiologischen Ataxin-3-Proteins durch verstärkte Interaktion mit dem expandierten Ataxin-3-Protein in der SCA3

Grün: Proteininteraktionen und Messungen; Lila: Hypothese
 Für das physiologische Ataxin-3-Protein ist der Einschluss in die durch das expandierte Ataxin-3-Protein gebildeten Aggregate und eine Bindung an die expandierte Form durch Jia et al. (2008) vorbeschrieben. Zusammen mit den in dieser Promotion ermittelten niedrigen Protein-Messwerten für die SCA3-Patienten- gegenüber der Kontrollkohorte lässt dies den Schluss zu, dass es durch diese Interaktion zu einer Abnahme des löslichen physiologischen Ataxin-3-Proteins kommt. Dies führt zu den sinkenden Messwerten des Gesamt-Ataxin-3-Levels der SCA3-

Patienten. Passend hierzu ist die Tendenz, dass bei hohen Proteinleveln des expandierten Ataxin-3-Proteins, die Level des Gesamt-Ataxin-3-Proteins sinken. Für die Kohorte des Genotyps G¹²³⁹/C¹²³⁹ des *Park2*-Polymorphismus war das Gesamt-Ataxin-3-Level tendenziell gegenüber der Kohorte des Genotyps G¹²³⁹/G¹²³⁹ erniedrigt. Bei Vorliegen von L380-Parkin wird das expandierte Ataxin-3-Protein vermindert degradiert, was die Hypothese bekräftigt. Zu beachten ist die geringe Kohortenstärke, die eine Wiederholung der Messung in einer größeren Kohorte notwendig macht.

Das expandierte Ataxin-3-Protein ist das translatierte Produkt des *Ataxin-3*-Gen-Allels mit einer pathologisch erhöhten Anzahl an CAG-Wiederholungen. Es wird nur in Mutationsträgern exprimiert. Die vermehrt eingebauten Glutamine führen zu einer Größenzunahme des Proteins, einer anderen Faltung und Aggregation. Diese erschwert den Abbau durch das katalytische Zentrum des Proteasoms (Todi et al. 2010; Verhoef et al. 2002). Im Folgenden wird erläutert, ob dieser Umstand zu signifikanten Unterschieden der Proteinlevel im Krankheitsverlauf führte. Ob die genetischen Ausprägungen der Polymorphismen des *Ataxin-3*- und *Park2*-Gens sowie die Anzahl der CAG-Wiederholungen diese modifizierten, wurde zusätzlich analysiert.

Im Vergleich der Kontroll-, der RISCA- und der SCA3-Patienten-Kohorten zeigte sich ein signifikant höheres Level des expandierten Ataxin-3-Proteins der SCA3-Patienten- gegenüber der Kontrollkohorte (p-Wert: *). Dies war nach eindeutigem genetischem Nachweis der Mutation aller Patienten zu erwarten. Die Messwerte der RISCA-Kohorte waren tendenziell höher gegenüber der Kontroll- und niedriger gegenüber der SCA3-Patienten-Kohorte. Da vier von fünf RISCA einen verlängerten CAG-Abschnitt tragen, sind die leicht erhöhten Level des expandierten Ataxin-3-Proteins ein Indiz für den präsymptomatischen Status dieser. RISCA 4, dessen Anzahl der CAG-Wiederholungen unbekannt war, zeigte das niedrigste Level des expandierten Ataxin-3-Proteins. Das deutet neben dem hohen Level des Gesamt-Ataxin-3-Proteins darauf hin, dass es sich bei RISCA 4 um eine gesunde Kontrolle handeln könnte.

Es zeigten sich signifikant erhöhte Level des expandierten Ataxin-3-Proteins für ein frühes AAO von ≤ 40 Jahre (p-Wert: *), eine längere Krankheitsdauer von ≥ 10 Jahren (p-Wert: **), einen hohen SARA-Score von ≥ 24 Punkten (p-Wert: ****) und einer CSDP von $\leq 1,8$ SARA-Score-Punkten pro Erkrankungsjahr (p-Wert: *) gegenüber der Kontrollkohorte. Diese Ergebnisse zeigen, dass die

hohen Level des expandierten Ataxin-3-Proteins für ein frühes AAO in dieser Promotion in der Regel mit einer längeren Krankheitsdauer des SCA3-Patienten und einem längeren Zeitraum der Symptomentwicklung einhergehen. Ein langsames Fortschreiten der Erkrankung wie $\leq 1,8$ SARA-Score-Punkte pro Erkrankungsjahr zeigt günstige und weniger fulminante Verläufe an, die eine lange Krankheitsdauer und konsekutive vermehrte Akkumulation des expandierten Ataxin-3-Proteins möglich machen. Dies spiegelt sich in den hohen Protein-Messwerten wider (Abbildung 4.3). In der longitudinalen Analyse der Entwicklung der Level des expandierten Ataxin-3-Proteins ist dieses bei den vier SCA3-Patienten und dem RISCA zur zweiten Vorstellung abfallend. Dies war aufgrund der Analysen im Querschnitt nicht zu erwarten. Die Messung wurde aufgrund von nicht ausreichender Probenmengen für nur zwei SCA3-Patienten und den RISCA wiederholt. Der erwartete ansteigende Verlauf wurde bestätigt. Bei zwei so unterschiedlichen Messergebnissen derselben Proben ist die Aussagekraft jedoch fraglich. Die lysierten Lymphozytenproben der ersten Vorstellung waren zum Zeitpunkt der zweiten Messung für zwei bzw. drei Jahre bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Bislang wurde nicht der Zeitraum ermittelt, den die lysierten Lymphozyten gelagert werden können, um reproduzierbare Messwerte zu generieren (Vaught 2006). Nach diesem Teilaspekt der Promotion stellt sich statt der Erkenntnis der longitudinalen Dynamik der Proteinlevel die Frage, wie lange die lysierten Lymphozyten der TR-FRET-Analysen bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden können, um qualitativ hochwertige und verlässliche Messergebnisse zu erhalten.

Einen Rückgang des messbaren expandierten Ataxin-3-Protein-Levels im Krankheitsverlauf wie ihn Nguyen et al. in lysierten Zellen des Kleinhirns ihres SCA3-Mausmodells beschrieben (Nguyen et al. 2013), liegt im Querschnitt der lysierten Lymphozytenproben der SCA3-Patienten dieser Kohorte nicht vor. Die Level stiegen an. Das expandierte Ataxin-3-Protein wird ubiquitär im Körper exprimiert und führt trotzdem vorwiegend zu neurologischen Symptomen. Unter anderem wird hiermit die in Neuronen vorliegende Aggregation in Verbindung gebracht, die in Lymphozyten nicht vorliegt (Paulson, Perez et al. 1997). Sie ist ein Grund, warum der Anteil des löslichen expandierten Ataxin-3-Proteins in Lysaten des Kleinhirns im Krankheitsverlauf abnimmt. Lymphozyten sind ein leicht zugängliches

Biomaterial, das aus Vollblut isoliert werden kann. Da das expandierte Ataxin-3-Protein in ihnen zu keiner Pathologie führt und die BHS viele Moleküle nicht in die Peripherie ausschwemmen lässt, sind sie möglicherweise kein geeignetes Gewebe, um Biomarker neurodegenerativer Erkrankungen zu etablieren. Zerebrospinaler Liquor, der im zentralen Nervensystem (ZNS) zirkuliert und sich im Stoffaustausch mit den Neuronen befindet, ist womöglich ein besseres Biofluid zur Etablierung eines Biomarkers. Ein Nachteil ist die invasivere Punktion für die Probanden.

Auch für das expandierte Ataxin-3-Protein wurden genetische Einflüsse auf sein Expressionslevel geprüft. Die SCA3-Patienten und die RISCA mit ≤ 64 CAG-Wiederholungen zeigten gegenüber der Kontrollkohorte (p-Wert: ** (SCA3-Patienten, RISCA)), und der Kohorte mit 65 bis 69 CAG-Wiederholungen (p-Wert: ** (Gesamtkohorte)) signifikant höhere Level des expandierten Ataxin-3-Proteins. Dies ist nicht wie erwartet, da eine Korrelation mit dem frühen AAO der SCA3-Patienten eine höhere Anzahl der CAG-Wiederholungen erwarten ließ. Daraus lässt sich schließen, dass weniger das AAO mit dem expandierten Ataxin-3-Protein korreliert als die durch das frühe AAO bedingte längere Krankheitsdauer (Abbildung 4.3). Eine geringere Anzahl der CAG-Wiederholungen ging in dieser Kohorte passend mit einem milderem und längerem Krankheitsverlauf einher. Um diesen Zusammenhang abschließend zu klären, muss eine Messung des expandierten Ataxin-3-Proteins bei Erstauftreten der klinischen Symptome erfolgen und diese Messwerte verglichen werden. Die Messung des Proteinlevels zu diesem frühen Zeitpunkt der symptomatischen Krankheitsphase ermöglicht die Prüfung eines Protein-Grenzwertes, der das Auftreten von Symptomen wahrscheinlich macht.

Die Ausprägung der verschiedenen Polymorphismen des *Ataxin-3*- und *Park2*-Gens bedingte keine Unterschiede der Level des expandierten Ataxin-3-Proteins. Die Kohorten der Genotypen A^{669}/G^{669} (p-Wert: ****), $G^{987}/C^{1118}-C^{987}/A^{1118}$ (p-Wert: ***), G^{601}/G^{601} (p-Wert: **), G^{1239}/G^{1239} (p-Wert: *), G^{1239}/C^{1239} (p-Wert: *) und G^{1281}/G^{1281} (p-Wert: **) zeigten gegenüber der Kontrollkohorte signifikant erhöhte Level des expandierten Ataxin-3-Proteins. Dass dies nicht für die anderen vorliegenden Ausprägungen der Polymorphismen der Fall war, liegt an der

Unmöglichkeit statistischer Analysen durch die geringe Kohortenstärke. Die zwei SCA3-Patienten des *Ataxin-3*-Haplotyps $\text{nor } A^{669}\text{-C}^{987}\text{-A}^{1118}/\text{exp } A^{669}\text{-C}^{987}\text{-A}^{1118}$ zeigten keine Auffälligkeiten hinsichtlich ihres Levels des expandierten Ataxin-3-Proteins.

In dieser Promotion kann ein starker Zusammenhang der Level des expandierten Ataxin-3-Proteins mit dem klinischen Verlauf der Erkrankung aufgezeigt werden. Dass das expandierte Ataxin-3-Protein als Surrogatmarker für RCTs dienen kann, zeigten therapeutische Ansätze in SCA3-Mausmodellen. Diese setzten auf einen vermehrten Abbau des expandierten Ataxin-3-Proteins durch mTOR-Inhibitoren (Menzies et al. 2010) oder einer verminderten Bildung desselbigen durch Exon-Skipping und der Vermeidung der Translation der PolyQ-Domäne (Evers et al. 2013; Toonen et al. 2017). Die Folgen waren bei beiden Ansätzen zum einen eine Reduktion der Aggregate und zum anderen eine Verbesserung des neurologischen Phänotyps. Ob diese Beobachtungen mit einer Reduktion der Level des expandierten Ataxin-3-Proteins in einem Biofluid wie Blut oder zerebrospinalen Liquor einhergehen, kann Bestandteil zukünftiger Studien sein. Es konnte kein modifizierender Effekt der Allelausprägung der Polymorphismen des *Ataxin-3*- und *Park2*-Gens auf die Level des expandierten Ataxin-3-Proteins demonstriert werden.

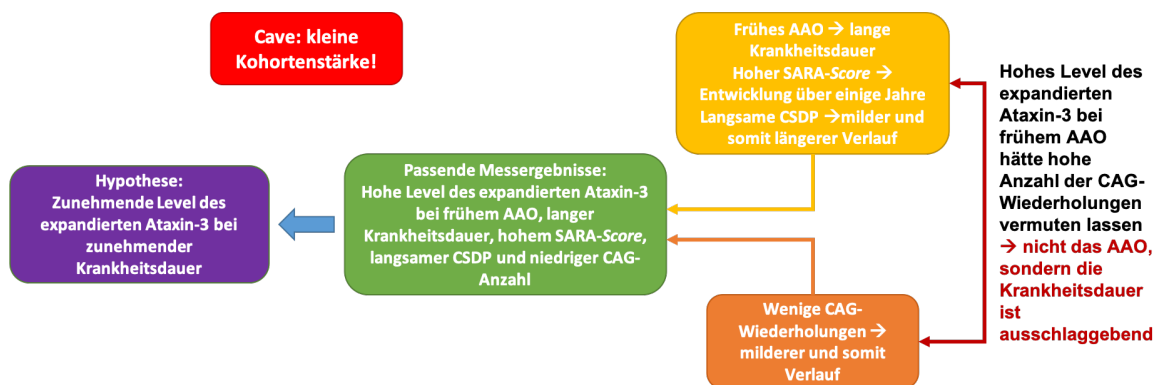


Abbildung 4.3: Hypothese: Das Level des expandierten Ataxin-3-Proteins nimmt im Verlauf der SCA3-Erkrankung zu

Neben einem erhöhten Level des expandierten Ataxin-3-Proteins bei einer längeren Krankheitsdauer wurde dies für ein frühes AAO, einen hohen SARA-Score, eine langsame CSDP und eine geringe Anzahl der CAG-Wiederholungen gemessen. Diese klinischen und genetischen Parameter stehen im Zusammenhang mit der Krankheitsdauer, sodass davon ausgegangen werden muss, dass vor allem diese das Level des expandierten Ataxin-3-Proteins bestimmt. Sonst lassen sich die hohen Level bei frühem AAO und niedriger Anzahl von CAG-Wiederholungen nicht erklären, da ein frühes AAO im Regelfall mit einer hohen Anzahl dieser assoziiert ist (Maruyama et

al. 1995). Durch diese Korrelation ist das expandierte Ataxin-3-Protein ein Kandidat für einen Verlaufsmarker, wenn diese Messungen in einer größeren Kohorte bestätigt werden.

Durcan et al. identifizierten Ataxin-3 als erste Deubiquitinase des Parkin-Proteins (Durcan et al. 2011). Dies geschieht nicht direkt, da bestehende Ubiquitin-Bindungen von Parkin nicht durch das Ataxin-3-Protein gelöst werden können. Das Ataxin-3-Protein bindet an die mit Parkin interagierende E2-Konjugase, sodass die Bindung von Parkin und dieser verstärkt wird. Dies führt dazu, dass die auf die E2-Konjugase aufgeladene Ubiquitin nicht auf Parkin transferiert werden kann und an das Ataxin-3-Protein bindet. Dieser Vorgang wird bei Vorliegen des expandierten Ataxin-3-Proteins verstärkt (Durcan et al. 2012). Die indirekte DUB von Parkin führt zu seiner vermehrten autophagosomalen Degradation, was Durcan et al. mit erniedrigten Parkin-Protein-Leveln in der Zellkultur nachwies. Sie vermuteten, dass der Abfall des Parkin-Protein-Leveln mit dem Auftreten von Parkinsonismus in SCA3-Patienten zusammenhängt (Durcan et al. 2011). Schöls et al. stellten fest, dass Parkinsonismus bei SCA3-Patienten nicht durch die ausgeprägte Neurodegeneration der *Substantia nigra* bedingt ist, sondern durch die Aussparung des *Ncl. subthalamicus* von der Neurodegeneration (Schöls et al. 2015). Da der zugrunde liegende Pathomechanismus auch in der Erniedrigung des Parkin-Protein-Leveln liegen kann, wurde dieser Aspekt neben der Frage, ob die molekulare Interaktion der beiden Proteine zu einer Änderung der Level des Parkin-Proteins führt, in dieser Promotion überprüft. Außerdem wurde ein Einfluss der *Ataxin-3*- und *Park2*-Polymorphismen sowie der Anzahl der CAG-Wiederholungen auf die Expression von Parkin untersucht.

Die Kohorten der Kontrollen, der RISCA und der SCA3-Patienten zeigten keine großen Expressionsunterschiede des Parkin-Proteins, sodass von keiner allgemeinen Erniedrigung der Parkin-Protein-Leveln in SCA3-Patienten ausgegangen werden kann. Für den klinischen Verlauf ließen sich Tendenzen aufzeigen. Es zeigten sich niedrigere Level des Parkin-Proteins für die SCA3-Patienten-Kohorte mit einem AAO von ≥ 45 Jahren. Dies ist mit dem beobachteten höheren Level des expandierten Ataxin-3-Proteins für diese Kohorte vereinbar, da eine erhöhte Degradation des Parkin-Proteins vorliegen kann. Passend zeigten sich in der Auftragung der Gesamt-Ataxin-3- gegen die Parkin-Protein-Werte bei

steigenden Werten des ersteren tendenziell abfallende Parkin-Protein-Werte. Dies kann mit einer vermehrten Degradation von Parkin durch die höhere Konzentration des expandierten Ataxin-3-Proteins in der Gesamt-Ataxin-3-Proteinmenge erklärt werden (Durcan et al. 2011).

Für die beobachtete Tendenz eines höheren Parkin-Protein-Level für eine längere Krankheitsdauer ist diese Erklärung nicht hinreichend. Die Parkin-Protein-Level wurden bei hohen Leveln des expandierten Ataxin-3-Proteins erniedrigt erwartet. So sind Tendenzen zu verzeichnen und in stärkeren Kohorten zu überprüfen (Abbildung 4.5). Zusammenhänge mit dem SARA-Score, der CSDP oder zwischen den Leveln des expandierten Ataxin-3- und Parkin-Proteins zeigten sich nicht. AX 3 zeigte in seinem Krankheitsverlauf eine kurzzeitig mit Levodopa behandelte Bradykinese und AX 17 ein RLS, das mit Parkinsonismus assoziiert ist (Ferini-Strambi et al. 2018). Für AX 3 wurde ein Signal im mittleren Bereich gemessen. AX 17 exprimierte den niedrigsten gemessenen Parkin-Protein-Wert, sodass die Hypothese von Durcan et al. einer Assoziation erniedrigter Parkin-Protein-Level mit Parkinsonismus in dieser Promotion nicht ausgeschlossen werden kann (Abbildung 4.4). Der gezielte Vergleich der Parkin-Protein-Level zweier SCA3-Patienten-Kohorten, von der eine nicht an Parkinsonismus leidet, kann diese Hypothese in einer zukünftigen Studie möglicherweise belegen.

