

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

**Evaluation von Einflussfaktoren auf Ataxin-3 als
molekularen Marker in der Pathogenese der
Spinocerebellären Ataxie Typ 3**

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

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

vorgelegt von

Schumann, Dorothea

2024

Dekan:	Professor Dr. B. Pichler
1. Berichterstatter:	Professor Dr. O. Rieß
2. Berichterstatter:	Professorin Dr. K. Brockmann
Tag der Disputation:	17.12.2024

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis	X
1 Einleitung.....	1
1.1 Spinocerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3).....	1
1.2 Ataxin-3.....	8
1.3 Therapiemöglichkeiten – mögliche Ansätze	11
1.4 Biomarker für SCA3	14
1.5 ESMI und BIGPRO – Herkunft der beteiligten Patientenkohorten.....	19
1.6 <i>Time-resolved fluorescence energy transfer</i> (TR-FRET)-Immunoassay	20
1.7 SNP-Varianten im <i>ATXN3</i> - und <i>PARK2</i> -Gen	25
1.7.1 Untersuchte Varianten im <i>ATXN3</i> -Gen.....	26
1.7.2 Untersuchte Varianten im <i>PARK2</i> -Gen.....	28
1.8 Ziel der vorliegenden Arbeit	30
2 Material und Methoden.....	32
2.1 Material	32
2.1.1 Probenherkunft, Ethikvotum	32
2.1.2 Geräte.....	32
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien.....	35
2.1.4 Verbrauchsmittel.....	38
2.1.5 Hersteller-Kits	40
2.1.6 Puffer und Lösungen	40
2.1.7 Software	43
2.1.8 <i>Primer</i>	44
2.1.9 Restriktionsendonukleasen.....	47
2.1.10 Antikörper	47
2.2 Methoden	48
2.2.1 DNA-Isolation aus EDTA-Vollblut	48
2.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)	49

2.2.3	Gelelektrophorese	52
2.2.4	Extraktion von DNA aus Agarosegel.....	53
2.2.5	Bestimmung der Anzahl der CAG-Wiederholungen.....	54
2.2.6	Sanger-Sequenzierung des <i>ATXN3</i> -Gens zur Bestimmung des SNP Bp 987	56
2.2.7	Fragmentlängenanalyse / Duplex-PCR zur Bestimmung des <i>ATXN3</i> -SNPs Bp 987.....	60
2.2.8	<i>High Resolution Melting Analysis (HRMA)</i> zur Bestimmung der <i>ATXN3</i> -SNPs Bp 669 und Bp 1118.....	63
2.2.9	Restriktionsfragmentlängenanalyse zur Bestimmung der <i>PARK2</i> -SNPs Exon 4 und Exon 10.....	67
2.2.10	Etablierung einer Multiplex-PCR nach Costa et al., 2019 für verschiedene SNPs des <i>ATXN3</i> -Gens.....	69
2.2.11	Gewinnung der PBMC-Proben	75
2.2.12	Lyse der PBMC-Proben.....	76
2.2.13	Bradford-Assay	77
2.2.14	<i>Time-resolved fluorescence energy transfer (TR-FRET)</i> -Immunoassay.....	79
2.2.15	Western Blot	83
2.2.16	Statistische Auswertung	89
3	Ergebnisse	91
3.1	Einführung und Übersicht.....	91
3.2	Methodenetablierung.....	94
3.2.1	Etablierung einer Multiplex-PCR nach Costa et al., 2019 für verschiedene SNPs des <i>ATXN3</i> -Gens.....	94
3.2.2	Bestimmung der Qualität der Proben aus Brasilien	99
3.2.3	Etablierung der Fragmentlängenanalyse / Duplex-PCR zur Bestimmung des <i>ATXN3</i> -SNPs Bp 987	106
3.2.4	Betrachtung möglicher Einflussfaktoren auf die <i>ATXN3</i> -Messwerte im TR-FRET	109
3.3	Kohortenbeschreibung	121
3.3.1	Beschreibung und Zusammensetzung der ESMI-Kohorte.....	121
3.3.2	Beschreibung und Zusammensetzung der Kohorte aus Brasilien	125
3.4	Auswertung der demographischen und klinischen Daten.....	128
3.4.1	Auswertung für die ESMI-Kohorte	128
3.4.2	Auswertung für die Brasilien-Kohorte	131

3.5	Auswertung der mittels TR-FRET gemessenen Ataxin-3-Konzentrationen in PBMCs.....	133
3.6	Auswertung der Follow-up-Proben.....	141
3.7	Auswertung der Untersuchungen der SNP-Analysen	143
3.7.1	<i>ATXN3</i> -SNP Bp 669	144
3.7.2	<i>ATXN3</i> -SNP Bp 987	146
3.7.3	<i>ATXN3</i> -SNP Bp 1118	149
3.7.4	<i>PARK2</i> -SNP Exon 4	152
3.7.5	<i>PARK2</i> -SNP Exon 10	155
4	Diskussion.....	158
5	Zusammenfassung.....	177
	Literaturverzeichnis	179
	Erklärung zum Eigenanteil.....	194
	Veröffentlichungen	196
	Danksagung	197