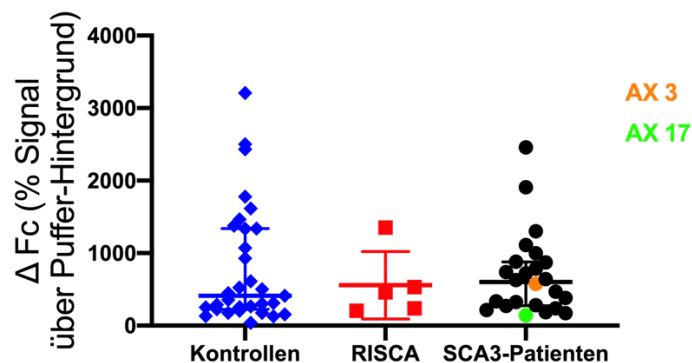


Abbildung 4.4: Parkin-Protein-Messwerte der SCA3-Patienten mit Parkinsonismus

Aufgetragen wurden die Kohorten der Kontrollen, RISCA und SCA3-Patienten gegen das ΔFc -Signal des Parkin-Proteins. AX 3 und AX 17 sind farblich gekennzeichnet. Während AX 3 ein dem Median nahes Parkin-Protein-Level exprimierte, wurde bei AX 17, bei dem ein RLS vorlag, das niedrigste Parkin-Protein-Signal der SCA3-Patienten und RISCA gemessen. Dies unterstützt die Hypothese von Durcan et al., dass niedrige Parkin-Protein-Level bei SCA3-Patienten mit einem Parkinsonismus einhergehen (Durcan et al. 2011).

In der Analyse eines longitudinalen Zusammenhangs zeigten die Parkin-Protein-Level in der ersten Messung für die vier SCA3-Patienten und den RISCA eine absteigende Dynamik. Diese war aufgrund der erhobenen Daten im Querschnitt zu erwarten bzw. bestätigte die vorbeschriebene Abnahme des Parkin-Protein-Level bei ansteigendem Ataxin-3-Protein-Level. In der Wiederholung der Messungen in Proben von zwei SCA3-Patienten und dem RISCA kann diese Annahme bei ansteigender Dynamik nicht gestützt werden. Die Messwerte sind nicht aussagekräftig.

Einflüsse der CAG-Wiederholungen und der Ausprägungen der *Ataxin-3*- und *Park2*-Polymorphismen auf die gemessenen Parkin-Protein-Level konnten nicht dargestellt werden. Die Tendenz einer Zunahme des Parkin-Protein-Level bei Anstieg der Anzahl der CAG-Wiederholungen passt zu der Annahme einer reduzierten Degradation von Parkin bei niedrigeren Leveln des expandierten Ataxin-3-Proteins. Diese wurden in diesem Zusammenhang gemessen (Abbildung 3.39c). Die Tendenzen höherer Parkin-Protein-Werte der SCA3-Patienten-Kohorten mit den Genotypen G^{987}/C^{1118} - C^{987}/A^{1118} des *Ataxin-3*- und G^{1281}/G^{1281} des *Park2*-Gens sind mit der kleinen Kohorte der anderen Allelausprägungen des jeweiligen Polymorphismus zu erklären. Interessanterweise wurde bei RISCA 2, der die zwei weniger häufigen Varianten G^{1239}/C^{1239} und A^{1281}/A^{1281} des *Park2*-Gens trug, die höchsten Parkin-Protein-Werte gemessen. Zusätzlich hatte RISCA 2 das höchste Level des expandierten Ataxin-3-Proteins, sodass dieser Messwert möglicherweise aufgrund einer veränderten Interaktion beider Proteine zustande kommt. Für diesen Umstand sind keine vorherigen Beobachtungen beschrieben worden. Er sollte daher in einer größeren Kohorte überprüft werden. Außerdem ist unklar, ob es sich um einen additiven Effekt beider Polymorphismen handelt oder der Genotyp A^{1281}/A^{1281} zu diesem hohen Level führt. Die anderen SCA3-Patienten und RISCA mit dem Genotyp G^{1239}/C^{1239} hatten keine erhöhten Parkin-Protein-Werte. Ein Einfluss dieses Polymorphismus für sich ist unwahrscheinlich (Abbildung 4.5).

Zusammenfassend bestehen für das Parkin-Protein keine eindeutigen unterschiedlichen Level im Krankheitsverlauf. Es kommt derzeit nicht als Verlaufsbio-marker in Frage. Die Beobachtung der Tendenz geringerer Parkin-Protein-Level

analog zu hohen Leveln des expandierten Ataxin-3-Proteins bei einem frühen AAO und niedriger Anzahl der CAG-Wiederholungen, sollte Anlass sein seine Korrelationen in einer stärkeren Kohorte zu überprüfen. Außerdem sollten Parkinson-assoziierte Symptome standardisiert für alle Patienten erfragt und dokumentiert werden, um Zusammenhänge wie mit dem beschriebenen RLS klarer darstellen zu können. Der sehr hohe Parkin-Protein-Wert bei gleichzeitigem Auftreten der Genotypen G¹²³⁹/C¹²³⁹ und A¹²⁸¹/A¹²⁸¹ des *Park2*-Gens und hohem Level des expandierten Ataxin-3-Proteins ist eine Beobachtung, die es in einer stärkeren Kohorte zu überprüfen gilt. Sie lässt eine veränderte Interaktion von Parkin mit dem expandierten Ataxin-3-Protein vermuten.

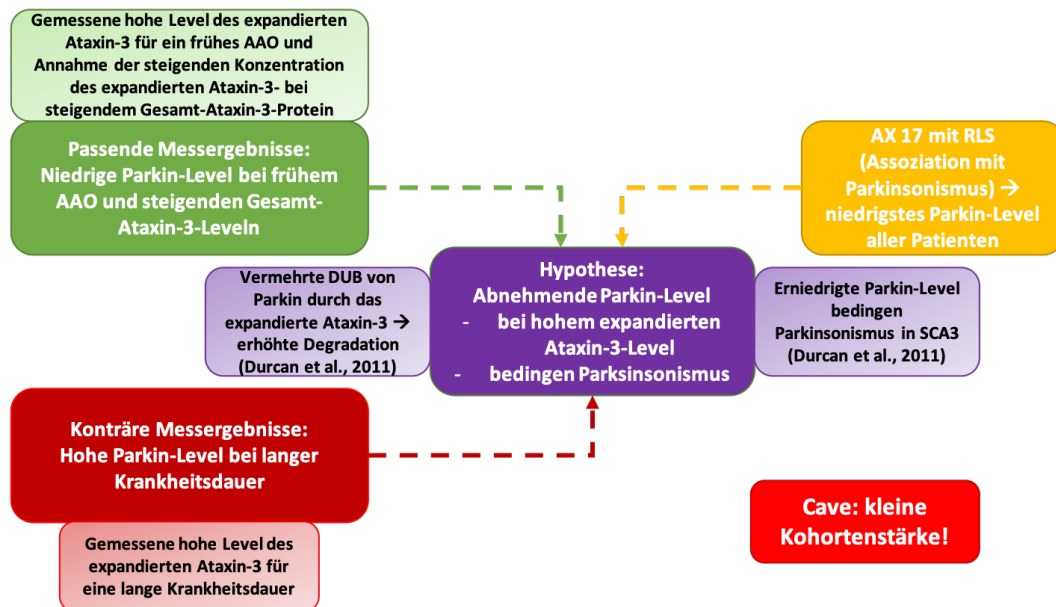


Abbildung 4.5: Hypothese: Erniedrigte Parkin-Protein-Level liegen bei hohem Level des expandierten Ataxin-3-Proteins vor und begünstigen Parkinsonismus bei SCA3-Patienten
 Für das Parkin-Protein zeigten sich in dieser Promotion nur tendenzielle Zusammenhänge. Diese lassen die Hypothese, dass bei vermehrtem Vorliegen des expandierten Ataxin-3-Proteins, die Parkin-Protein-Level durch eine erhöhte Degradierung, wie sie Durcan et al. (2011) beschrieben, zum Teil zu. Die niedrigen Level des Parkin-Proteins bei einem frühem AAO und hohen Leveln des Gesamt-Ataxin-3-Proteins sind hierzu passend. Widersprüchlich sind die tendenziell hohen Parkin-Protein-Level nach einer langen Krankheitsdauer. Dies zeigt, dass die Tendenzen durch Untersuchungen in einer größeren Kohorte verifiziert werden müssen. Die Hypothese, dass verminderte Parkin-Protein-Level mit Parkinsonismus in der SCA3 einhergehen, kann durch eine Einzelbeobachtung gestützt werden. Für AX 17 mit einem RLS wurde das niedrigste Parkin-Protein-Level aller SCA3-Patienten und RISCA gemessen.

Die stark variablen und teilweise widersprüchlichen Messergebnisse führten zu den Analysen möglicher Einflussgrößen der Messwerte.

Die Patientenproben wurden aus den Zentren Tübingen, Bonn und Paris gesammelt. Diese nutzten unterschiedliche Blutröhrchensysteme für die Proben, die mit unterschiedlichen Verfahren weiterverarbeitet wurden. Hierbei unterschied sich der Zeitraum zwischen Entnahme und Isolierung der Lymphozyten aus dem Vollblut aufgrund des postalischen Versandes. Die Proben eines Zentrums (anonymisiert als Nummer drei in dieser Promotion) waren als lysierte Lymphozyten aliquotiert und für einige Jahre bei -80 °C gelagert, bevor sie für die Messungen bereitgestellt wurden. Im direkten Vergleich der Messwerte je Zentrum zeigten sich signifikant höhere Level des Parkin-Proteins des dritten Zentrums gegenüber dem ersten (p-Wert: ****) und dem zweiten Zentrum (p-Wert: **). Dies bekräftigt die Annahme aus der longitudinalen Analyse, dass eine langjährige Lagerung der Lymphozyten bei -80 °C eine Auswirkung auf die Messergebnisse haben kann. Die anschließend durchgeführte Kohortenanalyse für das AAO und die Krankheitsdauer unter Ausschluss der Parkin-Protein-Messwerte des dritten Zentrums zeigte weiterhin keine signifikanten Zusammenhänge bei fehlenden Ausreißern. Es muss davon ausgegangen werden, dass im derzeitigen Stadium der Etablierung eines Biomarkers für die SCA3 Unterschiede bei der Probenentnahme, -prozessierung und -lagerung eine wesentliche Rolle zur Vergleichbarkeit der Messwerte spielt. Daher wurden zwei Kontrollstudien durchgeführt. Für das Ataxin-2-Protein wurde eine Dynamik seines Levels nach Nahrungsaufnahme vorgeschrieben (Sen et al. 2016). Dies wurde für das Gesamt-Ataxin-3- und Parkin-Protein überprüft. In beiden Kontrollstudien konnte keine Konstanz der beiden Proteinlevel vor und nach Nahrungsaufnahme festgestellt werden. Es spielt eine Rolle, ob eine Probe nüchtern oder nicht nüchtern entnommen wird. Die Dynamik nach der Nahrungsaufnahme war nicht gleichgerichtet. Es kann keine pauschale Aussage getroffen werden, dass ein nüchterner Wert allgemein höher bzw. niedriger ist. Es ist somit keine Grundlage für eine Vergleichbarkeit gegeben. Der Vergleich der EDTA-, CPDA- und CPT-Röhrchen zeigte, dass die detektierten Proteinsignale in den CPT-Röhrchen am höchsten und in den EDTA-Röhrchen am geringsten ausfielen. Dies liegt vermutlich an dem Trennmedium aus Ficoll und einer Polyesterbarriere der CPT-Röhrchen, dass ein sofortiges Zentrifugieren des Röhrchens mit einer Trennung der Lymphozyten und des Serums von

den Erythrozyten erlaubt. Frau Dr. rer. nat. Hübener-Schmid stellte in einer Kontrollstudie mit CPDA-Röhrchen für das Parkin-Protein fest, dass die sofortige Prozessierung einer Probe zum signifikant besten Signal führt. Nach vier Stunden ist mit einem erheblichen Signalverlust zu rechnen (mündlich durch Fr. Dr. rer. nat. Hübener-Schmid, Abbildung 4.6). Deswegen sollten CPT-Röhrchen in zukünftigen Studien den Vorzug gegeben werden, wenn eine Isolierung der Lymphozyten aus CPDA-Röhrchen nicht innerhalb einer Stunde möglich ist.

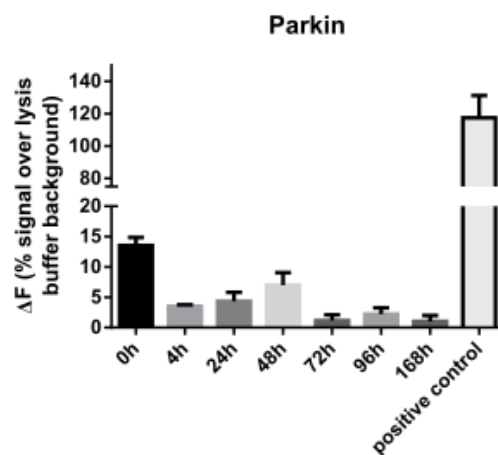


Abbildung 4.6: Dynamik des Signalverlustes nach verzögerter Prozessierung der Lymphozyten aus CPDA-Röhrchen

Aufgetragen wurden die Zeitpunkte der Isolierung der Lymphozyten aus CPDA-Röhrchen gegen das gemessene ΔF_c -Signal des Parkin-Proteins. Das höchste Signal war nach direkter Isolation zu messen. Nach vier Stunden zeigte sich ein Abfall des gemessenen Proteinlevels, das nach 48 Stunden weiter abfiel. (Fr. Dr. rer. nat. Hübener-Schmid (unveröffentlicht))

4.3 Schwächen dieser Promotion

Diese Promotion beruht auf dem *Workpackage 4* von *NeurOmics*, das die Zielsetzung hatte, neue Biomarker für die SCA3 zu identifizieren (NeurOmics 2019c). Die Vorgabe war Messungen der Proteinlevel von Parkin und α -Synuclein (Anhang) in 15 symptomatischen und 15 präsymptomatischen Mutationsträgern vorzunehmen und diese mit klinischen Daten zu vergleichen (NeurOmics 2012). Die Messungen des expandierten und Gesamt-Ataxin-3-Proteins wurden ergänzend durchgeführt. Die Kohortenstärke der präsymptomatischen Mutationsträger wurde nicht erreicht und die übertroffene Anzahl an SCA3-Patienten erwies sich als zu gering, um eine ausreichende Effektstärke in den statistischen Tests zu erzielen. Für die Identifizierung von Biomarkern sind keine Kohortenstärken

vorbeschrieben. Für RCT mit der Testung krankheitsmodifizierender Medikamente ist bekannt, dass für die Beobachtung einer 50%-igen Reduktion der CSDP innerhalb eines Jahres die Studie 175-202 Patienten (Chan et al. 2011; Jacobi et al. 2015) umfassen muss. Dies gilt, wenn der SARA-Score zur Verlaufsbeurteilung genutzt wird, da der Krankheitsprogress sehr langsam fortschreitet. Wird zum Vergleich gegen eine Placebo-Kohorte getestet, muss die Kohorte auf 328 SCA3-Patienten erweitert werden (Saute et al. 2015). Daraus kann abgeleitet werden, dass in Querschnittsstudien zur Evaluation und Etablierung von Biomarkern deutlich größere Kohorten notwendig sind, um die marginalen Unterschiede in den Krankheitsverläufen deutlicher darzustellen. Solch große Kohortenstärken können nicht durch eine Population alleine abgedeckt werden, sodass die Durchführung multizentrischer Studien zukünftig notwendig ist (Saute und Jardim 2018). Ebenso muss versucht werden die Zahl der präsymptomatischen Mutationsträger zu erhöhen. Diese profitieren am stärksten durch eine vor Symptomaufreten begonnene krankheitsmodifizierende Therapie, sodass Biomarker gefunden werden sollten, die den präsymptomatischen Zeitraum mit abbilden (Saute und Jardim 2018). Wu et al. haben okulomotorische Störungen als klinischen Biomarker identifiziert, die vor Eintreten der Gangataxie bei, laut SARA-Score, präsymptomatischen Mutationsträgern zu beobachten waren (Wu et al. 2017). Diese können als Frühzeichen der bald einsetzenden neurologischen Symptomatik gewertet werden. Da durch krankheitsmodifizierende Therapien keine Rückbildung der Symptomatik erwartet wird (Saute und Jardim 2018), sind die okulomotorischen Störungen jedoch eher ein Prognosebiomarker für das baldige Auftreten der Gangataxie und kein Surrogatmarker.

Für die Identifikation von modifizierenden Einflüssen der Allelausprägungen der untersuchten Polymorphismen waren die Kohortenstärken zu gering. Bei einmaliger Ausprägung einiger Polymorphismen waren keine statistischen Analysen für diese möglich. Fehlendes Biomaterial für die DNA-Sequenzierungen war ein Grund für die teilweise noch kleinen Kohorten. Um diesem vorzubeugen, sollte für Folgestudien bei allen Patienten Blut in EDTA-Röhrchen entnommen werden. Die genetischen Analysen komplettieren die Messungen der Proteinlevel und ergänzende Aussagen zu den Einzelfallbeobachtungen, wie dem hohen Parkin-

Protein-Level der Kombination der Allelausprägungen G¹²³⁹/C¹²³⁹ und A¹²⁸¹/A¹²⁸¹ des *Park2*-Gens, werden möglich.

Eine Aussage zu einer Assoziation von niedrigen Parkin-Protein-Leveln und Parkinsonismus von SCA3-Patienten kann aufgrund von lückenhaften klinischen Informationen zu Parkinsonismus oder nicht ataktischen Symptomen nicht getroffen werden. Es erfolgte keine generelle Absprache, die klinisch-neurologische Untersuchung auf diesen Fokus auszurichten. In Zukunft sollte zur Beantwortung dieser Fragestellung beispielsweise standardisiert der INAS miterfasst werden. Ein anderer Aspekt ist die Korrelation der Proteinlevel mit dem AAO. Die SCA3-Patienten waren in unterschiedlichem Alter, sodass ein frühes AAO junger Patienten mit einer kurzen Krankheitsdauer und das der älteren Patienten mit einer langen Krankheitsdauer verbunden war. Die Krankheitsdauer ist als Einflussfaktor dieser Analysen zu beachten. Um diesem zu entgehen, wäre die Isolierung von Lymphozyten und die Messung der Proteinlevel zum Zeitpunkt des AAO von großem Interesse. Diese Messwerte können auch Auskunft über die Dynamik der Proteinlevel von der präsymptomatischen zur symptomatischen Phase geben. Die CSDP, wie sie hier berechnet wurde, ist klinisch nicht korrekt. Um den realen Krankheitsfortschritt zu ermitteln, ist es notwendig den SARA-Score zum Zeitpunkt des AAO zu kennen und diesen von der aktuellen SARA-Score-Punktzahl abzuziehen. Bei einem Patienten wird beispielsweise bei seinem AAO eine SARA-Score-Punktzahl von fünf Punkten ermittelt. Man weiß nicht, in welchem Zeitraum sich diese Punktzahl aufgebaut hat. Sein Score nimmt in den nächsten zwei Jahren um einen Punkt auf sechs SARA-Score-Punkte zu. Das entspricht einer realen CSDP von 0,5 SARA-Score-Punkten pro Erkrankungsjahr. Berechnet werden jedoch nach der in dieser Promotion verwendeten Definition 3,0 Punkte pro Erkrankungsjahr. Die für die SCA3-Patienten ermittelten CSDPs waren vermutlich bei kurzen Krankheitsdauern falsch zu hoch. Um diesem vorzubeugen, ist die Dokumentation des SARA-Scores zum Zeitpunkt des AAO von Bedeutung und sollte immer mit angegeben werden.

In der Bestimmung des expandierten Ataxin-3-Proteins wird der MW-1-Antikörper verwendet, der ab einer PolyQ-Länge von 15 Glutaminen an das Protein bindet. Da die physiologische Anzahl zwischen 13 und 41 Wiederholungen liegt

(Lima et al. 2005), bindet der Antikörper an das physiologische Ataxin-3-Protein und führt zu einem falsch hohen Signal. Es verhindert signifikantere Unterschiede der SCA3-Patienten gegenüber der Kontrollkohorte. Dies kann beim Aufzeigen feiner Unterschiede der Expression des expandierten Ataxin-3-Proteins zwischen den präsymptomatischen Mutationsträgern und den Kontrollen eine Rolle spielen. Idealerweise wird ein Antikörper verwendet, der im Falle der SCA3 ab 42 oder mehr Glutaminen an das Ataxin-3-Protein bindet.

Neben diesem Aspekt besteht bei Immuno-Assays, die zwei Antikörper zur Detektion des Proteins nutzen, die Gefahr eines *Hook*-Effektes. Durch ein Missverhältnis von zu viel Protein bei zu niedrigen Antikörperkonzentrationen können falsch niedrige Messwerte resultieren. Unter diesen Umständen besteht eine Sättigung der Antikörper-Protein-Bindung, bei der möglicherweise nicht beide Antikörper gleichzeitig, sondern je einer der Antikörper an dem Protein bindet und kein Energietransfer stattfindet (Tate und Ward 2004). So kommt ein paradox niedriges Proteinsignal bei hoher Proteinkonzentration zu Stande. Um dem zu entgehen, muss ein spezifischerer Antikörper etabliert oder die Konzentrationen der Proben für diesen Assay verdünnt werden (Hübl 2018). Ein Hinweis für einen vorliegenden *Hook*-Effekt kann ein deutlich niedrigerer Messwert der Positivkontrolle des überexprimierten Proteins als die der zu analysierenden Proben sein. Bei der Verwendung von Immuno-Assays mit zwei Antikörpern, wie es der TR-FRET-Assay ist, muss bei der Interpretation paradoxer Ergebnisse an die methodischen Limitationen gedacht werden.

Die Analysen der Proben der verschiedenen Zentren, die Kontrollstudien mit den verschiedenen Blutröhrchensystemen und der Zusammenhang mit der Nahrungsaufnahme zeigten, dass die Probengewinnung in den Blutröhrchen, die Isolierung, die Lyse der Lymphozyten und die Lagerung zu gleichen Bedingungen bzw. mit denselben Verfahren durchgeführt werden müssen. Dieses Wissen formte sich erst in diesem Promotionszeitraum. Die Messwerte der Proteinlevel sind daher nur eingeschränkt miteinander vergleichbar. Die Stabilität der Lymphozyten bei längerer Lagerung bei -80 °C sollte im Hinblick auf die Verlässlichkeit der Messwerte in einer Kontrollstudie evaluiert werden. In Folgestudien sollte vereinbart werden, dass Blutentnahmen nüchtern erfolgen und dieselben

Blutröhrchen zur Blutentnahme verwendet werden. Die genauen Anforderungen der Isolierung, der Lyse und der Lagerung der Lymphozyten müssen festgelegt sein.

4.4 Ausblick

Diese Promotion befasste sich hauptsächlich mit der Identifizierung möglicher Biomarker der SCA3, die zur Beurteilung des Verlaufs und somit in therapeutischen RCTs angewendet werden können. Die Notwendigkeit von solchen Surrogatmarkern ist durch den klinisch langsamen Verlauf gegeben. Bei Nutzung von klinischen Verlaufs-Scores sind lange Studienzeiträume notwendig. Außerdem kann die präsymptomatische Phase mit diesen nicht abgebildet werden (Lima und Raposo 2018). In dieser Promotion stellt das expandierte Ataxin-3-Protein den vielversprechendsten Kandidaten dar. Es waren in der kleinen Kohorte deutliche signifikante Zusammenhänge mit den klinischen Verlaufsparemtern darzustellen. Nichtsdestotrotz muss aufgrund der Erkenntnisse erforderlicher Standardisierungen und größerer Kohortenstärken eine erneute Prüfung stattfinden. Möglicherweise bilden sich die Tendenzen, die bei dem Gesamt-Ataxin-3- und Parkin-Protein beobachtet wurden, unter diesen Bedingungen zu signifikanten Zusammenhängen aus. Die Prüfung des Einflusses der genetischen Polymorphismen auf die Expression der Proteinlevel hilft die Messwerte besser zu kategorisieren und zu interpretieren. Außerdem können sie ein therapeutisches Ziel bei Nutzung von Allel-spezifischen Oligonukleotiden darstellen, um pathologische Funktionen des expandierten Ataxin-3-Proteins stumm zu stellen. Die Umsetzung einiger dieser Anforderungen wird in einem *NeurOmics* folgenden Forschungsprojekt *ESMI* umgesetzt. Durch eine multizentrische Organisation wird eine große Kohortenstärke von SCA3-Patienten und präsymptomatischen Mutationsträgern gewährleistet. Durch ein striktes Standardisierungsprotokoll sind die Messwerte der Proben besser zu vergleichen. Beispielsweise sind der Zeitpunkt der letzten Blutentnahme, das weitere Vorgehen bei dem jeweils benutzten Blutröhrchen und der Versand der Proben genau beschrieben.

Für die Messung des expandierten Ataxin-3-Proteins wurde durch Frau Anna Kaucher ein TR-FRET-Assay etabliert, dass anstelle des MW1-Antikörpers den Anti-Ataxin-3-Antikörper-Klon 1C2 (Merck Millipore, Darmstadt, DE) nutzt.

Dieses bindet ab einer Glutaminanzahl von 37 und spezifischer das expandierte Ataxin-3-Protein. Dies hilft die Menge des detektierten physiologischen Ataxin-3-Proteins zu vermindern und eine bessere Trennschärfe zwischen den Kontrollen und SCA3-Patienten zu schaffen (persönliche Kommunikation Fr. Kaucher und Fr. Dr. rer. nat. Hübener-Schmid).

Ein anderer Aspekt von *ESMI* ist die Etablierung von Biomarkern mittels TR-FRET in zerebrospinalen Liquor (Bundesministerium für Bildung und Forschung 2019; Santana 2016). Für HD existiert bereits mit dem *Single Molecule Counting Immunoassay* (Singulex) eine weitere hochsensitive Methode, bei der Fodale et al. erfolgreich Huntingtin in zerebrospinalen Liquor nachweisen konnten. Es basiert, wie der TR-FRET-Assay, auf der spezifischen Bindung zweier fluoreszenzmarkierter Antikörper, deren Signal über eine konfokale Lasereinheit gemessen wird. Durch den Einsatz zusätzlicher magnetischer Partikel und separaten Inkubationszeiten der beiden Antikörper konnte die Sensitivität der Messung in zerebrospinalen Liquor verbessert werden (Fodale et al. 2017). Wie unter 4.2 beschrieben, bildet das expandierte Ataxin-3-Protein in den Lymphozyten keine Aggregate. Die Messung in zerebrospinalen Liquor bietet neue Möglichkeiten zur Beurteilung von Biomarkern, da dieser die betroffenen Gewebe direkt umspült. Die Punktion zur Gewinnung zerebrospinalen Liquors ist jedoch invasiver als eine venöse Punktion. Sowohl der TR-FRET- und als auch der Singulex-Assay sollten in beiden Biofluiden überprüft werden, um die jeweils sensitivste Methode bei gleichzeitigem Versuch einer niedrigen Invasivität zu etablieren. Auch wenn die Möglichkeit eines *Hook*-Effektes bei beiden Verfahren besteht, überwiegen ihre Vorteile. Sie zeichnen sich durch ihre Zeitersparnis gegenüber eines *Western Blot*-Assays und der Möglichkeit sehr viele Proben gleichzeitig zu analysieren aus (bis zu 192 bei der in dieser Promotion genutzten Platte). In zukünftigen Studien sollte auf sie gesetzt werden.

Neben den vorgestellten Proteinen sind für das Ataxin-2-Protein (Uchihara et al. 2001; Nobrega et al. 2015), die Superoxiddismutase (SOD) und Glutathionperoxidase (GSH-Px) (de Assis et al. 2017) sowie das leichte Serum-Neurofilament (Wilke et al. 2018) Veränderungen ihrer Konzentration bei Vorliegen des expandierten Ataxin-3-Proteins vorgeschrieben. Für die SOD und GSH-Px wurden

unterschiedliche Aktivitäten bei präsymptomatischen und symptomatischen SCA3-Mutationsträgern festgestellt (de Assis et al. 2017). Dies lässt diese beiden Enzyme als Verlaufsbiomarker geeignet erscheinen. Verschiedene Proteine bilden diverse Aspekte der Pathogenese unterschiedlich gut ab. Für die jeweilige Fragestellung müssen daher separate Biomarker verglichen und etabliert werden. Als Marker zur Beurteilung der Neurodegeneration würde sich zum Beispiel die Prüfung des leichten Serum-Neurofilaments anbieten. Bei einer therapeutischen RCT mittels ASOs kommt das expandierte Ataxin-3-Protein, das unter dieser Therapie reduziert werden sollte, in Frage.

Diese Promotion zeigt, dass messbare Zusammenhänge des expandierten Ataxin-3-Proteins mit den Parametern des Krankheitsverlaufs signifikant sind. Für das Gesamt-Ataxin-3- und Parkin-Protein sind diese als Tendenzen zu erkennen. Ob sie als Surrogatmarker in Frage kommen, können Studien größerer Kohortenstärken und ausgeprägter Standardisierung näher eingrenzen. Letztlich aber wird diese Frage bei der Anwendung des Biomarkers in einer RCT mit einem krankheitsmodifizierenden Medikament geklärt werden können. Das Level des Biomarkers kann durch den therapeutischen Effekt des Medikamentes unabhängig von der mit der Krankheit zusammenhängenden Dynamik verändert werden und somit doch nicht geeignet sein (Saute und Jardim 2018) (Abbildung 4.7).

Diskussion

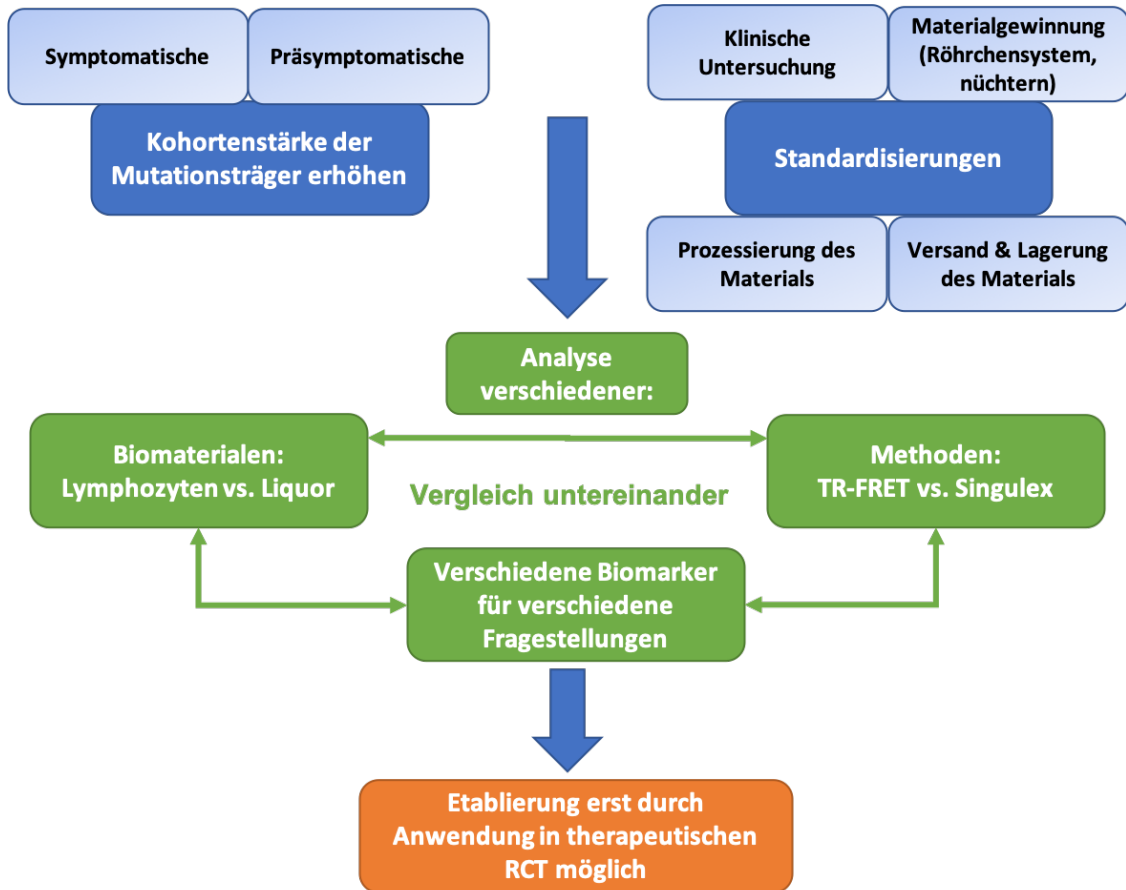


Abbildung 4.7: Zusammenfassung der im Ausblick beschriebenen nächsten Schritte

Blau: bereits für *ESMI* umgesetzt; Grün: nächste Schritte; Orange: abschließender Schritt
Die Erkenntnis dieser Promotion ist die Notwendigkeit starker Kohorten und obligater Standardisierungen, um die Etablierung eines Biomarkers vorzunehmen. Dieses wurde für *ESMI* durch ein multizentrisches Vorgehen und genau dargelegten Standardisierungen umgesetzt. In den nächsten Schritten sollte die vergleichende Analyse verschiedener Biomaterialien, Methoden und Biomarkern für die jeweilige Fragestellung erfolgen. Ob sich der Biomarker für das Überwachen eine Therapieerfolges im Rahmen einer RCT eignet, kann abschließend erst während dieser erfolgen. Eine eigene vom Krankheitsverlauf unabhängige Dynamik des Biomarkers auf das Therapeutikum kann bis zu diesem Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden (Saute und Jardim 2018).

5 Zusammenfassung

Die Spinozerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3) ist eine autosomal-dominant vererbare neurodegenerative Erkrankung, deren pathologischer Mechanismus auf einer erhöhten Anzahl der CAG-Wiederholungen auf dem *Ataxin-3*-Gen beruht. Als Konsequenz erfolgt für das Ataxin-3-Protein eine pathologische Erweiterung seiner Glutaminanzahl, was zu einer fehlerhaften Faltung und Aggregation des Proteins in Neuronen führt. Das expandierte Ataxin-3-Protein und seine veränderten Rollen in zellulären Signalwegen haben einen neurotoxischen Effekt, der einen vermehrten Zelluntergang mit sich bringt. Parkin, eine E3-Ubiquitin-Ligase, wird durch das *Park2*-Gen kodiert und löst bei Vorliegen verschiedener Mutationen auf diesem ein juveniles hereditäres Parkinson-Syndrom aus. Das Parkin-Protein wird von Ataxin-3 deubiquitiniert, was bei Vorliegen seiner expandierten Form zunimmt. Durch die Deubiquitinierung kommt es zu einer vermehrten autophagosomalen Degradation von Parkin und einem nachgewiesenen Abfall seines Levels. Es existieren keine krankheitsmodifizierenden Therapien für die SCA3 und randomisierte-klinische Studien scheitern an den unzureichenden Änderungen der *Score*-Punktzahlen in den Studienzeiträumen. Es können bislang keine Verläufe in präsymptomatischen Mutationsträgern abgebildet werden, die einer genetischen Beratung und der Entscheidung eines Therapiestarts helfen würden. Diese Promotion beschäftigte sich mit der Analyse, ob die Level des expandierten und Gesamt-Ataxin-3- sowie des Parkin-Proteins mit dem klinischen Verlauf der SCA3 korrelieren und sie somit als Verlaufsbiomarker und Surrogatmarker für klinische Studien in Frage kommen. Außerdem wurde der Einfluss der Anzahl der CAG-Wiederholungen und die Ausprägung dreier Polymorphismen des *Ataxin-3*- und *Park2*-Gens auf die Klinik und die Expressionslevel der Proteine geprüft.