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzsignale während einer TR-FRET-Messung.....	22
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips eines FRETs..	24
Abbildung 3: Darstellung der Messergebnisse einer Fragmentlängenanalyse für die Proben Co62, Co59 und Lo70 in der Analysesoftware des Sequenzierers	55
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Prinzips der Sequenzierung nach Sanger.....	57
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Zusammenbaus der Blotting-Kassette für den Western Blot.....	86
Abbildung 6: Workflow dieser Promotion.....	93
Abbildung 7: Darstellung der Kontrollagarosegele zur Überprüfung des Reaktionserfolgs bei der Etablierung der Multiplex-PCR nach Costa et al., 2019	98
Abbildung 8: Transportbox, in der die Proben aus Brasilien in unserem Labor ankamen.....	99
Abbildung 9: Western Blot einiger Proben aus Brasilien und der ESMI-Kohorte im Vergleich.....	103
Abbildung 10: TR-FRET-Messwerte der Proben aus der ESMI-Kohorte und aus Brasilien im Vergleich	105
Abbildung 11: Kontrollagarosegel zur Etablierung der Fragmentlängenanalyse / Duplex-PCR zur Bestimmung des ATXN3-SNPS Bp 987	107
Abbildung 12: Darstellung der Auswertung der Fragmentlängenanalyse / Duplex-PCR in der Analysesoftware des Sequenzierers.....	108
Abbildung 13: Einfluss des biologischen Geschlechts auf den im TR-FRET gemessenen ATXN3-Wert.....	112
Abbildung 14: Einfluss einer zuvor erfolgten Nahrungsaufnahme auf den im TR-FRET gemessenen ATXN3-Wert	114
Abbildung 15: Einfluss der Tageszeit, zu der die Messung stattfand, auf den im TR-FRET gemessenen ATXN3-Wert	116
Abbildung 16: Einfluss der Person, die die Probe bearbeitet und die Messung durchgeführt hat, auf den im TR-FRET gemessenen ATXN3-Wert.....	118
Abbildung 17: Einfluss der Lagerungszeit der Proben zwischen deren Abnahme und Verarbeitung auf den im TR-FRET gemessenen ATXN3-Wert	120
Abbildung 18: Geschlechterverteilung innerhalb der ESMI-Kohorte.....	122
Abbildung 19: Geschlechterverteilung innerhalb der Kohorte aus Brasilien ...	126

Abbildung 20: Untersuchung der Zusammenhänge verschiedener demographischer, klinischer und genetischer Daten innerhalb der ESMI-Kohorte	130
Abbildung 21: Untersuchung der Zusammenhänge verschiedener demographischer, klinischer und genetischer Daten innerhalb der Kohorte aus Brasilien	132
Abbildung 22: TR-FRET-Messwerte, bestimmt mittels der Antikörperkombination mit MW1 (bindet PolyQ-Ketten > 15Q; siehe Kapitel 1.6) im Verhältnis zu SARA, AAO und DD.....	136
Abbildung 23: TR-FRET-Messwerte, bestimmt mittels der Antikörperkombination mit 1C2 (bindet PolyQ-Ketten > 37Q; siehe Kapitel 1.6) im Verhältnis zu SARA, AAO und DD.....	139
Abbildung 24: Veränderung der ATXN3-Werte in Proben, gewonnen beim zweiten Besuch der Probanden nach einem Jahr, seit dem ersten Besuch, in Verhältnis zur Veränderung des SARA-Scores	142
Abbildung 25: Vergleich des Vorkommens der verschiedenen Ausprägungen des ATXN3-SNPs Bp 669 zwischen Kontrollen und Mutationsträgern.....	144
Abbildung 26: Analyse von anamnestischen Daten (AAO), klinischen Parametern (SARA- und INAS-Score) und laborchemisch bestimmten Größen (TR-FRET-Messwerte, bestimmt mittels der Antikörperkombination mit MW1 sowie mit 1C2) in Bezug auf die verschiedenen Ausprägungen des ATXN3-SNPS Bp 669...	145
Abbildung 27: Vergleich des Vorkommens der verschiedenen Ausprägungen des ATXN3-SNPs Bp 987 zwischen Kontrollen und Mutationsträgern.....	147
Abbildung 28: Analyse von anamnestischen Daten (AAO), klinischen Parametern (SARA- und INAS-Score) und laborchemisch bestimmten Größen (TR-FRET-Messwerte, bestimmt mittels der Antikörperkombination mit MW1 sowie mit 1C2) in Bezug auf die verschiedenen Ausprägungen des ATXN3-SNPS Bp 987...	148
Abbildung 29: Vergleich des Vorkommens der verschiedenen Ausprägungen des ATXN3-SNPs Bp 1118 zwischen Kontrollen und Mutationsträgern.....	149
Abbildung 30: Analyse von anamnestischen Daten (AAO), klinischen Parametern (SARA- und INAS-Score) und laborchemisch bestimmten Größen (TR-FRET-Messwerte, bestimmt mittels der Antikörperkombination mit MW1 sowie mit 1C2) in Bezug auf die verschiedenen Ausprägungen des ATXN3-SNPS Bp 1118.	151
Abbildung 31: Vergleich des Vorkommens der verschiedenen Ausprägungen des PARK2-SNPs Exon 4 zwischen Kontrollen und Mutationsträgern.....	152
Abbildung 32: Analyse von anamnestischen Daten (AAO), klinischen Parametern (SARA- und INAS-Score) und laborchemisch bestimmten Größen (TR-FRET-Messwerte, bestimmt mittels der Antikörperkombination mit MW1 sowie mit 1C2) in Bezug auf die verschiedenen Ausprägungen des PARK2-SNP Exon 4	154
Abbildung 33: Vergleich des Vorkommens der verschiedenen Ausprägungen des PARK2-Exon 10 zwischen Kontrollen und Mutationsträgern.....	155