Hierfür wurden die Proteinlevel mit hochsensitiven und -spezifischen TR-FRET-Assays in lysierten Lymphozyten von 24 SCA3-Patienten, fünf Angehörigen, von denen vier sicher die Mutation trugen (RISCA), und 31 Kontrollen aus drei europäischen Zentren gemessen. Diese wurden mit den klinischen Verlaufsparemtern wie ataktischer Symptombeginn (AAO), Krankheitsdauer, *SARA-Score*,

Krankheitsfortschritt (*cross-sectional disease progression*, CSDP) sowie den genetischen Ausprägungen des *Ataxin-3*- und *Park2*-Gens korreliert. Außerdem wurden Kontrollstudien hinsichtlich der Notwendigkeit eines standardisierten Vorgehens durchgeführt.

Für das expandierte *Ataxin-3* zeigten sich signifikant höhere Proteinlevel für Patienten mit einem frühen AAO, einer langen Krankheitsdauer, einem hohen SARA-Score und einer langsamen CSDP. Dieses Protein scheint ein geeigneter Kandidat für einen Verlaufsbiomarker zu sein. Für das Gesamt-*Ataxin-3*- und *Parkin*-Protein stellten sich Tendenzen im Krankheitsverlauf dar, deren Signifikanz bei Folgestudien näher bewertet werden muss. Aufgrund der fehlenden Standardisierung waren die Messwerte der verschiedenen Zentren stark variabel. Durch Kontrollstudien zeigte sich die Bedeutsamkeit der verwendeten Blutröhrchen, des nahrungsabhängigen Zeitpunkts der Probenentnahme und der langjährigen Lagerung der lysierten Lymphozyten bei -80 °C. Die Kohortenstärken waren nach Literaturrecherche zu gering, um eine ausreichende Evaluierung durchzuführen, sodass diese in Folgestudien deutlich erhöht werden muss.

Unter der Bedingung, der gewonnenen Erkenntnisse für eine notwendige Standardisierung und Erweiterung der Kohortenstärken, legen die Ergebnisse dieser Promotion nahe, dass mit dem expandierten *Ataxin-3* und eventuell mit dem Gesamt-*Ataxin-3*- sowie *Parkin*-Protein Verlaufsbiomarker für die SCA3 etabliert werden können. Dies wäre ein Fortschritt im Hinblick auf die Durchführung und Bewertung valider randomisierter-klinischer Studien zur Testung krankheitsmodifizierender Therapien.

Literaturverzeichnis

- Adanyeguh, I. M., V. Perlberg, P. G. Henry, D. Rinaldi, E. Petit, R. Valabregue, A. Brice, A. Durr und F. Mochel. 2018. **'Autosomal dominant cerebellar ataxias: Imaging biomarkers with high effect sizes'**, *Neuroimage Clin*, 19: 858-67.
- Alves, S., I. Nascimento-Ferreira, G. Auregan, R. Hassig, N. Dufour, E. Brouillet, M. C. Pedroso de Lima, P. Hantraye, L. Pereira de Almeida und N. Deglon. 2008. **'Allele-specific RNA silencing of mutant ataxin-3 mediates neuroprotection in a rat model of Machado-Joseph disease'**, *PLoS One*, 3: e3341.
- Alves, S., I. Nascimento-Ferreira, N. Dufour, R. Hassig, G. Auregan, C. Nobrega, E. Brouillet, P. Hantraye, M. C. Pedroso de Lima, N. Deglon und L. P. de Almeida. 2010. **'Silencing ataxin-3 mitigates degeneration in a rat model of Machado-Joseph disease: no role for wild-type ataxin-3?'**, *Hum Mol Genet*, 19: 2380-94.
- Alves, S., E. Regulier, I. Nascimento-Ferreira, R. Hassig, N. Dufour, A. Koeppen, A. L. Carvalho, S. Simoes, M. C. de Lima, E. Brouillet, V. C. Gould, N. Deglon und L. P. de Almeida. 2008. **'Striatal and nigral pathology in a lentiviral rat model of Machado-Joseph disease'**, *Hum Mol Genet*, 17: 2071-83.
- Antony, P. M., S. Mantele, P. Mollenkopf, J. Boy, R. H. Kehlenbach, O. Riess und T. Schmidt. 2009. **'Identification and functional dissection of localization signals within ataxin-3'**, *Neurobiol Dis*, 36: 280-92.
- Araujo, J., P. Breuer, S. Dieringer, S. Krauss, S. Dorn, K. Zimmermann, A. Pfeifer, T. Klockgether, U. Wuellner und B. O. Evert. 2011. **'FOXO4-dependent upregulation of superoxide dismutase-2 in response to oxidative stress is impaired in spinocerebellar ataxia type 3'**, *Hum Mol Genet*, 20: 2928-41.
- Arboleda, G., L. C. Morales, B. Benitez und H. Arboleda. 2009. **'Regulation of ceramide-induced neuronal death: cell metabolism meets neurodegeneration'**, *Brain Res Rev*, 59: 333-46.
- Asakawa, S., Ki Tsunematsu, A. Takayanagi, T. Sasaki, A. Shimizu, A. Shintani, K. Kawasaki, A. J. Mungall, S. Beck, S. Minoshima und N. Shimizu. 2001. **'The genomic structure and promoter region of the human parkin gene'**, *Biochem Biophys Res Commun*, 286: 863-8.
- Ashkenazi, A., C. F. Bento, T. Ricketts, M. Vicinanza, F. Siddiqi, M. Pavel, F. Squitieri, M. C. Hardenberg, S. Imarisio, F. M. Menzies, and D. C. Rubinsztein. 2017. **'Polyglutamine tracts regulate beclin 1-dependent autophagy'**, *Nature*, 545: 108-11.
- Babuin, L. und A. S. Jaffe. 2005. **'Troponin: the biomarker of choice for the detection of cardiac injury'**, *Cmaj*, 173: 1191-202.
- Bai, J. J., S. S. Safadi, P. Mercier, K. R. Barber und G. S. Shaw. 2013. **'Ataxin-3 is a multivalent ligand for the parkin Ubl domain'**, *Biochemistry*, 52: 7369-76.
- Beasley, S. A., V. A. Hristova und G. S. Shaw. 2007. **'Structure of the Parkin in-between-ring domain provides insights for E3-ligase dysfunction**

- in **autosomal recessive Parkinson's disease**', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 3095-100.
- Beites, C. L., H. Xie, R. Bowser und W. S. Trimble. 1999. **'The septin CDCrel-1 binds syntaxin and inhibits exocytosis'**, *Nat Neurosci*, 2: 434-9.
- Berke, S. J., F. A. Schmied, E. R. Brunt, L. M. Ellerby und H. L. Paulson. 2004. **'Caspase-mediated proteolysis of the polyglutamine disease protein ataxin-3'**, *J Neurochem*, 89: 908-18.
- Bettencourt, C., M. Raposo, R. Ros, R. Montiel, J. Bruges-Armas und M. Lima. 2013. **'Transcript diversity of Machado-Joseph disease gene (ATXN3) is not directly determined by SNPs in exonic or flanking intronic regions'**, *J Mol Neurosci*, 49: 539-43.
- Bichelmeier, U., T. Schmidt, J. Hubener, J. Boy, L. Ruttiger, K. Habig, S. Poths, M. Bonin, M. Knipper, W. J. Schmidt, J. Wilbertz, H. Wolburg, F. Laccone und O. Riess. 2007. **'Nuclear localization of ataxin-3 is required for the manifestation of symptoms in SCA3: in vivo evidence'**, *J Neurosci*, 27: 7418-28.
- Bilen, J. und N. M. Bonini. 2007. **'Genome-wide screen for modifiers of ataxin-3 neurodegeneration in Drosophila'**, *PLoS Genet*, 3: 1950-64.
- Bilen, J., N. Liu, B. G. Burnett, R. N. Pittman und N. M. Bonini. 2006. **'MicroRNA pathways modulate polyglutamine-induced neurodegeneration'**, *Mol Cell*, 24: 157-63.
- Biomarkers Definitions Working Group. 2001. **'Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework'**, *Clin Pharmacol Ther*, 69: 89-95.
- Bird, Thomas D. 1998. **'Hereditary Ataxia Overview'**, Accessed 26.01.2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1138/>.
- Biskup, S., M. Gerlach, A. Kupsch, H. Reichmann, P. Riederer, P. Vieregge, U. Wullner und T. Gasser. 2008. **'Genes associated with Parkinson syndrome'**, *J Neurol*, 255 Suppl 5: 8-17.
- Bonanomi, M., A. Natalello, C. Visentin, V. Pastori, A. Penco, G. Cornelli, G. Colombo, M. G. Malabarba, S. M. Doglia, A. Relini, M. E. Regonesi und P. Tortora. 2014. **'Epigallocatechin-3-gallate and tetracycline differently affect ataxin-3 fibrillogenesis and reduce toxicity in spinocerebellar ataxia type 3 model'**, *Hum Mol Genet*, 23: 6542-52.
- 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: 248-54.
- Brinkman, R. R., M. M. Mezei, J. Theilmann, E. Almqvist und M. R. Hayden. 1997. **'The likelihood of being affected with Huntington disease by a particular age, for a specific CAG size'**, *Am J Hum Genet*, 60: 1202-10.
- Bucciantini, M., E. Giannoni, F. Chiti, F. Baroni, L. Formigli, J. Zurdo, N. Taddei, G. Ramponi, C. M. Dobson und M. Stefani. 2002. **'Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases'**, *Nature*, 416: 507-11.
- Bundesministerium für Bildung und Forschung. 2019. **'ESMI'**, Accessed 28.02.2019. <https://www.gesundheitsforschung-bmbf.de/de/esmi-4641.php>.

- Burnett, B., F. Li und R. N. Pittman. 2003. **'The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin-3 binds polyubiquitylated proteins and has ubiquitin protease activity'**, *Hum Mol Genet*, 12: 3195-205.
- Carmona, V., J. Cunha-Santos, I. Onofre, A. T. Simoes, U. Vijayakumar, B. L. Davidson, und L. Pereira de Almeida. 2017. **'Unravelling Endogenous MicroRNA System Dysfunction as a New Pathophysiological Mechanism in Machado-Joseph Disease'**, *Mol Ther*, 25: 1038-55.
- Chai, Y., S. S. Berke, R. E. Cohen und H. L. Paulson. 2004. **'Poly-ubiquitin binding by the polyglutamine disease protein ataxin-3 links its normal function to protein surveillance pathways'**, *J Biol Chem*, 279: 3605-11.
- Chai, Y., S. L. Koppenhafer, N. M. Bonini und H. L. Paulson. 1999. **'Analysis of the role of heat shock protein (Hsp) molecular chaperones in polyglutamine disease'**, *J Neurosci*, 19: 10338-47.
- Chan, E., P. Charles, P. Ribai, C. Goizet, C. Marelli, C. M. Vincitorio, A. Le Bayon, L. Guyant-Marechal, N. Vandenberghe, M. Anheim, D. Devos, L. Freeman, I. Le Ber, K. N'Guyen, M. Tchikviladze, P. Labauge, D. Hannequin, A. Brice, A. Durr und S. T. du Montcel. 2011. **'Quantitative assessment of the evolution of cerebellar signs in spinocerebellar ataxias'**, *Mov Disord*, 26: 534-8.
- Chou, A. H., S. Y. Chen, T. H. Yeh, Y. H. Weng und H. L. Wang. 2011. **'HDAC inhibitor sodium butyrate reverses transcriptional downregulation and ameliorates ataxic symptoms in a transgenic mouse model of SCA3'**, *Neurobiol Dis*, 41: 481-8.
- Chou, A. H., T. H. Yeh, Y. L. Kuo, Y. C. Kao, M. J. Jou, C. Y. Hsu, S. R. Tsai, A. Kakizuka und H. L. Wang. 2006. **'Polyglutamine-expanded ataxin-3 activates mitochondrial apoptotic pathway by upregulating Bax and downregulating Bcl-xL'**, *Neurobiol Dis*, 21: 333-45.
- Ciechanover, A. 2006. **'The ubiquitin proteolytic system: from a vague idea, through basic mechanisms, and onto human diseases and drug targeting'**, *Neurology*, 66: S7-19.
- Cohen-Carmon, D. und E. Meshorer. 2012. **'Polyglutamine (polyQ) disorders: the chromatin connection'**, *Nucleus*, 3: 433-41.
- Correia, M., P. Coutinho, M. C. Silva, J. Guimaraes, J. Amado, und E. Matos. 1995. **'Evaluation of the effect of sulphametoxazole and trimethoprim in patients with Machado-Joseph disease'**, *Rev Neurol*, 23: 632-4.
- Cortes, C. J. und A. R. La Spada. 2015. **'Autophagy in polyglutamine disease: Imposing order on disorder or contributing to the chaos?'**, *Mol Cell Neurosci*, 66: 53-61.
- Costa Mdo, C. und H. L. Paulson. 2012. **'Toward understanding Machado-Joseph disease'**, *Prog Neurobiol*, 97: 239-57.
- Coutinho, P. und C. Andrade. 1978. **'Autosomal dominant system degeneration in Portuguese families of the Azores Islands. A new genetic disorder involving cerebellar, pyramidal, extrapyramidal and spinal cord motor functions'**, *Neurology*, 28: 703-9.
- Cui, X., Q. Liang, Y. Liang, M. Lu, Y. Ding und B. Lu. 2014. **'TR-FRET assays of Huntingtin protein fragments reveal temperature and polyQ length-dependent conformational changes'**, *Sci Rep*, 4: 5601.

- de Assis, A. M., J. A. M. Saute, A. Longoni, C. B. Haas, V. R. Torrez, A. W. Brochier, G. N. Souza, G. V. Furtado, T. C. Gheno, A. Russo, T. L. Monte, R. M. Castilhos, A. Schumacher-Schuh, R. D'Avila, K. C. Donis, C. R. de Mello Rieder, D. O. Souza, S. Camey, V. B. Leotti, L. B. Jardim und L. V. Portela. 2017. **'Peripheral Oxidative Stress Biomarkers in Spinocerebellar Ataxia Type 3/Machado-Joseph Disease'**, *Front Neurol*, 8: 485.
- de Mattos, E. P., M. Kolbe Muskopf, V. Bielefeldt Leotti, M. L. Saraiva-Pereira und L. B. Jardim. 2019. **'Genetic risk factors for modulation of age at onset in Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3: a systematic review and meta-analysis'**, *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 90: 203-10.
- Diallo, A., H. Jacobi, T. Schmitz-Hubsch, A. Cook, R. Labrum, A. Durr, A. Brice, P. Charles, C. Marelli, C. Mariotti, L. Nanetti, M. Panzeri, M. Rakowicz, A. Sobanska, A. Sulek, L. Schols, H. Hengel, B. Melegh, A. Filla, A. Antenora, J. Infante, J. Berciano, B. P. van de Warrenburg, D. Timmann, S. Boesch, M. Pandolfo, J. B. Schulz, P. Bauer, P. Giunti, L. Baliko, M. H. Parkinson, J. S. Kang, T. Klockgether und S. Tezenas du Montcel. 2017. **'Body Mass Index Decline Is Related to Spinocerebellar Ataxia Disease Progression'**, *Mov Disord Clin Pract*, 4: 689-97.
- Dong, Z., B. Ferger, J. C. Paterna, D. Vogel, S. Furler, M. Osinde, J. Feldon und H. Bueler. 2003. **'Dopamine-dependent neurodegeneration in rats induced by viral vector-mediated overexpression of the parkin target protein, CDCrel-1'**, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 12438-43.
- Doss-Pepe, E. W., E. S. Stenroos, W. G. Johnson und K. Madura. 2003. **'Ataxin-3 interactions with rad23 and valosin-containing protein and its associations with ubiquitin chains and the proteasome are consistent with a role in ubiquitin-mediated proteolysis'**, *Mol Cell Biol*, 23: 6469-83.
- Duarte-Silva, S. und P. Maciel. 2018. **'Pharmacological Therapies for Machado-Joseph Disease'**, *Adv Exp Med Biol*, 1049: 369-94.
- Durcan, T. M. und E. A. Fon. 2011. **'Mutant ataxin-3 promotes the autophagic degradation of parkin'**, *Autophagy*, 7: 233-4.
- . 2013. **'Ataxin-3 and its e3 partners: implications for machado-joseph disease'**, *Front Neurol*, 4: 46.
- Durcan, T. M., M. Kontogiannea, N. Bedard, S. S. Wing und E. A. Fon. 2012. **'Ataxin-3 deubiquitination is coupled to Parkin ubiquitination via E2 ubiquitin-conjugating enzyme'**, *J Biol Chem*, 287: 531-41.
- Durcan, T. M., M. Kontogiannea, T. Thorarinsdottir, L. Fallon, A. J. Williams, A. Djarmati, T. Fantaneanu, H. L. Paulson und E. A. Fon. 2011. **'The Machado-Joseph disease-associated mutant form of ataxin-3 regulates parkin ubiquitination and stability'**, *Hum Mol Genet*, 20: 141-54.
- Durr, A., G. Stevanin, G. Cancel, C. Duyckaerts, N. Abbas, O. Didierjean, H. Chneiweiss, A. Benomar, O. Lyon-Caen, J. Julien, M. Serdaru, C. Penet, Y. Agid und A. Brice. 1996. **'Spinocerebellar ataxia 3 and Machado-Joseph disease: clinical, molecular, and neuropathological features'**, *Ann Neurol*, 39: 490-9.