Abbildung 34: Analyse von anamnestischen Daten (AAO), klinischen Parametern (SARA- und INAS-Score) und laborchemisch bestimmten Größen (TR-FRET-Messwerte, bestimmt mittels der Antikörperkombination mit MW1 sowie mit 1C2) in Bezug auf die verschiedenen Ausprägungen des PARK2-SNPs Exon 10 . 156

Abbildung 35: Zusammenfassende Darstellung der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Einflussfaktoren auf die TR-FRET-Messwerte..... 173

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kenndaten verschiedener PolyQ-Erkrankungen.....	2
Tabelle 2: Untersuchte Varianten im ATXN3-Gen.....	26
Tabelle 3: Untersuchte Varianten im PARK2-Gen.....	29
Tabelle 4: Verzeichnis der verwendeten Geräte.....	32
Tabelle 5: Verzeichnis der verwendeten Chemikalien und Reagenzien.....	35
Tabelle 6: Verzeichnis der verwendeten Verbrauchsmittel.....	38
Tabelle 7: Verzeichnis der verwendeten Hersteller-Kits	40
Tabelle 8: Verzeichnis der verwendeten Puffer und Lösungen	40
Tabelle 9: Verzeichnis der verwendeten Software	43
Tabelle 10: Verzeichnis der Primer für die Bestimmung der CAG-Wiederholungen mittels Fragmentlängenanalyse.....	44
Tabelle 11: Verzeichnis der Primer für die Sanger-Sequenzierung.....	45
Tabelle 12: Verzeichnis der Primer für die Fragmentlängenanalyse / Duplex-PCR zur Bestimmung des ATXN3-SNPs Bp 987.....	45
Tabelle 13: Verzeichnis der Primer für die High-Resolution Melting Analysis ..	46
Tabelle 14: Verzeichnis der Primer für die Restriktionsfragmentlängenanalyse	46
Tabelle 15: Verzeichnis der Primer für die Etablierung einer Multiplex-PCR nach Costa et al., 2019	47
Tabelle 16: Verzeichnis der Restriktionsendonukleasen	47
Tabelle 17: Verzeichnis der Antikörper für den TR-FRET-Immunoassay.....	47
Tabelle 18: Verzeichnis der Antikörper für den Western Blot	48
Tabelle 19: Reaktionsansatz für die PCR für die Bestimmung der Anzahl der CAG-Wiederholungen	50
Tabelle 20: Reaktionsansatz für die PCR für die Sanger-Sequenzierung des ATXN3-Gens	51
Tabelle 21: Reaktionsansatz für die PCR für die Bestimmung der SNPs Exon 4 und Exon 10 des PARK2-Gens.....	51
Tabelle 22: PCR-Programm für die PCR für die für die Bestimmung der Anzahl der CAG-Wiederholungen und für die PCR für die Sanger-Sequenzierung des ATXN3-Gens	52

Tabelle 23: PCR-Programm für die PCR für die Bestimmung der SNPs Exon 4 und Exon 10 des PARK2-Gens	52
Tabelle 24: Reaktionsansatz für die Kettenabbruchsynthese.....	58
Tabelle 25: PCR-Programm für die Kettenabbruchsynthese.....	58
Tabelle 26: Stopp-Mix für die Aufreinigung des PCR-Produkts der Kettenabbruchsynthese.....	59
Tabelle 27: Einstellungen für das Programm "LFR-b" zur Sequenzierung nach Kettenabbruchsynthese.....	60
Tabelle 28: Reaktionsansatz für die Fragmentlängenanalyse / Duplex-PCR zur Bestimmung des ATXN3-SNPs Bp 987	61
Tabelle 29: PCR-Programm für die Fragmentlängenanalyse / Duplex-PCR zur Bestimmung des ATXN3-SNPs Bp 987	62
Tabelle 30: Einstellungen für das Programm "Frag-2" zur Fragmentlängenanalyse.....	63
Tabelle 31: Reaktionsansatz für die HRMA.....	66
Tabelle 32: Zusammensetzung der Primer-Mischungen für die HRMA.....	66
Tabelle 33: Programm für die PCR und Analyse im LightCycler	67
Tabelle 34: Übersicht über die Eigenschaften der verwendeten Restriktionsendonukleasen	68
Tabelle 35: Reaktionsansatz für den Restriktionsendonukleasenverdau	69
Tabelle 36: anfänglicher Reaktionsansatz für die Etablierung einer Multiplex-PCR	70
Tabelle 37: anfängliches PCR-Programm für die Etablierung einer Multiplex-PCR	71
Tabelle 38: PCR-Protokoll der Touchdown-PCR für die Etablierung einer Multiplex-PCR	72
Tabelle 39: angepasster Reaktionsansatz für die Etablierung einer Multiplex-PCR	73
Tabelle 40: Variationen des angepassten Reaktionsansatzes für die Etablierung einer Multiplex-PCR	74
Tabelle 41: finales PCR-Protokoll für PCR 2 für die Etablierung einer Multiplex-PCR.....	74