- Ellisdon, A. M., B. Thomas und S. P. Bottomley. 2006. **'The two-stage pathway of ataxin-3 fibrillogenesis involves a polyglutamine-independent step'**, *J Biol Chem*, 281: 16888-96.
- Evers, M. M., H. D. Tran, I. Zalachoras, B. A. Pepers, O. C. Meijer, J. T. den Dunnen, G. J. van Ommen, A. Aartsma-Rus und W. M. van Roon-Mom. 2013. **'Ataxin-3 protein modification as a treatment strategy for spinocerebellar ataxia type 3: removal of the CAG containing exon'**, *Neurobiol Dis*, 58: 49-56.
- Ferini-Strambi, L., G. Carli, F. Casoni und A. Galbiati. 2018. **'Restless Legs Syndrome and Parkinson Disease: A Causal Relationship Between the Two Disorders?'**, *Front Neurol*, 9: 551.
- Fodale, V., R. Boggio, M. Daldin, C. Cariulo, M. C. Spiezia, L. M. Byrne, B. R. Leavitt, E. J. Wild, D. Macdonald, A. Weiss und A. Bresciani. 2017. **'Validation of Ultrasensitive Mutant Huntingtin Detection in Human Cerebrospinal Fluid by Single Molecule Counting Immunoassay'**, *J Huntingtons Dis*, 6: 349-61.
- Freeman, W. und Z. Wszolek. 2005. **'Botulinum toxin type A for treatment of spasticity in spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease)'**, *Mov Disord*, 20: 644.
- Gaspar, C., I. Lopes-Cendes, S. Hayes, J. Goto, K. Arvidsson, A. Dias, I. Silveira, P. Maciel, P. Coutinho, M. Lima, Y. X. Zhou, B. W. Soong, M. Watanabe, P. Giunti, G. Stevanin, O. Riess, H. Sasaki, M. Hsieh, G. A. Nicholson, E. Brunt, J. J. Higgins, M. Lauritzen, L. Tranebjaerg, V. Volpini, N. Wood, L. Ranum, S. Tsuji, A. Brice, J. Sequeiros und G. A. Rouleau. 2001. **'Ancestral origins of the Machado-Joseph disease mutation: a worldwide haplotype study'**, *Am J Hum Genet*, 68: 523-8.
- Geisler, S., K. M. Holmstrom, D. Skujat, F. C. Fiesel, O. C. Rothfuss, P. J. Kahle und W. Springer. 2010. **'PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1'**, *Nat Cell Biol*, 12: 119-31.
- Goto, J., M. Watanabe, Y. Ichikawa, S. B. Yee, N. Ihara, K. Endo, S. Igarashi, Y. Takiyama, C. Gaspar, P. Maciel, S. Tsuji, G. A. Rouleau und I. Kanazawa. 1997. **'Machado-Joseph disease gene products carrying different carboxyl termini'**, *Neurosci Res*, 28: 373-7.
- Greene, A. W., K. Grenier, M. A. Aguilera, S. Muise, R. Farazifard, M. E. Haque, H. M. McBride, D. S. Park und E. A. Fon. 2012. **'Mitochondrial processing peptidase regulates PINK1 processing, import and Parkin recruitment'**, *EMBO Rep*, 13: 378-85.
- Gu, W., H. Ma, K. Wang, M. Jin, Y. Zhou, X. Liu, G. Wang und Y. Shen. 2004. **'The shortest expanded allele of the MJD1 gene in a Chinese MJD kindred with autonomic dysfunction'**, *Eur Neurol*, 52: 107-11.
- Haacke, A., S. A. Broadley, R. Boteva, N. Tzvetkov, F. U. Hartl und P. Breuer. 2006. **'Proteolytic cleavage of polyglutamine-expanded ataxin-3 is critical for aggregation and sequestration of non-expanded ataxin-3'**, *Hum Mol Genet*, 15: 555-68.
- Haacke, A., F. U. Hartl und P. Breuer. 2007. **'Calpain inhibition is sufficient to suppress aggregation of polyglutamine-expanded ataxin-3'**, *J Biol Chem*, 282: 18851-6.

- Hansen, S. K., T. C. Stummann, H. Borland, L. F. Hasholt, Z. Tumer, J. E. Nielsen, M. A. Rasmussen, T. T. Nielsen, J. C. Daechsel, K. Fog und P. Hyttel. 2016. **'Induced pluripotent stem cell - derived neurons for the study of spinocerebellar ataxia type 3'**, *Stem Cell Res*, 17: 306-17.
- Harding, A. E. 1982. **'The clinical features and classification of the late onset autosomal dominant cerebellar ataxias. A study of 11 families, including descendants of the 'the Drew family of Walworth''**, *Brain*, 105: 1-28.
- Harris, G. M., K. Dodelzon, L. Gong, P. Gonzalez-Alegre und H. L. Paulson. 2010. **'Splice isoforms of the polyglutamine disease protein ataxin-3 exhibit similar enzymatic yet different aggregation properties'**, *PLoS One*, 5: e13695.
- Hayashi, M., K. Kobayashi und H. Furuta. 2003. **'Immunohistochemical study of neuronal intranuclear and cytoplasmic inclusions in Machado-Joseph disease'**, *Psychiatry Clin Neurosci*, 57: 205-13.
- Hedrich, K., C. Eskelson, B. Wilmut, K. Marder, J. Harris, J. Garrels, H. Meija-Santana, P. Vieregge, H. Jacobs, S. B. Bressman, A. E. Lang, M. Kann, G. Abbruzzese, P. Martinelli, E. Schwinger, L. J. Ozelius, P. P. Pramstaller, C. Klein und P. Kramer. 2004. **'Distribution, type, and origin of Parkin mutations: review and case studies'**, *Mov Disord*, 19: 1146-57.
- Hershko, A. und A. Ciechanover. 1998. **'The ubiquitin system'**, *Annu Rev Biochem*, 67: 425-79.
- Hsu, J. Y., Y. L. Jhang, P. H. Cheng, Y. F. Chang, S. H. Mao, H. I. Yang, C. W. Lin, C. M. Chen und S. H. Yang. 2017. **'The Truncated C-terminal Fragment of Mutant ATXN3 Disrupts Mitochondria Dynamics in Spinocerebellar Ataxia Type 3 Models'**, *Front Mol Neurosci*, 10: 196.
- Huang, F., L. Zhang, Z. Long, Z. Chen, X. Hou, C. Wang, H. Peng, J. Wang, J. Li, R. Duan, K. Xia, D. M. Chuang, B. Tang und H. Jiang. 2014. **'miR-25 alleviates polyQ-mediated cytotoxicity by silencing ATXN3'**, *FEBS Lett*, 588: 4791-8.
- Hubener, J. und O. Riess. 2010. **'Polyglutamine-induced neurodegeneration in SCA3 is not mitigated by non-expanded ataxin-3: conclusions from double-transgenic mouse models'**, *Neurobiol Dis*, 38: 116-24.
- Hubener, J., J. J. Weber, C. Richter, L. Honold, A. Weiss, F. Murad, P. Breuer, U. Wullner, P. Bellstedt, F. Paquet-Durand, J. Takano, T. C. Saido, O. Riess und H. P. Nguyen. 2013. **'Calpain-mediated ataxin-3 cleavage in the molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3)'**, *Hum Mol Genet*, 22: 508-18.
- Hübl, W. 2018. **'Immunologische Analysen - Fehlerursachen: Der High-Dose-Hook-Effekt bei einem Sandwich-Assay'**, Accessed 05.03.2019. https://www.med4you.at/laborbefunde/techniken/immunologie/lbef_immunologie_fehlerursachen.htm.
- Huynh, D. P., D. R. Scoles, T. H. Ho, M. R. Del Bigio und S. M. Pulst. 2000. **'Parkin is associated with actin filaments in neuronal and nonneuronal cells'**, *Ann Neurol*, 48: 737-44.
- Ichikawa, Y., J. Goto, M. Hattori, A. Toyoda, K. Ishii, S. Y. Jeong, H. Hashida, N. Masuda, K. Ogata, F. Kasai, M. Hirai, P. Maciel, G. A. Rouleau, Y. Sakaki

- und I. Kanazawa. 2001. **'The genomic structure and expression of MJD, the Machado-Joseph disease gene'**, *J Hum Genet*, 46: 413-22.
- Ikeda, H., M. Yamaguchi, S. Sugai, Y. Aze, S. Narumiya und A. Kakizuka. 1996. **'Expanded polyglutamine in the Machado-Joseph disease protein induces cell death in vitro and in vivo'**, *Nat Genet*, 13: 196-202.
- Jacobi, H., S. T. du Montcel, P. Bauer, P. Giunti, A. Cook, R. Labrum, M. H. Parkinson, A. Durr, A. Brice, P. Charles, C. Marelli, C. Mariotti, L. Nanetti, M. Panzeri, M. Rakowicz, A. Sulek, A. Sobanska, T. Schmitz-Hubsch, L. Schols, H. Hengel, L. Baliko, B. Melegh, A. Filla, A. Antenora, J. Infante, J. Berciano, B. P. van de Warrenburg, D. Timmann, S. Szymanski, S. Boesch, J. S. Kang, M. Pandolfo, J. B. Schulz, S. Molho, A. Diallo und T. Klockgether. 2015. **'Long-term disease progression in spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6: a longitudinal cohort study'**, *Lancet Neurol*, 14: 1101-8.
- Jana, N. R., P. Dikshit, A. Goswami, S. Kotliarova, S. Murata, K. Tanaka und N. Nukina. 2005. **'Co-chaperone CHIP associates with expanded polyglutamine protein and promotes their degradation by proteasomes'**, *J Biol Chem*, 280: 11635-40.
- Jardim, L. B., M. L. Pereira, I. Silveira, A. Ferro, J. Sequeiros und R. Giugliani. 2001. **'Neurologic findings in Machado-Joseph disease: relation with disease duration, subtypes, and (CAG)n'**, *Arch Neurol*, 58: 899-904.
- Jardim, L. B., I. Silveira, M. L. Pereira, A. Ferro, I. Alonso, M. do Ceu Moreira, P. Mendonca, F. Ferreirinha, J. Sequeiros und R. Giugliani. 2001. **'A survey of spinocerebellar ataxia in South Brazil - 66 new cases with Machado-Joseph disease, SCA7, SCA8, or unidentified disease-causing mutations'**, *J Neurol*, 248: 870-6.
- Jia, D. D., L. Zhang, Z. Chen, C. R. Wang, F. Z. Huang, R. H. Duan, K. Xia, B. S. Tang und H. Jiang. 2013. **'Lithium chloride alleviates neurodegeneration partly by inhibiting activity of GSK3beta in a SCA3 Drosophila model'**, *Cerebellum*, 12: 892-901.
- Jia, N. L., E. K. Fei, Z. Ying, H. F. Wang und G. H. Wang. 2008. **'PolyQ-expanded ataxin-3 interacts with full-length ataxin-3 in a polyQ length-dependent manner'**, *Neurosci Bull*, 24: 201-8.
- Jiang, H., Q. Jiang und J. Feng. 2004. **'Parkin increases dopamine uptake by enhancing the cell surface expression of dopamine transporter'**, *J Biol Chem*, 279: 54380-6.
- Joch, M., A. R. Ase, C. X. Chen, P. A. MacDonald, M. Kontogiannea, A. T. Corera, A. Brice, P. Seguela und E. A. Fon. 2007. **'Parkin-mediated monoubiquitination of the PDZ protein PICK1 regulates the activity of acid-sensing ion channels'**, *Mol Biol Cell*, 18: 3105-18.
- Kahns, S., S. Lykkebo, L. D. Jakobsen, M. S. Nielsen und P. H. Jensen. 2002. **'Caspase-mediated parkin cleavage in apoptotic cell death'**, *J Biol Chem*, 277: 15303-8.
- Kastelein, J. J., P. T. Sager, E. de Groot und E. Veltri. 2005. **'Comparison of ezetimibe plus simvastatin versus simvastatin monotherapy on atherosclerosis progression in familial hypercholesterolemia. Design and rationale of the Ezetimibe and Simvastatin in**

- Hypercholesterolemia Enhances Atherosclerosis Regression (ENHANCE) trial**, *Am Heart J*, 149: 234-9.
- Kastle, M. und T. Grune. 2012. **'Interactions of the proteasomal system with chaperones: protein triage and protein quality control'**, *Prog Mol Biol Transl Sci*, 109: 113-60.
- Kawaguchi, Y., T. Okamoto, M. Taniwaki, M. Aizawa, M. Inoue, S. Katayama, H. Kawakami, S. Nakamura, M. Nishimura, I. Akiguchi et al. 1994. **'CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1'**, *Nat Genet*, 8: 221-8.
- Khandelwal, P. J. und C. E. Moussa. 2010. **'The Relationship between Parkin and Protein Aggregation in Neurodegenerative Diseases'**, *Front Psychiatry*, 1: 15.
- Kieling, C., P. R. Prestes, M. L. Saraiva-Pereira und L. B. Jardim. 2007. **'Survival estimates for patients with Machado-Joseph disease (SCA3)'**, *Clin Genet*, 72: 543-5.
- Kieling, C., C. R. Rieder, A. C. Silva, J. A. Saute, C. R. Cecchin, T. L. Monte und L. B. Jardim. 2008. **'A neurological examination score for the assessment of spinocerebellar ataxia 3 (SCA3)'**, *Eur J Neurol*, 15: 371-6.
- Kiessling, L. L., J. E. Gestwicki und L. E. Strong. 2000. **'Synthetic multivalent ligands in the exploration of cell-surface interactions'**, *Curr Opin Chem Biol*, 4: 696-703.
- Kitada, T., S. Asakawa, N. Hattori, H. Matsumine, Y. Yamamura, S. Minoshima, M. Yokochi, Y. Mizuno und N. Shimizu. 1998. **'Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism'**, *Nature*, 392: 605-8.
- Klaes, A., E. Reckziegel, M. C. Franca, Jr., T. J. Rezende, L. M. Vedolin, L. B. Jardim und J. A. Saute. 2016. **'MR Imaging in Spinocerebellar Ataxias: A Systematic Review'**, *AJNR Am J Neuroradiol*, 37: 1405-12.
- Klebe, S., Bürk, K. 2012. **'Dominant vererbte zerebelläre Ataxien.'** in W.H. Oertel, Deuschl, G., Poewe, W. (ed.), *Parkinson-Syndrome und andere Bewegungsstörungen* (Georg Thieme Verlag KG: Stuttgart).
- Klein, C., S. A. Schneider und A. E. Lang. 2009. **'Hereditary parkinsonism: Parkinson disease look-alikes--an algorithm for clinicians to "PARK" genes and beyond'**, *Mov Disord*, 24: 2042-58.
- Klinke, I., M. Minnerop, T. Schmitz-Hubsch, M. Hendriks, T. Klockgether, U. Wullner und C. Helmstaedter. 2010. **'Neuropsychological features of patients with spinocerebellar ataxia (SCA) types 1, 2, 3, and 6'**, *Cerebellum*, 9: 433-42.
- Klockgether, T., M. Skalej, D. Wedekind, A. R. Luft, D. Welte, J. B. Schulz, M. Abele, K. Burk, F. Laccone, A. Brice und J. Dichgans. 1998. **'Autosomal dominant cerebellar ataxia type I. MRI-based volumetry of posterior fossa structures and basal ganglia in spinocerebellar ataxia types 1, 2 and 3'**, *Brain*, 121 (Pt 9): 1687-93.
- Koch, P., P. Breuer, M. Peitz, J. Jungverdorben, J. Kesavan, D. Poppe, J. Doerr, J. Ladewig, J. Mertens, T. Tuting, P. Hoffmann, T. Klockgether, B. O. Evert, U. Wullner und O. Brustle. 2011. **'Excitation-induced ataxin-3**

- aggregation in neurons from patients with Machado-Joseph disease**, *Nature*, 480: 543-6.
- Kodali, R. und R. Wetzel. 2007. **'Polymorphism in the intermediates and products of amyloid assembly'**, *Curr Opin Struct Biol*, 17: 48-57.
- Kompaktlexikon der Biologie. 2019. **'Gründereffekt'**, Spektrum Akademischer Verlag, Accessed 24.01.2019. <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie-kompakt/gruendereffekt/5092>.
- Kuroda, Y., T. Mitsui, M. Kunishige, M. Shono, M. Akaike, H. Azuma und T. Matsumoto. 2006. **'Parkin enhances mitochondrial biogenesis in proliferating cells'**, *Hum Mol Genet*, 15: 883-95.
- Lees, A. J., J. Hardy und T. Revesz. 2009. 'Parkinson's disease', *Lancet*, 373: 2055-66.
- Leroi, I., E. O'Hearn, L. Marsh, C. G. Lyketsos, A. Rosenblatt, C. A. Ross, J. Brandt und R. L. Margolis. 2002. **'Psychopathology in patients with degenerative cerebellar diseases: a comparison to Huntington's disease'**, *Am J Psychiatry*, 159: 1306-14.
- Lexikon der Biologie. 2019. **'Antizipation'**, Spektrum Akademischer Verlag, Accessed 24.01.2019. <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/antizipation/4217>.
- Li, L. B., Z. Yu, X. Teng und N. M. Bonini. 2008. **'RNA toxicity is a component of ataxin-3 degeneration in Drosophila'**, *Nature*, 453: 1107-11.
- Lima, M., M. C. Costa, R. Montiel, A. Ferro, C. Santos, C. Silva, C. Bettencourt, A. Sousa, J. Sequeiros, P. Coutinho und P. Maciel. 2005. **'Population genetics of wild-type CAG repeats in the Machado-Joseph disease gene in Portugal'**, *Hum Hered*, 60: 156-63.
- Lima, M. und M. Raposo. 2018. **'Towards the Identification of Molecular Biomarkers of Spinocerebellar Ataxia Type 3 (SCA3)/Machado-Joseph Disease (MJD)'**, *Adv Exp Med Biol*, 1049: 309-19.
- Lucking, C. B., V. Chesneau, E. Lohmann, P. Verpillat, C. Dulac, A. M. Bonnet, F. Gasparini, Y. Agid, A. Durr und A. Brice. 2003. **'Coding polymorphisms in the parkin gene and susceptibility to Parkinson disease'**, *Arch Neurol*, 60: 1253-6.
- Macedo-Ribeiro, S., L. Cortes, P. Maciel und A. L. Carvalho. 2009. **'Nucleocytoplasmic shuttling activity of ataxin-3'**, *PLoS One*, 4: e5834.
- Maciel, P., M. C. Costa, A. Ferro, M. Rousseau, C. S. Santos, C. Gaspar, J. Barros, G. A. Rouleau, P. Coutinho und J. Sequeiros. 2001. **'Improvement in the molecular diagnosis of Machado-Joseph disease'**, *Arch Neurol*, 58: 1821-7.
- Maciel, P., C. Gaspar, A. L. DeStefano, I. Silveira, P. Coutinho, J. Radvany, D. M. Dawson, L. Sudarsky, J. Guimaraes, J. E. Loureiro et al. 1995. **'Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado-Joseph disease'**, *Am J Hum Genet*, 57: 54-61.
- Maciel, P., C. Gaspar, L. Guimaraes, J. Goto, I. Lopes-Cendes, S. Hayes, K. Arvidsson, A. Dias, J. Sequeiros, A. Sousa und G. A. Rouleau. 1999. **'Study of three intragenic polymorphisms in the Machado-Joseph disease gene (MJD1) in relation to genetic instability of the (CAG)n tract'**, *Eur J Hum Genet*, 7: 147-56.

- Maciel, P., I. Lopes-Cendes, S. Kish, J. Sequeiros und G. A. Rouleau. 1997. **'Mosaicism of the CAG repeat in CNS tissue in relation to age at death in spinocerebellar ataxia type 1 and Machado-Joseph disease patients'**, *Am J Hum Genet*, 60: 993-6.
- Maruyama, H., S. Nakamura, Z. Matsuyama, T. Sakai, M. Doyu, G. Sobue, M. Seto, M. Tsujihata, T. Oh-i, T. Nishio und et al. 1995. **'Molecular features of the CAG repeats and clinical manifestation of Machado-Joseph disease'**, *Hum Mol Genet*, 4: 807-12.
- Matos, C. A., L. P. Almeida und C. Nobrega. 2017. **'Proteolytic Cleavage of Polyglutamine Disease-Causing Proteins: Revisiting the Toxic Fragment Hypothesis'**, *Curr Pharm Des*, 23: 753-75.
- Matos, C. A., L. P. de Almeida und C. Nobrega. 2019. **'Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3: lessons from disease pathogenesis and clues into therapy'**, *J Neurochem*, 148: 8-28.
- Matsuda, N., T. Kitami, T. Suzuki, Y. Mizuno, N. Hattori und K. Tanaka. 2006. **'Diverse effects of pathogenic mutations of Parkin that catalyze multiple monoubiquitylation in vitro'**, *J Biol Chem*, 281: 3204-9.
- Mauri, P. L., M. Riva, D. Ambu, A. De Palma, F. Secundo, L. Benazzi, M. Valtorta, P. Tortora und P. Fusi. 2006. **'Ataxin-3 is subject to autolytic cleavage'**, *Febs j*, 273: 4277-86.
- Menzies, F. M., J. Huebener, M. Renna, M. Bonin, O. Riess und D. C. Rubinsztein. 2010. **'Autophagy induction reduces mutant ataxin-3 levels and toxicity in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 3'**, *Brain*, 133: 93-104.
- Mitka, M. 2008. **'Controversies surround heart drug study: questions about Vytorin and trial sponsors' conduct'**, *Jama*, 299: 885-7.
- Moore, D. J., A. B. West, D. A. Dikeman, V. L. Dawson und T. M. Dawson. 2008. **'Parkin mediates the degradation-independent ubiquitination of Hsp70'**, *J Neurochem*, 105: 1806-19.
- Morales Saute, J. A. und L. Bannach Jardim. 2015. **'Machado Joseph disease: clinical and genetic aspects, and current treatment'**, *Expert Opinion on Orphan Drugs*, 3:5: 517-35.
- Munoz, E., M. J. Rey, M. Mila, A. Cardozo, T. Ribalta, E. Tolosa und I. Ferrer. 2002. **'Intranuclear inclusions, neuronal loss and CAG mosaicism in two patients with Machado-Joseph disease'**, *J Neurol Sci*, 200: 19-25.
- Murray, R. Z., L. A. Jolly und S. A. Wood. 2004. **'The FAM deubiquitylating enzyme localizes to multiple points of protein trafficking in epithelia, where it associates with E-cadherin and beta-catenin'**, *Mol Biol Cell*, 15: 1591-9.
- Narendra, D., A. Tanaka, D. F. Suen und R. J. Youle. 2008. **'Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy'**, *J Cell Biol*, 183: 795-803.
- Nascimento-Ferreira, I., C. Nobrega, A. Vasconcelos-Ferreira, I. Onofre, D. Albuquerque, C. Avelaira, H. Hirai, N. Deglon und L. Pereira de Almeida. 2013. **'Beclin 1 mitigates motor and neuropathological deficits in genetic mouse models of Machado-Joseph disease'**, *Brain*, 136: 2173-88.

- Nascimento-Ferreira, I., T. Santos-Ferreira, L. Sousa-Ferreira, G. Auregan, I. Onofre, S. Alves, N. Dufour, V. F. Colomer Gould, A. Koeppen, N. Deglon und L. Pereira de Almeida. 2011. **'Overexpression of the autophagic beclin-1 protein clears mutant ataxin-3 and alleviates Machado-Joseph disease'**, *Brain*, 134: 1400-15.
- National Cancer Institute. 2019. **'primary endpoint'**, Accessed 04.02.2019. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/primary-endpoint?redirect=true>.
- NeurOmics. 2012. **"Annex I - „Description of Work“."** In.
- . 2019a. **'About the project'**, NeurOmics, Accessed 21.01.2019. <https://rd-neuromics.eu/about-the-project/>.
- . 2019b. **'Project partners'**, Accessed 21.01.2019. <https://rd-neuromics.eu/project-partners/>.
- . 2019c. **'Workpackage 4: Identification of hypothesis-driven biomarkers for disease progression'**, Accessed 21.01.2019. <https://rd-neuromics.eu/workpackage/wp4/>.
- Nguyen, H. P., J. Hubener, J. J. Weber, S. Grueninger, O. Riess und A. Weiss. 2013. **'Cerebellar soluble mutant ataxin-3 level decreases during disease progression in Spinocerebellar Ataxia Type 3 mice'**, *PLoS One*, 8: e62043.
- Nijman, S. M., M. P. Luna-Vargas, A. Velds, T. R. Brummelkamp, A. M. Dirac, T. K. Sixma und R. Bernards. 2005. **'A genomic and functional inventory of deubiquitinating enzymes'**, *Cell*, 123: 773-86.
- Nobrega, C., S. Carmo-Silva, D. Albuquerque, A. Vasconcelos-Ferreira, U. G. Vijayakumar, L. Mendonca, H. Hirai und L. P. de Almeida. 2015. **'Re-establishing ataxin-2 downregulates translation of mutant ataxin-3 and alleviates Machado-Joseph disease'**, *Brain*, 138: 3537-54.
- Nobrega, C., I. Nascimento-Ferreira, I. Onofre, D. Albuquerque, H. Hirai, N. Deglon und L. P. de Almeida. 2013. **'Silencing mutant ataxin-3 rescues motor deficits and neuropathology in Machado-Joseph disease transgenic mice'**, *PLoS One*, 8: e52396.
- Orr, H. T. und H. Y. Zoghbi. 2007. **'Trinucleotide repeat disorders'**, *Annu Rev Neurosci*, 30: 575-621.
- Ouyang, H., Y. O. Ali, M. Ravichandran, A. Dong, W. Qiu, F. MacKenzie, S. Dhe-Paganon, C. H. Arrowsmith und R. G. Zhai. 2012. **'Protein aggregates are recruited to aggresome by histone deacetylase 6 via unanchored ubiquitin C termini'**, *J Biol Chem*, 287: 2317-27.
- Padiath, Q. S., A. K. Srivastava, S. Roy, S. Jain und S. K. Brahmachari. 2005. **'Identification of a novel 45 repeat unstable allele associated with a disease phenotype at the MJD1/SCA3 locus'**, *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 133b: 124-6.
- Pankiv, S., T. H. Clausen, T. Lamark, A. Brech, J. A. Bruun, H. Outzen, A. Overvatn, G. Bjorkoy und T. Johansen. 2007. **'p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy'**, *J Biol Chem*, 282: 24131-45.
- Paulson, H. L., S. S. Das, P. B. Crino, M. K. Perez, S. C. Patel, D. Gotsdiner, K. H. Fischbeck und R. N. Pittman. 1997. **'Machado-Joseph disease gene**

- product is a cytoplasmic protein widely expressed in brain'**, *Ann Neurol*, 41: 453-62.
- Paulson, H. L., M. K. Perez, Y. Trottier, J. Q. Trojanowski, S. H. Subramony, S. S. Das, P. Vig, J. L. Mandel, K. H. Fischbeck und R. N. Pittman. 1997. **'Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinocerebellar ataxia type 3'**, *Neuron*, 19: 333-44.
- Peng, H., C. Wang, Z. Chen, Z. Sun, B. Jiao, K. Li, F. Huang, X. Hou, J. Wang, L. Shen, K. Xia, B. Tang und H. Jiang. 2014. **'APOE epsilon2 allele may decrease the age at onset in patients with spinocerebellar ataxia type 3 or Machado-Joseph disease from the Chinese Han population'**, *Neurobiol Aging*, 35: 2179.e15-8.
- Pozzi, C., M. Valtorta, G. Tedeschi, E. Galbusera, V. Pastori, A. Bigi, S. Nonnis, E. Grassi und P. Fusi. 2008. **'Study of subcellular localization and proteolysis of ataxin-3'**, *Neurobiol Dis*, 30: 190-200.
- Prabhu, Sneha. 2015. **'Scale for Assessment and Rating of Ataxia'**, Accessed 24.01.2019. <https://www.sralab.org/rehabilitation-measures/scale-assessment-and-rating-ataxia>.
- Raposo, M., C. Bettencourt, P. Maciel, F. Gao, A. Ramos, N. Kazachkova, J. Vasconcelos, T. Kay, A. J. Rodrigues, B. Bettencourt, J. Bruges-Armas, D. Geschwind, G. Coppola und M. Lima. 2015. **'Novel candidate blood-based transcriptional biomarkers of Machado-Joseph disease'**, *Mov Disord*, 30: 968-75.
- Raposo, M., C. Bettencourt, A. Ramos, N. Kazachkova, J. Vasconcelos, T. Kay, J. Bruges-Armas und M. Lima. 2017. **'Promoter Variation and Expression Levels of Inflammatory Genes IL1A, IL1B, IL6 and TNF in Blood of Spinocerebellar Ataxia Type 3 (SCA3) Patients'**, *Neuromolecular Med*, 19: 41-45.
- Ravikumar, B., R. Duden und D. C. Rubinsztein. 2002. **'Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy'**, *Hum Mol Genet*, 11: 1107-17.
- Reina, C. P., X. Zhong und R. N. Pittman. 2010. **'Proteotoxic stress increases nuclear localization of ataxin-3'**, *Hum Mol Genet*, 19: 235-49.
- Ribbeck, K. und D. Gorlich. 2002. **'The permeability barrier of nuclear pore complexes appears to operate via hydrophobic exclusion'**, *Embo j*, 21: 2664-71.
- Riess, O., U. Rub, A. Pastore, P. Bauer und L. Schols. 2008. **'SCA3: neurological features, pathogenesis and animal models'**, *Cerebellum*, 7: 125-37.
- Ristori, G., S. Romano, A. Visconti, S. Cannoni, M. Spadaro, M. Frontali, F. E. Pontieri, N. Vanacore und M. Salvetti. 2010. **'Riluzole in cerebellar ataxia: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot trial'**, *Neurology*, 74: 839-45.
- Ros, R., I. Ampuero und J. Garcia de Yebenes. 2008. **'Parkin polymorphisms in progressive supranuclear palsy'**, *J Neurol Sci*, 268: 176-8.
- Rosenberg, R. N. 1992. **'Machado-Joseph disease: an autosomal dominant motor system degeneration'**, *Mov Disord*, 7: 193-203.

- Rosser, M. F., E. Washburn, P. J. Muchowski, C. Patterson und D. M. Cyr. 2007. **'Chaperone functions of the E3 ubiquitin ligase CHIP'**, *J Biol Chem*, 282: 22267-77.
- Rub, U., E. R. Brunt und T. Deller. 2008. **'New insights into the pathoanatomy of spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease)'**, *Curr Opin Neurol*, 21: 111-6.
- Rub, U., L. Schols, H. Paulson, G. Auburger, P. Kermer, J. C. Jen, K. Seidel, H. W. Korf und T. Deller. 2013. **'Clinical features, neurogenetics and neuropathology of the polyglutamine spinocerebellar ataxias type 1, 2, 3, 6 and 7'**, *Prog Neurobiol*, 104: 38-66.
- Safadi, S. S. und G. S. Shaw. 2010. **'Differential interaction of the E3 ligase parkin with the proteasomal subunit S5a and the endocytic protein Eps15'**, *J Biol Chem*, 285: 1424-34.
- Sakai, T., T. Matsuishi, S. Yamada, H. Komori und H. Iwashita. 1995. **'Sulfamethoxazole-trimethoprim double-blind, placebo-controlled, crossover trial in Machado-Joseph disease: sulfamethoxazole-trimethoprim increases cerebrospinal fluid level of biopterin'**, *J Neural Transm Gen Sect*, 102: 159-72.
- Santana, M. M. 2016. **"ESMI: Manual for Biosample collection."** In.
- Sasaki, H., A. Wakisaka, T. Fukazawa, K. Iwabuchi, T. Hamada, A. Takada, E. Mukai, T. Matsuura, T. Yoshiki und K. Tashiro. 1995. **'CAG repeat expansion of Machado-Joseph disease in the Japanese: analysis of the repeat instability for parental transmission, and correlation with disease phenotype'**, *J Neurol Sci*, 133: 128-33.
- Saute, J. A., K. C. Donis, C. Serrano-Munuera, D. Genis, L. T. Ramirez, P. Mazzetti, L. V. Perez, P. Latorre, J. Sequeiros, A. Matilla-Duenas und L. B. Jardim. 2012. **'Ataxia rating scales--psychometric profiles, natural history and their application in clinical trials'**, *Cerebellum*, 11: 488-504.
- Saute, J. A. M. und L. B. Jardim. 2018. **'Planning Future Clinical Trials for Machado-Joseph Disease'**, *Adv Exp Med Biol*, 1049: 321-48.
- Saute, J. A., C. R. Rieder, R. M. Castilhos, T. L. Monte, A. F. Schumacher-Schuh, K. C. Donis, R. D'Avila, G. N. Souza, A. D. Russo, G. V. Furtado, T. C. Gheno, D. O. Souza, M. L. Saraiva-Pereira, L. V. Portela, S. Camey, V. B. Torman und L. B. Jardim. 2015. **'Planning future clinical trials in Machado Joseph disease: Lessons from a phase 2 trial'**, *J Neurol Sci*, 358: 72-6.
- Saute, J. A., A. C. Silva, G. N. Souza, A. D. Russo, K. C. Donis, L. Vedolin, M. L. Saraiva-Pereira, L. V. Portela und L. B. Jardim. 2012. **'Body mass index is inversely correlated with the expanded CAG repeat length in SCA3/MJD patients'**, *Cerebellum*, 11: 771-4.
- Scaglione, K. M., E. Zavodszky, S. V. Todi, S. Patury, P. Xu, E. Rodriguez-Lebron, S. Fischer, J. Konen, A. Djarmati, J. Peng, J. E. Gestwicki und H. L. Paulson. 2011. **'Ube2w and ataxin-3 coordinately regulate the ubiquitin ligase CHIP'**, *Mol Cell*, 43: 599-612.
- Schmidt, T., G. B. Landwehrmeyer, I. Schmitt, Y. Trottier, G. Auburger, F. Laccone, T. Klockgether, M. Volpel, J. T. Epplen, L. Schols und O. Riess. 1998. **'An isoform of ataxin-3 accumulates in the nucleus of neuronal**

- cells in affected brain regions of SCA3 patients'**, *Brain Pathol*, 8: 669-79.
- Schmitz-Hubsch, T., M. Coudert, P. Bauer, P. Giunti, C. Globas, L. Baliko, A. Filla, C. Mariotti, M. Rakowicz, P. Charles, P. Ribai, S. Szymanski, J. Infante, B. P. van de Warrenburg, A. Durr, D. Timmann, S. Boesch, R. Fancellu, R. Rola, C. Depondt, L. Schols, E. Zdienicka, J. S. Kang, S. Dohlinger, B. Kremer, D. A. Stephenson, B. Melegh, M. Pandolfo, S. di Donato, S. T. du Montcel und T. Klockgether. 2008. **'Spinocerebellar ataxia types 1, 2, 3, and 6: disease severity and nonataxia symptoms'**, *Neurology*, 71: 982-9.
- Schmitz-Hubsch, T., S. T. du Montcel, L. Baliko, J. Berciano, S. Boesch, C. Depondt, P. Giunti, C. Globas, J. Infante, J. S. Kang, B. Kremer, C. Mariotti, B. Melegh, M. Pandolfo, M. Rakowicz, P. Ribai, R. Rola, L. Schols, S. Szymanski, B. P. van de Warrenburg, A. Durr, T. Klockgether und R. Fancellu. 2006. **'Scale for the assessment and rating of ataxia: development of a new clinical scale'**, *Neurology*, 66: 1717-20.
- Schmitz-Hubsch, T., R. Fimmers, M. Rakowicz, R. Rola, E. Zdzienicka, R. Fancellu, C. Mariotti, C. Linnemann, L. Schols, D. Timmann, A. Filla, E. Salvatore, J. Infante, P. Giunti, R. Labrum, B. Kremer, B. P. van de Warrenburg, L. Baliko, B. Melegh, C. Depondt, J. Schulz, S. T. du Montcel und T. Klockgether. 2010. **'Responsiveness of different rating instruments in spinocerebellar ataxia patients'**, *Neurology*, 74: 678-84.
- Schols, L., G. Amoiridis, T. Buttner, H. Przuntek, J. T. Epplen und O. Riess. 1997. **'Autosomal dominant cerebellar ataxia: phenotypic differences in genetically defined subtypes?'**, *Ann Neurol*, 42: 924-32.
- Schols, L., P. Bauer, T. Schmidt, T. Schulte und O. Riess. 2004. **'Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis'**, *Lancet Neurol*, 3: 291-304.
- Schols, L., J. Haan, O. Riess, G. Amoiridis und H. Przuntek. 1998. **'Sleep disturbance in spinocerebellar ataxias: is the SCA3 mutation a cause of restless legs syndrome?'**, *Neurology*, 51: 1603-7.
- Schols, L., M. Reimold, K. Seidel, C. Globas, K. Brockmann, T. K. Hauser, G. Auburger, K. Burk, W. den Dunnen, G. Reischl, H. W. Korf, E. R. Brunt und U. Rub. 2015. **'No parkinsonism in SCA2 and SCA3 despite severe neurodegeneration of the dopaminergic substantia nigra'**, *Brain*, 138: 3316-26.
- Schon, E. A. und G. Manfredi. 2003. **'Neuronal degeneration and mitochondrial dysfunction'**, *J Clin Invest*, 111: 303-12.
- Schuler-Faccini, L., C. M. Osorio, F. Romariz, M. Paneque, J. Sequeiros und L. B. Jardim. 2014. **'Genetic counseling and presymptomatic testing programs for Machado-Joseph Disease: lessons from Brazil and Portugal'**, *Genet Mol Biol*, 37: 263-70.
- Schulte, T., R. Mattern, K. Berger, S. Szymanski, P. Klotz, P. H. Kraus, H. Przuntek und L. Schols. 2001. **'Double-blind crossover trial of trimethoprim-sulfamethoxazole in spinocerebellar ataxia type 3/Machado-Joseph disease'**, *Arch Neurol*, 58: 1451-7.