Tabelle 42: Reaktionsansatz für den Bradford-Assay	78
Tabelle 43: Etablierte Antikörperkonzentrationen für die TR-FRET-Messung ..	81
Tabelle 44: Einstellungen für das TR-FRET-Lesegerät für die Messung	81
Tabelle 45: Ansatz für das Gießen eines Gels für die Vorbereitung eines Western Blots, bestehend aus einem Sammel- und einem Trenngel	84
Tabelle 46: Probenansatz für die Gelelektrophorese zur Vorbereitung des Western Blots	85
Tabelle 47: Eingesetzte Primärantikörper für die Immundetektion des Western Blots	88
Tabelle 48: Eingesetzte Sekundärantikörper für die Immundetektion des Western Blots	88
Tabelle 49: Detektionseinstellungen in der Image Studio Software.....	88
Tabelle 50: Zusammenfassende Darstellung der in Kapitel 2.2.10 dargestellten Anpassungen der Reaktionsbedingungen für die Etablierung der Multiplex-PCR nach Costa et al., 2019	95
Tabelle 51: Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlussfolgerungen zur Bestimmung der Qualität der aus Brasilien gesendeten Proben	106
Tabelle 52: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse des Kapitels Einflussfaktoren auf die ATXN3-Messwerte	120
Tabelle 53: Darstellung der Kenndaten der ESMI-Kohorte	125
Tabelle 54: Darstellung der Kenndaten der Kohorte aus Brasilien.....	128
Tabelle 55: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse des Kapitels Auswertung der demographischen und klinischen Daten.....	133
Tabelle 56: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse des Kapitels Auswertung der mittels TR-FRET gemessenen Ataxin-3-Konzentrationen in PBMCs	140
Tabelle 57: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse des Kapitels Auswertung der Follow-Up-Proben	142
Tabelle 58: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse des Kapitels Auswertung der Untersuchungen der SNP-Analysen.....	157

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AAO	<i>Age At Onset</i>
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
ATXN3	Ataxin-3-Protein
ATXN3	Ataxin-3-Gen
bp / Bp	Basenpaar
BSA	<i>Bovine Serum Albumin Fraction V</i> , Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
CPDA	<i>Citrate-Phosphate-Dextrose-Adenine</i>
CPT	<i>Cell Preparation Tubes</i>
DD	<i>Disease Duration</i>
ddH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DRPLA	Dentatorubro-Pallidoluysische Atrophie
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDTA-Na ₂	Ethylendiamintetraacetat-Dinatriumsalzlösung
ESMI	<i>European Spinocerebellar Ataxia Type3/Machado-Joseph-Disease Initiative</i>
FRET	Förster resonance energy transfer
G	Guanin
Gly	Glycin
HD	<i>Huntington's Disease</i> , Chorea Huntington
HEK	<i>Human Embryonic Kidney cells</i> , menschliche embryonale Nierenzellen
HRMA	<i>high resolution melting analysis</i>
INAS	<i>Inventory of Non-Ataxia Symptoms</i>
Leu	Leucin
Met	Methionin
MJD	<i>Machado-Joseph Disease</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
n	Anzahl der in die jeweilige Analyse eingeschlossenen Probanden
NfL	<i>Neurofilament light chain</i> , Neurofilament-Leichtketten
p	Signifikanzniveau
<i>PARK2</i>	Parkin-Gen
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PET	Positronenemissionstomographie
PolyQ	Polyglutamin
p _P	p nach dem Pearson-Test
p _s	p nach dem Spearman-Test

Q	Glutamin
r	Korrelationskoeffizient
r _P	r nach dem Pearson-Test
r _s	r nach dem Spearman-Test
Rs	<i>Reference SNP</i>
SARA	Scale of the Assessment of Rating of Ataxia
SBMA	spinal and bulbar muscular atrophy, Spinobulbäre Muskelatrophie Typ Kennedy
SCA	Spinocerebelläre Ataxie
SCA3	Spinocerebelläre Ataxie Typ 3
Ser	Serin
Simoa	<i>single-molecule array</i>
SMC	<i>single molecule counting</i> , Einzelmolekül-Zähltechnologie
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> , Einzelnukleotid-Polymorphismus
STOP	Stopp-Codon
T	Thymin
Tb	Terbiumkryptat
TBS	<i>Tris-buffered Saline</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered Saline with Tween</i>
TR-FRET	<i>time-resolved fluorescence energy transfer</i>
Tyr	Tyrosin
UK	<i>United Kingdom</i> , Vereinigtes Königreich
USA	<i>United States of America</i> , Vereinigte Staaten von Amerika
UV	Ultraviolett-Licht
Val	Valin
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Spinocerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3)