- Seidel, K., W. F. den Dunnen, C. Schultz, H. Paulson, S. Frank, R. A. de Vos, E. R. Brunt, T. Deller, H. H. Kampinga und U. Rub. 2010. **'Axonal inclusions in spinocerebellar ataxia type 3'**, *Acta Neuropathol*, 120: 449-60.
- Sen, N. E., J. Drost, S. Gispert, S. Torres-Odio, E. Damrath, M. Klinkenberg, H. Hamzeiy, G. Akdal, H. Gulluoglu, A. N. Basak und G. Auburger. 2016. **'Search for SCA2 blood RNA biomarkers highlights Ataxin-2 as strong modifier of the mitochondrial factor PINK1 levels'**, *Neurobiol Dis*, 96: 115-26.
- Sequeiros, J. und P. Coutinho. 1993. **'Epidemiology and clinical aspects of Machado-Joseph disease'**, *Adv Neurol*, 61: 139-53.
- Sequeiros, J., S. Martins und I. Silveira. 2012. **'Epidemiology and population genetics of degenerative ataxias'**, *Handb Clin Neurol*, 103: 227-51.
- Sequeiros, J., S. Seneca und J. Martindale. 2010. **'Consensus and controversies in best practices for molecular genetic testing of spinocerebellar ataxias'**, *Eur J Hum Genet*, 18: 1188-95.
- Shibata-Hamaguchi, A., C. Ishida, K. Iwasa und M. Yamada. 2009. **'Prevalence of spinocerebellar degenerations in the Hokuriku district in Japan'**, *Neuroepidemiology*, 32: 176-83.
- Shimura, H., N. Hattori, Si Kubo, Y. Mizuno, S. Asakawa, S. Minoshima, N. Shimizu, K. Iwai, T. Chiba, K. Tanaka und T. Suzuki. 2000. **'Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase'**, *Nat Genet*, 25: 302-5.
- Simoes, A. T., N. Goncalves, A. Koeppen, N. Deglon, S. Kugler, C. B. Duarte und L. Pereira de Almeida. 2012. **'Calpastatin-mediated inhibition of calpains in the mouse brain prevents mutant ataxin 3 proteolysis, nuclear localization and aggregation, relieving Machado-Joseph disease'**, *Brain*, 135: 2428-39.
- Soong, B. W. und R. S. Liu. 1998. **'Positron emission tomography in asymptomatic gene carriers of Machado-Joseph disease'**, *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 64: 499-504.
- Sowa, A. S., E. Martin, I. M. Martins, J. Schmidt, R. Depping, J. J. Weber, F. Rother, E. Hartmann, M. Bader, O. Riess, H. Tricoire und T. Schmidt. 2018. **'Karyopherin alpha-3 is a key protein in the pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 3 controlling the nuclear localization of ataxin-3'**, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115: E2624-e33.
- Strecker, Franziska. 2011. **'Biomarker – Wegweiser in Diagnostik und Therapie'**, Accessed 04.02.2019. <https://www.gesundheitsindustriew.de/de/fachbeitrag/aktuell/biomarker-wegweiser-in-diagnostik-und-therapie/>.
- Strimbu, K. und J. A. Tavel. 2010. **'What are biomarkers?'**, *Curr Opin HIV AIDS*, 5: 463-6.
- Subramony, S. H. und R. D. Currier. 1996. **'Intrafamilial variability in Machado-Joseph disease'**, *Mov Disord*, 11: 741-3.
- Tait, D., M. Riccio, A. Sittler, E. Scherzinger, S. Santi, A. Ognibene, N. M. Maraldi, H. Lehrach und E. E. Wanker. 1998. **'Ataxin-3 is transported into the nucleus and associates with the nuclear matrix'**, *Hum Mol Genet*, 7: 991-7.

- Takiyama, Y., M. Nishizawa, H. Tanaka, S. Kawashima, H. Sakamoto, Y. Karube, H. Shimazaki, M. Soutome, K. Endo, S. Ohta et al. 1993. **'The gene for Machado-Joseph disease maps to human chromosome 14q'**, *Nat Genet*, 4: 300-4.
- Takiyama, Y., K. Sakoe, I. Nakano und M. Nishizawa. 1997. **'Machado-Joseph disease: cerebellar ataxia and autonomic dysfunction in a patient with the shortest known expanded allele (56 CAG repeat units) of the MJD1 gene'**, *Neurology*, 49: 604-6.
- Tanaka, A., M. M. Cleland, S. Xu, D. P. Narendra, D. F. Suen, M. Karbowski und R. J. Youle. 2010. **'Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin'**, *J Cell Biol*, 191: 1367-80.
- Taroni, F. und S. DiDonato. 2004. **'Pathways to motor incoordination: the inherited ataxias'**, *Nat Rev Neurosci*, 5: 641-55.
- Tate, J. und G. Ward. 2004. **'Interferences in immunoassay'**, *Clin Biochem Rev*, 25: 105-20.
- Todi, S. V., M. N. Laco, B. J. Winborn, S. M. Travis, H. M. Wen und H. L. Paulson. 2007. **'Cellular turnover of the polyglutamine disease protein ataxin-3 is regulated by its catalytic activity'**, *J Biol Chem*, 282: 29348-58.
- Todi, S. V., K. M. Scaglione, J. R. Blount, V. Basrur, K. P. Conlon, A. Pastore, K. Elenitoba-Johnson und H. L. Paulson. 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: 39303-13.
- Toonen, L. J. A., M. Overzier, M. M. Evers, L. G. Leon, S. A. J. van der Zeeuw, H. Mei, S. M. Kielbasa, J. J. Goeman, K. M. Hettne, O. T. Magnusson, M. Poirel, A. Seyer, P. A. C. t Hoen und W. M. C. van Roon-Mom. 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: 31.
- Toonen, L. J. A., F. Rigo, H. van Attikum und W. M. C. van Roon-Mom. 2017. **'Antisense Oligonucleotide-Mediated Removal of the Polyglutamine Repeat in Spinocerebellar Ataxia Type 3 Mice'**, *Mol Ther Nucleic Acids*, 8: 232-42.
- Toonen, L. J., I. Schmidt, M. S. Luijsterburg, H. van Attikum und W. M. van Roon-Mom. 2016. **'Antisense oligonucleotide-mediated exon skipping as a strategy to reduce proteolytic cleavage of ataxin-3'**, *Sci Rep*, 6: 35200.
- Trottier, Y., G. Cancel, I. An-Gourfinkel, Y. Lutz, C. Weber, A. Brice, E. Hirsch und J. L. Mandel. 1998. **'Heterogeneous intracellular localization and expression of ataxin-3'**, *Neurobiol Dis*, 5: 335-47.
- Trouillas, P., T. Takayanagi, M. Hallett, R. D. Currier, S. H. Subramony, K. Wessel, A. Bryer, H. C. Diener, S. Massaquoi, C. M. Gomez, P. Coutinho, M. Ben Hamida, G. Campanella, A. Filla, L. Schut, D. Timann, J. Honnorat, N. Nighoghossian und B. Manyam. 1997. **'International Cooperative Ataxia Rating Scale for pharmacological assessment of the cerebellar syndrome. The Ataxia Neuropharmacology Committee of the World Federation of Neurology'**, *J Neurol Sci*, 145: 205-11.

- Tsai, Y. C., P. S. Fishman, N. V. Thakor und G. A. Oyler. 2003. **'Parkin facilitates the elimination of expanded polyglutamine proteins and leads to preservation of proteasome function'**, *J Biol Chem*, 278: 22044-55.
- Tsoi, H., C. K. Lau, K. F. Lau und H. Y. Chan. 2011. **'Perturbation of U2AF65/NXF1-mediated RNA nuclear export enhances RNA toxicity in polyQ diseases'**, *Hum Mol Genet*, 20: 3787-97.
- Uchihara, T., H. Fujigasaki, S. Koyano, A. Nakamura, S. Yagishita und K. Iwabuchi. 2001. **'Non-expanded polyglutamine proteins in intranuclear inclusions of hereditary ataxias--triple-labeling immunofluorescence study'**, *Acta Neuropathol*, 102: 149-52.
- Vale, J., P. Bugalho, I. Silveira, J. Sequeiros, J. Guimaraes und P. Coutinho. 2010. **'Autosomal dominant cerebellar ataxia: frequency analysis and clinical characterization of 45 families from Portugal'**, *Eur J Neurol*, 17: 124-8.
- van de Warrenburg, B. P., J. van Gaalen, S. Boesch, J. M. Burgunder, A. Durr, P. Giunti, T. Klockgether, C. Mariotti, M. Pandolfo und O. Riess. 2014. **'EFNS/ENS Consensus on the diagnosis and management of chronic ataxias in adulthood'**, *Eur J Neurol*, 21: 552-62.
- Vaught, J. B. 2006. **'Blood collection, shipment, processing, and storage'**, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 15: 1582-4.
- Verhoef, L. G., K. Lindsten, M. G. Masucci und N. P. Dantuma. 2002. **'Aggregate formation inhibits proteasomal degradation of polyglutamine proteins'**, *Hum Mol Genet*, 11: 2689-700.
- VWR Chemicals. 2019. **'DNA-Leiter Mix, peqGOLD'**, Accessed 21.01.2019. <https://de.vwr.com/store/product/16889417/dna-leiter-mix-peqgold>.
- Wang, H., Z. Ying und G. Wang. 2012. **'Ataxin-3 regulates aggresome formation of copper-zinc superoxide dismutase (SOD1) by editing K63-linked polyubiquitin chains'**, *J Biol Chem*, 287: 28576-85.
- Wang, L. C., K. Y. Chen, H. Pan, C. C. Wu, P. H. Chen, Y. T. Liao, C. Li, M. L. Huang und K. M. Hsiao. 2011. **'Muscleblind participates in RNA toxicity of expanded CAG and CUG repeats in Caenorhabditis elegans'**, *Cell Mol Life Sci*, 68: 1255-67.
- Warrick, J. M., H. L. Paulson, G. L. Gray-Board, Q. T. Bui, K. H. Fischbeck, R. N. Pittman und N. M. Bonini. 1998. **'Expanded polyglutamine protein forms nuclear inclusions and causes neural degeneration in Drosophila'**, *Cell*, 93: 939-49.
- Weber, J. J., M. Golla, G. Guaitoli, P. Wanichawan, S. N. Hayer, S. Hauser, A. C. Krahl, M. Nagel, S. Samer, E. Aronica, C. R. Carlson, L. Schols, O. Riess, C. J. Gloeckner, H. P. Nguyen und J. Hubener-Schmid. 2017. **'A combinatorial approach to identify calpain cleavage sites in the Machado-Joseph disease protein ataxin-3'**, *Brain*, 140: 1280-99.
- Weber, J. J., A. S. Sowa, T. Binder und J. Hubener. 2014. **'From pathways to targets: understanding the mechanisms behind polyglutamine disease'**, *Biomed Res Int*, 2014: 701758.
- Weber, Jonasz Jeremiasz. 2011. **"Analyse der Rolle von Parkin in der Pathogenese der Spinocerebellären Ataxie Typ 3."** In, 127. Tübingen: Eberhard- Karls- Universität Tübingen.

- Weishaupt, D., J. Schneider, B. Peixoto Pinheiro, C. Ruess, S. M. Dold, F. von Zweydorf, C. J. Gloeckner, J. Schmidt, O. Riess und T. Schmidt. 2019. **'Physiological and pathophysiological characteristics of ataxin-3 isoforms'**, *J Biol Chem*, 294: 644-61.
- Wellington, C. L., L. M. Ellerby, A. S. Hackam, R. L. Margolis, M. A. Trifiro, R. Singaraja, K. McCutcheon, G. S. Salvesen, S. S. Propp, M. Bromm, K. J. Rowland, T. Zhang, D. Rasper, S. Roy, N. Thornberry, L. Pinsky, A. Kakizuka, C. A. Ross, D. W. Nicholson, D. E. Bredesen und M. R. Hayden. 1998. **'Caspase cleavage of gene products associated with triplet expansion disorders generates truncated fragments containing the polyglutamine tract'**, *J Biol Chem*, 273: 9158-67.
- Wilke, C., F. Bender, S. N. Hayer, K. Brockmann, L. Schols, J. Kuhle und M. Synofzik. 2018. **'Serum neurofilament light is increased in multiple system atrophy of cerebellar type and in repeat-expansion spinocerebellar ataxias: a pilot study'**, *J Neurol*, 265: 1618-24.
- Williams, A. J., T. M. Knutson, V. F. Colomer Gould und H. L. Paulson. 2009. **'In vivo suppression of polyglutamine neurotoxicity by C-terminus of Hsp70-interacting protein (CHIP) supports an aggregation model of pathogenesis'**, *Neurobiol Dis*, 33: 342-53.
- Winborn, B. J., S. M. Travis, S. V. Todi, K. M. Scaglione, P. Xu, A. J. Williams, R. E. Cohen, J. Peng und H. L. Paulson. 2008. **'The deubiquitinating enzyme ataxin-3, a polyglutamine disease protein, edits Lys63 linkages in mixed linkage ubiquitin chains'**, *J Biol Chem*, 283: 26436-43.
- Wu, C., D. B. Chen, L. Feng, X. X. Zhou, J. W. Zhang, H. J. You, X. L. Liang, Z. Pei und X. H. Li. 2017. **'Oculomotor deficits in spinocerebellar ataxia type 3: Potential biomarkers of preclinical detection and disease progression'**, *CNS Neurosci Ther*, 23: 321-28.
- Yamada, M., T. Sato, S. Tsuji und H. Takahashi. 2008. **'CAG repeat disorder models and human neuropathology: similarities and differences'**, *Acta Neuropathol*, 115: 71-86.
- Yi, J., L. Zhang, B. Tang, W. Han, Y. Zhou, Z. Chen, D. Jia und H. Jiang. 2013. **'Sodium valproate alleviates neurodegeneration in SCA3/MJD via suppressing apoptosis and rescuing the hypoacetylation levels of histone H3 and H4'**, *PLoS One*, 8: e54792.
- Yorimitsu, T. und D. J. Klionsky. 2005. **'Autophagy: molecular machinery for self-eating'**, *Cell Death Differ*, 12 Suppl 2: 1542-52.
- Yoshida, H., T. Yoshizawa, F. Shibasaki, S. Shoji und I. Kanazawa. 2002. **'Chemical chaperones reduce aggregate formation and cell death caused by the truncated Machado-Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch'**, *Neurobiol Dis*, 10: 88-99.
- Yoshizawa, T., Y. Yamagishi, N. Koseki, J. Goto, H. Yoshida, F. Shibasaki, S. Shoji und I. Kanazawa. 2000. **'Cell cycle arrest enhances the in vitro cellular toxicity of the truncated Machado-Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch'**, *Hum Mol Genet*, 9: 69-78.
- Yu, Y. C., C. L. Kuo, W. L. Cheng, C. S. Liu und M. Hsieh. 2009. **'Decreased antioxidant enzyme activity and increased mitochondrial DNA**

- damage in cellular models of Machado-Joseph disease', *J Neurosci Res*, 87: 1884-91.**
- Zhang, Y., J. Gao, K. K. Chung, H. Huang, V. L. Dawson und T. M. Dawson. 2000. **'Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin- protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 13354-9.**

Anhang

Bestandteil von *Task 2* des *Workpackage 4* in *NeurOmics* war neben den Messungen der Level des Parkin-Proteins die Messung der Level des α -Synuclein-Proteins. Da bislang keine molekulare Interaktion des Ataxin-3-Proteins mit α -Synuclein beschrieben wurde, waren die Ergebnisse nicht Bestandteil der Promotion und werden exemplarisch dargestellt.

Vergleich der Kontroll-, RISCA- und SCA3-Patienten-Kohorte

Die Messung der α -Synuclein-Protein-Level erfolgte wie bei den anderen Proteinen dieser Promotionen über einen spezifischen TR-FRET-Assay in lysierten Lymphozytenproben.

Ob die Expression von α -Synuclein bei SCA3-Patienten und präsymptomatischen Mutationsträgern verändert ist, wurde durch eine Kohortenanalyse überprüft. Tendenziell zeigte die RISCA-Kohorte die niedrigsten Proteinlevel und die Kohorten der Kontrollen und SCA3-Patienten eine breite Streuung. AX 3 wurde wegen einer Bradykinese in seinem Krankheitsverlauf mit Levodopa behandelt und hatte das zweithöchste α -Synuclein-Proteinlevel (Abbildung A).

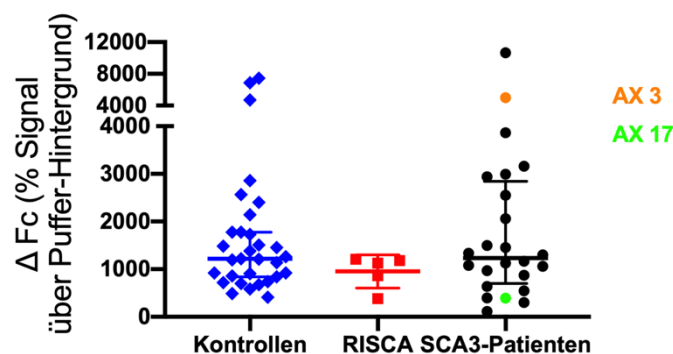


Abbildung A: Korrelation des α -Synuclein-Proteins mit dem Erkrankungsstatus

Aufgetragen wurden die Kohorten der Kontrollen, RISCA und SCA3-Patienten gegen das gemessene ΔFc -Signal des α -Synuclein-Proteins. Nach Ermittlung einer Normalverteilung stellte die dicke horizontale Mittellinie das arithmetische Mittel bzw. den Median und die beiden dünnen Linien ober- und unterhalb die SD bzw. den IQA dar. Zwischen den einzelnen Kohorten ließ sich kein signifikanter Unterschied der α -Synuclein-Protein-Expression berechnen. Zudem zeigten sich die Messwerte der Kontroll- und SCA3-Patienten-Kohorte stark gestreut. AX 3 hatte das zweithöchste gemessene Level der SCA3-Patienten. Er zeigte in seinem Krankheitsverlauf eine Bradykinese. AX 17, der an einem Parkinson-assoziierten RLS litt, hatte einen Messwert im unteren Bereich.