Die Spinocerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3) ist Bestandteil einer Gruppe von Spinocerebellären Ataxien (SCAs), die autosomal dominant vererbt werden (Schöls et al., 2004). Sie wird auch als Machado-Joseph-Krankheit (*Machado-Joseph Disease*, MJD) bezeichnet, nach den Vorfahren zweier Familien, in denen die SCA3 erstmals beschrieben wurde: Machado (Coutinho & Andrade, 1978; Nakano et al., 1972) und Joseph (Rosenberg et al., 1976).

Bei der SCA3 handelt es sich um eine sogenannte Polyglutamin- oder auch PolyQ-Erkrankung (Bettencourt & Lima, 2011). PolyQ-Erkrankungen im Allgemeinen manifestieren sich, wenn eine *CAG-Repeat*-Wiederholung im verursachenden Gen über eine kritische Grenze expandiert (Matos et al., 2011). Bekannte Beispiele dieser Art sind neben der SCA3 zum Beispiel Chorea Huntington (*Huntington's Disease*, HD) (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993), Spinobulbäre Muskelatrophie Typ Kennedy (*spinal and bulbar muscular atrophy*, SBMA), Dentatorubro-Pallidoluysische Atrophie (DRPLA) und weitere Untergruppen der SCAs einschließlich SCA1, 2, 6, 7 und SCA17 (Gatchel & Zoghbi, 2005). Dabei variiert neben dem betroffenen Gen auch die Anzahl an Wiederholungen, ab denen es zu Symptomen und damit zur Manifestation der jeweiligen Polyglutamin-Erkrankung kommt, je nach Krankheitsbild. Eine vergleichende Übersicht der unterschiedlichen krankheitsdefinierenden Wiederholungszahlen ist aufgrund der Varianz zwischen den CAG-Erkrankungen in Tabelle 1 dargestellt. Ursachen für die unterschiedlichen Schwellenwerte sind bisher noch nicht geklärt und Gegenstand weiterer Forschung (McLoughlin et al., 2020). Gemein ist diesen Erkrankungen, dass sie im mittleren Lebensalter beginnen, wobei dieser Zeitpunkt bei mehr CAG-Wiederholungen noch nach vorne verschoben werden kann (Zoghbi & Orr, 2000). Nach Beginn der Symptome kommt es im Verlauf zu einer Verschlechterung der Symptomatik und etwa zehn bis zwanzig Jahre nach Erstauftreten zum Verlust von Neuronen (Gatchel & Zoghbi, 2005; Zoghbi & Orr, 2000). Ebenfalls typisch, wenn auch nicht bei allen bekannten PolyQ-Erkrankungen beobachtet, ist die Entstehung von Proteinaggregaten in den

betroffenen Neuronen mit Einschlüssen im Cytoplasma oder Zellkern (H. L. Paulson et al., 1997; Zoghbi & Orr, 2000).

Tabelle 1: Kenndaten verschiedener PolyQ-Erkrankungen. Dargestellt sind zu jeder Erkrankung die Lokalisation des betroffenen Gens, das daraus resultierende Protein und die jeweilige Anzahl an Wiederholungen, bei der es noch nicht beziehungsweise bereits zu einer Manifestation der Erkrankung kommt. Zur SCA3 finden sich hierbei in der Literatur unterschiedliche Angaben (1 = Gatchel & Zoghbi, 2005, 2 = Zoghbi & Orr, 2000, 3 = Gu et al., 2004, 4 = Bettencourt & Lima, 2011). Insgesamt zeigt sich hier aber im Vergleich zu anderen Polyglutamin-Erkrankungen ein deutlicher Unterschied in der Anzahl der Wiederholungen bei betroffenen und gesunden Personen. Modifiziert nach Zoghbi & Orr, 2000.

Erkrankung	Lokalisation des betroffenen Gens	Protein	Normale Anzahl an CAG-Wiederholungen	Pathogene Anzahl an CAG-Wiederholungen
DRPLA	12q	Atrophin-1	6-36	49-84
HD	4p16.3	Huntingtin	6-34	36-121
SBMA	Xq11-12	Androgenrezeptor	9-36	38-62
SCA1	6p22-23	Ataxin-1	6-44	39-82
SCA2	12q23-24	Ataxin-2	15-31	36-63
SCA3	14q24.3-31	Ataxin-3	13-36 ¹	61-84 ¹
			12-41 ²	62-84 ²
			12-44 ⁴	ab 50 ³
				61-87 ⁴
SCA6	19p13	CACNA1A	4-18	21-33
SCA7	3p12-p.21.1	Ataxin-7	4-35	37-306