Korrelation des α -Synuclein-Proteins mit den klinischen Parametern

Für α -Synuclein sollten ein möglicher Einsatz als Verlaufsbiomarker in therapeutischen RCTs und die Abbildung der präsymptomatischen Phase geprüft werden. Hierfür wurden statistische Auswertungen für mögliche Korrelationen mit klinischen Parametern durchgeführt. Eine Signifikanz errechnete sich in keiner der Auswertungen. Durch die breite Streuung war die Einschätzung möglicher Tendenzen schwierig. Gering höhere Werte zeigten sich für ein AAO von ≥ 45 Jahren (Abbildung B.a), einer Krankheitsdauer von ≥ 10 Jahren (Abbildung B.c) und einer CSDP von $\leq 1,8$ SARA-Score-Punkten pro Erkrankungsjahr (Abbildung B.g). Für die Krankheitsdauer ließ sich eine tendenzielle PLK des α -Synuclein-Protein-Level feststellen (Abbildung B.d).

Es konnten zusammenfassend für Parameter eines milden Krankheitsverlaufs hohe α -Synuclein-Protein-Level gemessen werden. Das Alter der SCA3-Patienten kann trotz fehlender Signifikanz eine Einflussgröße auf α -Synuclein-Protein-Level sein. Hierfür sprechen die tendenziell niedrigen Messwerte der RISCA-Kohorte.

Kontrollstudie: Einfluss von Nahrungsaufnahme und der verwendeten Blutröhrchensysteme

In zwei Kontrollstudien wurden der Einfluss von Nahrung und verschiedener Blutröhrchensysteme auf die Messwerte der α -Synuclein-Protein-Level geprüft. In der ersten Studie zeigte sich nach der Nahrungsaufnahme eine signifikante Abnahme der Messwerte in den Lymphozytenproben aus CPDA (p-Wert: 0,0020) (Abbildung C.a) und EDTA-Röhrchen (p-Wert: 0,0020) (Abbildung C.b). Diese Dynamik konnte in der zweiten Kontrollstudie mit Teilnahme anderer Kontrollen als Tendenz bestätigt werden. Statt der EDTA-Röhrchen wurden CPT-Röhrchen im Vergleich mit den CPDA-Röhrchen verwendet. Das gemessene ΔFc -Signal des α -Synuclein-Proteins der Proben aus den CPT-Röhrchen war zu beiden Messzeitpunkten signifikant höher als das der CPDA-Röhrchen (nüchtern p-Wert: 0,0022; nicht nüchtern p-Wert: 0,0043) (Abbildung C.c,d).

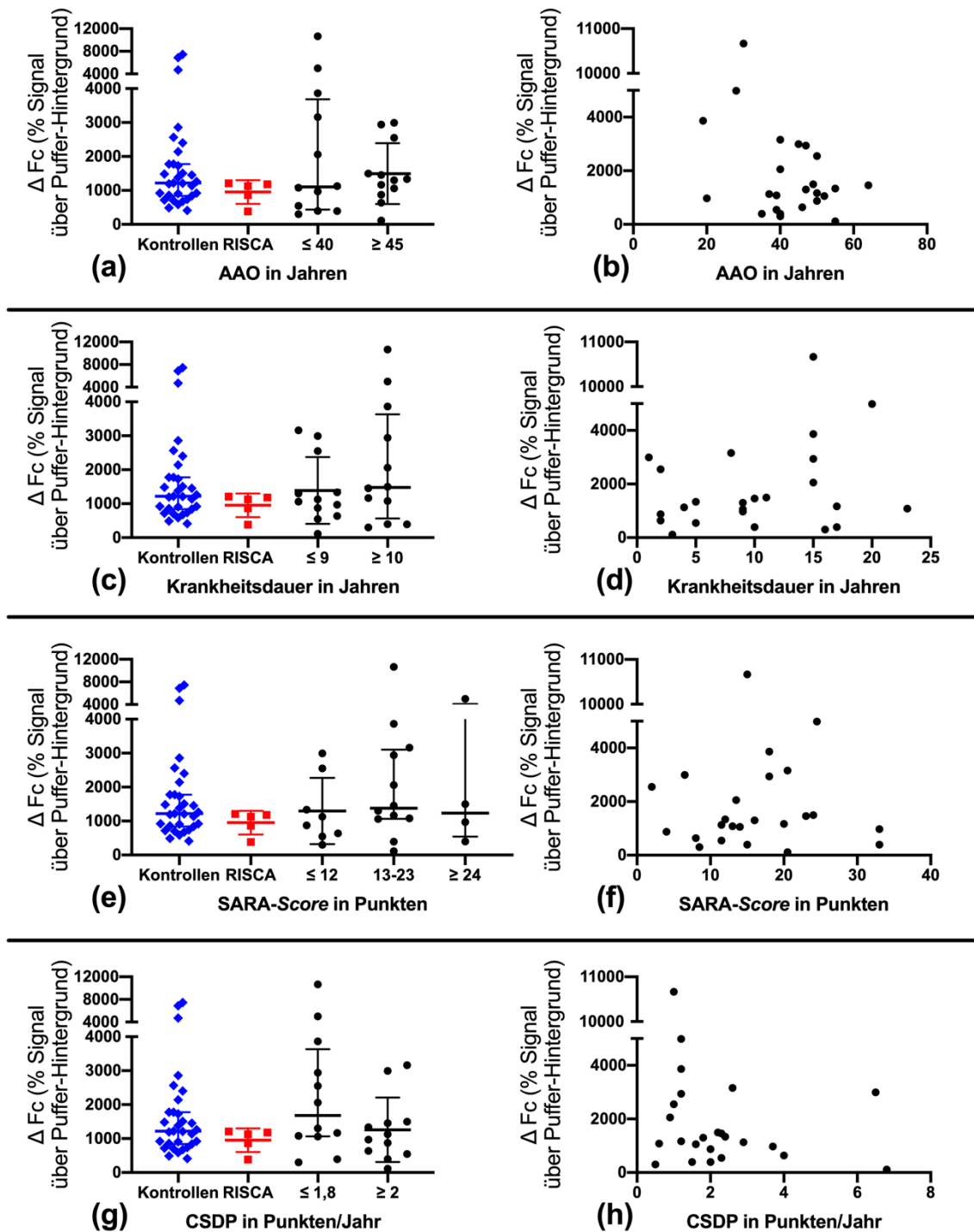


Abbildung B: Korrelation des α -Synuclein-Proteins mit den klinischen Parametern
 Aufgetragen wurden die (a,c,e,g) Kohorten der Kontrollen, RISCA und SCA3-Patienten und (b) das AAO, (d) die Krankheitsdauer, (f) der SARA-Score und (h) die CSDP der SCA3-Patienten linear gegen das gemessene ΔFc -Signal des α -Synuclein-Proteins.
 Es wurden weder in der Analyse der Kohorten noch bei der Ermittlung einer linearen Korrelation signifikante Zusammenhänge berechnet. Durch die breite Streuung der Messwerte der SCA3-Patienten waren Tendenzen schwer zu bestimmen. So zeigten die SCA3-Patienten (a) mit einem AAO von ≥ 45 Jahren, (c) einer Krankheitsdauer von ≥ 10 Jahren und (g) einer CSDP von $\leq 1,8$ SARA-Score-Punkten pro Erkrankungsjahr ein etwas höheres Level des α -Synuclein-Proteins. (d) Ebenso ließ sich eine tendenzielle PLK des α -Synuclein-Protein-Levels mit der

Erkrankungsdauer sehen. Diese klinischen Parameter sind mit einem milden Krankheitsverlauf assoziiert, sodass das Patientenalter das α -Synuclein-Protein-Level mit beeinflussen kann. Eine signifikante Korrelation des α -Synuclein-Protein-Level mit dem Alter der SCA3-Patienten und RISCA bestand für diese Kohorte nicht (Daten nicht gezeigt).

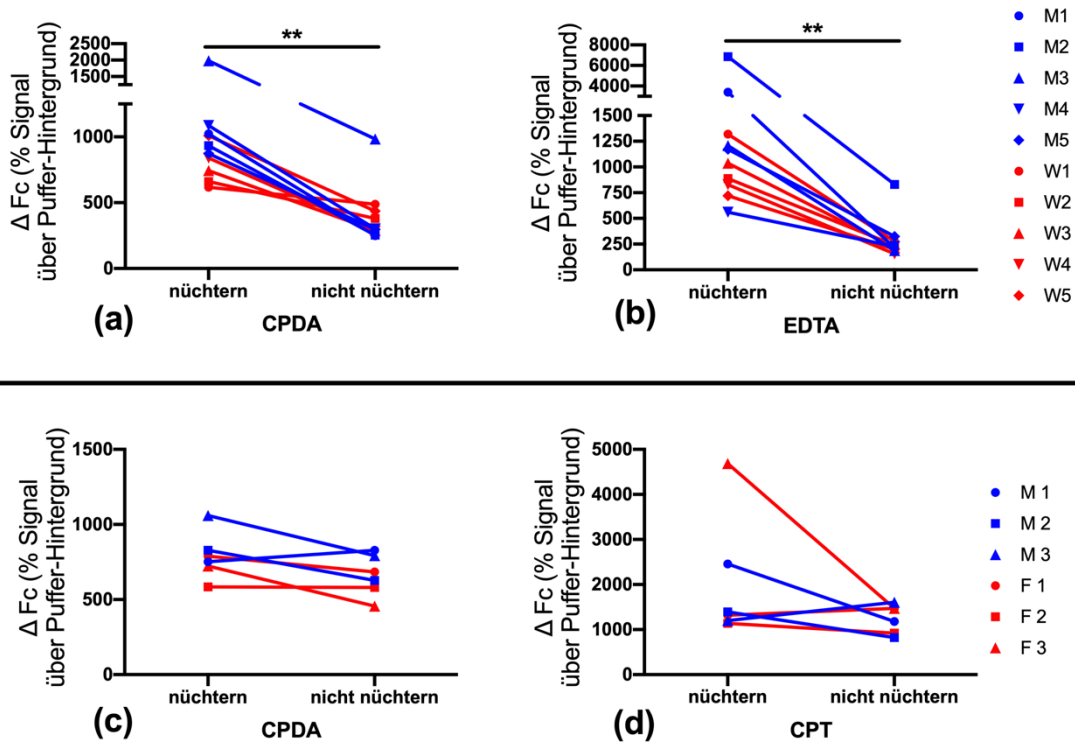


Abbildung C: Prüfung des Einflusses von Nahrungsaufnahme und Blutröhrchensystemen auf die Level des α -Synuclein-Proteins

Aufgetragen wurden die zwei Zeitpunkte der Blutentnahme gegen das gemessene ΔFc -Signal des α -Synuclein-Proteins (a) in CPDA-Röhrchen, (b) in EDTA-Röhrchen, (c) nochmals in CPDA-Röhrchen und (d) in CPT-Röhrchen. Männer (blau) und Frauen (rot) sind farblich gekennzeichnet. Die einzelnen Probanden erhalten verschiedene Symbole (s. Legende). (a+b) In der ersten durchgeführten Kontrollstudie berechnete sich für alle Probanden mit dem Wilcoxon-Test nach der Nahrungsaufnahme eine abnehmende Dynamik der Proteinlevel von α -Synuclein (CPDA p-Wert: 0,0020; EDTA p-Wert: 0,0020). (c+d) Diese konnte auch im zweiten Kontrollexperiment, bei dem anstelle der EDTA-Röhrchen die CPT-Röhrchen verwendet wurden, als Tendenz nachvollzogen werden. Einige Kontrollen hatten nach dem Frühstück ansteigende Werte. Nach Vergleich des Frühstückprotokolls waren sie an keiner Auffälligkeit festzumachen. Das gemessene Signal der aus den CPT-Röhrchen isolierten Lymphozyten war für beide Entnahmezeitpunkte signifikant höher als das der CPDA-Röhrchen (nüchtern p-Wert: 0,0022; nicht nüchtern p-Wert: 0,0043).

Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

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

Die Konzeption der Studie erfolgte durch das Organisationskomitee von *NeurO-mics* und Frau Dr. rer. nat. Jeannette Hübener-Schmid (Post-Doc, Arbeitsgruppe SCA3, Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik).

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Frau Dr. rer. nat. Jeannette Hübener-Schmid von mir eigenständig durchgeführt. Unterstützende Hilfe bei den Sequenzierungen der Polymorphismen erhielt ich von Frau Gabriele Anna Kaucher. Bei der Isolierung der Lymphozyten halfen mir bei Bedarf Frau Dr. rer. nat. Jeannette Hübener-Schmid, Frau Yvonne Theurer und Frau Gabriele Anna Kaucher. Die Isolierung der DNA wurde freundlicherweise durch Frau Yvonne Theurer und die medizinisch-technischen Assistentinnen der diagnostischen Abteilung des Instituts für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik Tübingen durchgeführt. Die Blutentnahmen der SCA3-Patienten und RISCA sowie die Erhebung der SARA-Scores der Tübinger Kohorte führten Herr Prof. Dr. med. Ludger Schöls und das betreuende Ärzteteam der Ataxie-Ambulanz der Neurologischen Poliklinik des Universitätsklinikums Tübingen durch.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 29.04.2019

Kathrin Gonsior

Veröffentlichungen: Präsentationen und Poster

NeurOmics Annual Meeting, 07.03. - 09.03.2016, Barcelona:

- Young Investigator Session, 07.03.2016: *The influence of parkin in the pathogenesis of Spinocerebellar Ataxia Type 3*
- Poster Session, 08.03.2016: *The influence of parkin in the pathogenesis of Spinocerebellar Ataxia Type 3*

89. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie,

21.09. - 24.09.2016, Mannheim:

- Poster Session: Neurodegeneration II: Syndrome & Genetik, 23.09.2016: *Analysis of the influence of parkin and alpha-synuclein as potential biomarker in the pathogenesis of SCA3*

NeurOmics Final Meeting, 03.05. - 05.05.2017, Berlin:

- Poster Session, 04.05.2017: *The influence of parkin and alpha-synuclein in the pathogenesis of Spinocerebellar Ataxia Type 3 (SCA3)*
- Workpackage 4 Session: Identification of hypothesis-driven biomarkers for disease progression, 05.05.2017: *Task 2: The influence of parkin and alpha-synuclein in the pathogenesis of Spinocerebellar Ataxia Type 3 (SCA3)*

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Hr. Prof. Dr. med. Olaf Rieß für seine Betreuung und die Möglichkeit meine Promotion an seinem Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik durchzuführen. Ich konnte ein dynamisches Forschungsfeld kennenlernen und durch die Teilnahme an Kongressen von einem regen Austausch verschiedener Forschungsgruppen profitieren. Die Anregungen und Diskussionen zu meinen Daten schärfen das Profil dieser Arbeit maßgeblich und der Ausblick möglicher Potenziale neurowissenschaftlicher Forschung bestärken meinen Wunsch Neurologin zu werden.

Der Arbeitsgruppe SCA3 und ihrem Leiter Hr. Dr. rer. nat. Thorsten Schmidt danke ich für ihre herzliche Aufnahme und die konstruktiven Diskussionen meiner Ergebnisse. Ein herzliches Dankeschön gilt Anna Kaucher für ihre Unterstützung bei den Sequenzierungen und den steten fachlichen Austausch. Eva Haas danke ich für die wundervolle Freundschaft, die uns hoffentlich weiter verbindet.

Ohne die enge und wunderbare Zusammenarbeit bei der Weitergabe der Patientenproben mit dem Team der Sektion Neurogenetik der Neurologischen Poliklinik des Universitätsklinikums Tübingen wäre diese Promotion nicht durchführbar gewesen. Hr. Prof. Dr. med. Ludger Schöls danke ich für die Darlegung der klinischen Aspekte der SCA3. Ein besonderer Dank gilt Hr. Prof. Dr. med. Matthias Synofzik für die Unterstützung bei der Kohortenbildung der SCA3-Patienten für die statistischen Analysen. Dr. med. Tim Rattay danke ich für die Vermittlung dieser spannenden Promotion und Dr. med. Holger Hengel für die Kommunikation von Ambulanzterminen der Studienpatienten. Ich danke außerdem ganz herzlich Yvonne Theurer für ihre unkomplizierte Hilfe und Zusammenarbeit bei der Isolation der Lymphozyten bei zeitlichen Engpässen.

Aus dem *NeurOmic*s-Konsortium möchte ich mich vor allem bei Hr. Prof. Dr. med. Thomas Klockgether und Fr. Dr. Sandra Kuhs der Neurologischen Klinik des Universitätsklinikums Bonn sowie Fr. Prof. Dr. med. Alexandra Dürr PhD und Fr. Sylvie Forlani PhD des *Institut du Cerveau et de la Moelle épinière* Paris für die Bereitstellung von Patientenproben und -daten bedanken.

Christin Gonsior und Constantin von Hornung danke ich für ihr konzentriertes Lesen und den sprachlichen Feinschliff dieser Arbeit.

Ich danke allen SCA3-Patienten, Angehörigen und Kontrollen, die an den Studien dieser Promotion teilgenommen haben. Ohne ihre Bereitschaft wären all die erhobenen Daten und die daraus gewonnenen Erkenntnisse nicht möglich gewesen. Dr. rer. nat. Jeannette Hübener-Schmids großartige Betreuung umfasste so viele Aspekte. Die fachliche Expertise, das Schaffen einer freundschaftlichen Atmosphäre und die Möglichkeit, mit jedem Anliegen ein offenes Ohr zu finden und ehrliches Feedback zu erhalten, haben die Durchführung dieser Promotion vorangetrieben und zum Abschluss gebracht. Vielen Dank hierfür und das Vertrauen in mich.

Abschließend möchte ich meinen Eltern für ihre Mut machenden Worte und klugen Ratschläge danken. Ohne ihre Unterstützung wäre ich nicht zu der Person herangereift, die ich bin.