Unter den Spinocerebellären Ataxien ist SCA3 diejenige, die mit einer Prävalenz von 0,3 bis 2,0 pro 100.000 Menschen nach langjährigem Forschungsstand am Häufigsten auftritt (Bettencourt & Lima, 2011; Seidel et al., 2012). Unter den PolyQ-Erkrankungen wird sie in der Häufigkeit nur durch HD mit einer Prävalenz von 4,88 pro 100.000 übertroffen (McLoughlin et al., 2020; Medina et al., 2022). Im Vergleich dazu steht nach neueren Erkenntnissen die SCA27B. Hier kommt es durch eine Expansion einer GAA-Repeat-Kette im FGF14-Gen und damit einer Polyglutamat-Kette zur Symptomatik einer Spinocerebellären Ataxie (Rafehi

et al., 2023; Wilke et al., 2023). Bemerkenswert ist, dass diese Erkrankung bei erst kürzlicher Entdeckung in ähnlicher Häufigkeit wie SCA3 aufzutreten scheint und damit eine der häufigsten Ursachen für eine Ataxie mit spätem Erkrankungsbeginn ist (Hengel et al., 2023; Iruzubieta et al., 2023). Aufgrund der hohen Aktualität der aktuellen Forschung und des damit einhergehenden ständigen Erkenntniswandels werden sich genaue Zahlen sowie ein langfristiger Trend hier jedoch erst noch zeigen und sind Gegenstand aktueller Nachforschungen.

Die SCA3 tritt primär in Portugal auf (Matos et al., 2011) und hier am häufigsten auf den Azoren, wo die weltweit größte SCA3-Prävalenz herrscht (Bettencourt & Lima, 2011). Darüber hinaus findet man gehäufte SCA3-Fälle in Brasilien, Singapur, China, den Niederlanden und Deutschland (Bettencourt & Lima, 2011). Ursächlich für SCA3 ist eine Veränderung des langen Arms von Chromosom 14 (14q24.3–q31) (Kawaguchi et al., 1994; Schöls et al., 2004), im *ATXN3*-Gen. Hier liegt die CAG-Wiederholung, die, wenn die Anzahl der Wiederholungen auf einem Allel eine kritische Grenze überschreitet, krankheitsauslösend ist (Matos et al., 2011). Wie viele Wiederholungen dafür genau benötigt werden ist abhängig von der Literaturquelle – in den meisten Fällen wird eine Anzahl von über 60 CAG-Wiederholungen als krankheitsauslösend angesehen, teils wird der pathogene Bereich aber auch schon ab 50 Wiederholungen beschrieben (siehe Tabelle 1). Im Gegenzug dazu stehen Beschreibungen des normalen Bereichs bei 12 bis 41 (Zoghbi & Orr, 2000) oder 13 bis 36 (Gatchel & Zoghbi, 2005) Wiederholungen. Damit liegt hier ein deutlicher Abstand zwischen Normalbereich und pathogenem Bereich, der so nicht in allen PolyQ-Erkrankungen vorhanden ist (siehe Tabelle 1). Einige Literaturquellen beschreiben einen intermediären Bereich von 45 bis 51 CAG-Wiederholungen (Bettencourt & Lima, 2011; Matos et al., 2011) beziehungsweise von 45 bis 55 CAG-Wiederholungen (Ashizawa et al., 2018), in dem eine Ausprägung des Erkrankungsbildes zwar möglich, aber nicht garantiert zu sein scheint. In den meisten Fällen haben Betroffene ein Wildtyp-Allel, auf dem die Anzahl der CAG-Wiederholungen im Normalbereich liegt, und ein mutiertes / expandiertes Allel, in dem die Anzahl der CAG-Wiederholungen im pathologischen Bereich liegt. Es sind allerdings auch Fälle von Homozygotie beschrieben; in diesem Fall ist der klinische Phänotyp schwerer

ausgeprägt, schreitet rascher fort, und die Erkrankung manifestiert sich früher (Bettencourt & Lima, 2011; McLoughlin et al., 2020; Riess et al., 2008).

Das *ATXN3*-Gen kodiert für ein etwa 42 kDa schweres Protein namens Ataxin-3 (Riess et al., 2008), von dem verschiedene Isoformen und Splicevarianten existieren. Der Bereich des *ATXN3*-Gens, in dem es zu einer Expansion der Anzahl der CAG-Wiederholungen in einen pathologischen Bereich kommt, liegt in einem Exon, Exon 10, und wird daher in eine verlängerte Glutaminkette übersetzt. Ataxin-3 existiert im Genom verschiedener Spezies, unter anderem auch in Pflanzen (Riess et al., 2008). Mehr zur Proteinfunktion wird in Kapitel 1.2 erklärt.

Wie die anderen SCAs der gleichen Erkrankungsgruppe wird auch SCA3 autosomal dominant vererbt. Dabei sind nur äußerst wenige Fälle von Nichtpenetranz beschrieben worden, sodass SCA3 für zum Beispiel genetische Beratungen als Erkrankung mit vollständiger Penetranz gewertet wird (Bettencourt & Lima, 2011). Das Erkrankungsalter liegt üblicherweise um die 40 Jahre (Bettencourt & Lima, 2011; Mendonça et al., 2018); insgesamt handelt es sich hierbei aber um eine recht weit gefasste Variable. Dabei gibt es einen bereits mehrfach beschriebenen, umgekehrt proportionalen Zusammenhang zwischen der Anzahl der CAG-Wiederholungen im *ATXN3*-Gen und dem *Age At Onset* der Betroffenen (Bettencourt & Lima, 2011; Matos et al., 2011; Zoghbi & Orr, 2000), der, wie bereits beschrieben, ein gemeinsamer Faktor für alle PolyQ-Erkrankungen ist. Darüber hinaus besteht eine positive Korrelation zwischen der Anzahl der CAG-Wiederholungen und der Schwere der Erkrankung (McLoughlin et al., 2020). Es wird zudem Antizipation, also eine zunehmende Erkrankungsschwere bzw. ein früheres Erkrankungsalter mit jeder Generation, für SCA3 beschrieben. Diese ist am ehesten bedingt durch eine zwischen den Generationen herrschende Instabilität der CAG-Region in Hinblick auf ihre Wiederholungsanzahl beim Vererben (Bettencourt & Lima, 2011; Maruyama et al., 1995; McLoughlin et al., 2020). Diese ist ausgeprägter, wenn das krankheitsauslösende Gen väterlicherseits anstelle von mütterlicherseits übertragen wird und beeinflusst damit ebenfalls das *Age At Onset* (Riess et al., 2008). Da die Anzahl der CAG-Wiederholungen zwar ein guter, aber kein sicher prädiktiver Indikator für das Erkrankungsalter ist und damit

nicht die gesamte Variation im *Age At Onset* erklären kann, ist davon auszugehen, dass es weitere diese Größe beeinflussende Faktoren gibt (Riess et al., 2008).

Aufgrund des durchschnittlichen Erkrankungsalters im mittleren Erwachsenenalter hat SCA3 einen großen Einfluss auf die Lebensqualität und die Lebenserwartung von Betroffenen (Seidel et al., 2012). Das Hauptsymptom der SCA3 ist eine fortschreitende cerebelläre Ataxie. Darüber hinaus kann es zu einer Vielzahl weiterer neuromuskulärer Komplikationen kommen. Dazu gehören unter anderem Dystonie, Dysarthrie, Dysphagie, Spastiken, Rigidity der Muskulatur, Faszikulationen, posturale Instabilität, ein Verlust der Propriozeption, Störungen im visuellen (insbesondere in der Okulomotorik) und auditorischen System, weitere sensorischen Defizite, periphere Neuropathie sowie Parkinsonismus (Bettencourt & Lima, 2011; Buijsen et al., 2019; Hoche et al., 2008; Seidel et al., 2012). Insgesamt handelt es sich um eine Erkrankung mit sehr variabler, heterogener Klinik (Seidel et al., 2012), die je nach Symptomausprägung in vier Subtypen unterteilt werden kann: Typ I zeigt schwerpunktmäßig extrapyramidale und pyramidale Defizite sowie ein frühes *Age At Onset* mit raschem Fortschreiten der Erkrankung. Typ II zeigt ein mittleres *Age At Onset* mit cerebellärer Problematik sowie pyramidaler Symptomatik. Bei Typ III kommt es zu einem späteren *Age At Onset* mit, zusätzlich zu cerebellär bedingten Einschränkungen, peripherer Neuropathie. Darüber hinaus wird ein Typ IV beschrieben, bei dem die klinisch üblicherweise führende Ataxie im Hintergrund steht und Parkinson-ähnliche Symptomatiken in den Vordergrund treten (Bettencourt & Lima, 2011; Buijsen et al., 2019; Riess et al., 2008).

Durch das kontinuierliche Fortschreiten der Erkrankung kommt es in der Regel innerhalb von 10 bis 15 Jahren nach Symptombeginn durch Fehler in Hirnstamm-assoziierten Funktionen zum Tod der Betroffenen (McLoughlin et al., 2020).

Die Symptomatik kann mittels verschiedener klinischer Scores in Zahlen gefasst und damit quantifiziert werden. Zur Messung des Schweregrads der ataktischen Symptome wird im Rahmen dieser Arbeit der sogenannte *Scale for the assessment and rating of ataxia* (SARA)-Score verwendet, der eine Beurteilung des

Gangbildes, des Stands, des Sitzens, der Sprache und der Extremitätenkoordination beinhaltet. Dieser wurde für die Messung des Schweregrades einer Ataxie im Rahmen Spinocerebellärer Ataxien validiert (Subramony, 2007) und als möglicher Endpunkt von Phase-3-Studien in klinischen Studien empfohlen (Saute et al., 2015), da er neben einer aktuellen Statuserhebung in Hinblick auf ataktische Symptome auch als Maß für das Fortschreiten der Erkrankung verwendet werden kann (Riess et al., 2008). Für die begleitende, nicht-ataktische Symptomatik wurde das *Inventory of Non-Ataxia Signs* (INAS) entwickelt, da diese zur Behinderung durch eine vorliegende Spinocerebelläre Ataxie beitragen und darüber hinaus symptomatisch mit den Ataxie-Symptomen interferieren können. Mit dem INAS gelang eine gute und zuverlässige Messung der extracerebellären Symptomatik in SCA-Patienten, allerdings keine gute Verlaufsdarstellung, sodass dieser als Ergänzung, aber nicht als primärer Endpunkt in zukünftigen Studien zur Evaluation eines Behandlungserfolgs verwendet werden sollte (Jacobi et al., 2013). Ein weiterer gelegentlich verwendeter klinischer Score ist der *Neurological Examination Score for Spinocerebellar Ataxia* (NESSCA), der ebenfalls für die Anwendung bei SCA3-Patienten untersucht und validiert wurde (Kieling et al., 2008).

Makroskopisch lässt sich feststellen, dass das Hirngewicht beinahe aller SCA3-Patienten mit einer über 15 Jahre bestehenden Erkrankungsdauer reduziert ist (Buijsen et al., 2019; Rüb et al., 2008). Die Atrophie insbesondere im Cerebellum und im Hirnstamm lässt sich auch *in vivo* bereits in Magnetresonanztomographie-Bildern erkennen (Seidel et al., 2012).

Auf mikroskopischer Ebene geht die Erkrankung einher mit einer progressiven Neurodegeneration, von der vor allem Bereiche im Cerebellum, im Hirnstamm, in den Basalganglien und im Rückenmark betroffen sind. Es kommt zum Verlust von Neuronen im Cerebellum, dem pyramidalen und extrapyramidalen System, den Nuclei pontis, sowie dem okulomotorischen System und zum Abbau von Motoneuronen (Bettencourt & Lima, 2011; Zoghbi & Orr, 2000). Es zeigt sich eine Depigmentation der Substantia nigra (Buijsen et al., 2019; Rüb et al., 2008; Seidel et al., 2012), und auch im auditorischen System zeigen sich

neuropathologische Auffälligkeiten. Letztere stehen in Diskrepanz mit der vergleichsweise niedrigen Frequenz der Einschränkungen im Hören, von der SCA3 Patienten berichten (Hoche et al., 2008). Bei fortgeschrittener SCA3-Erkrankung sieht man zusätzlich in den meisten Fällen einen Rückgang in den großen Betz-Pyramiden-Zellen und im primären Motorkortex, zusätzlich zur üblichen beobachteten Neurodegeneration der Motoneurone im Vorderhorn des Rückenmarks (Rüb et al., 2008).

Nach neueren Erkenntnissen ebenfalls betroffen (und dies auch frühzeitig) ist der Reifeprozess der Oligodendrozyten (Schuster et al., 2022). Hierunter konnten auch Unregelmäßigkeiten in der Axonmyelinisierung beobachtet werden (Schuster et al., 2022).

Generell ist allerdings im Gegensatz zu großen Teilen der zentralnervösen grauen Substanz die weiße Substanz weitgehend erhalten und insgesamt bei SCA3-Patienten weniger schwer betroffen. Läsionen finden sich primär im Cerebellum, im Hirnstamm und im Rückenmark. Hier kommt es zu einem Myelinabbau und einer Atrophie (Rüb et al., 2008).

Ebenfalls weitgehend intakt sind die serotonergen Rafekerne. Dies spricht dafür, dass mit SCA3 assoziierte depressive Symptome nicht Teil des neuropathologischen Krankheitsbildes sind, sondern eher einer reaktiven Natur entsprechen (Rüb et al., 2008).

Ein weiteres neuropathologisch bedeutsames Merkmal von PolyQ-Erkrankungen, das auch in SCA3-Patienten zuverlässig beobachtet werden kann, ist die Bildung intranukleärer Einschlüsse in Neuronen (Bettencourt & Lima, 2011; H. L. Paulson et al., 1997). Diese werden sowohl in Patienten als auch in transgenen Tiermodellen und Zellkulturen beobachtet (Riess et al., 2008). Diese zeigen sich immunopositiv für Ataxin-3 (Rüb et al., 2008) und treten neben dem Nukleus, in dem sich Ataxin-3 bei erkrankten Personen konzentriert und aggregiert (Bettencourt & Lima, 2011), auch im Zytoplasma von Neuronen sowie in Axonen auf (Seidel et al., 2012). Neben mutiertem Ataxin-3 beinhalten die intranukleären Einschlüsse auch Proteine wie Ubiquitin, *Heat Shock Factor* Proteine, Untereinheiten des Proteasoms, Transkriptionsfaktoren, Autophagie-assoziierte Chaperone, weitere PolyQ-Proteine und nicht-expandiertes Ataxin-3 (McLoughlin et al.,

2020). Diese Einschlüsse und gebildeten Aggregate treten neben betroffenen auch in nicht-betroffenen Gehirnarealen auf und ihr Vorkommen ist nicht korrelierend mit dem Ausmaß der Neurodegeneration (Rüb et al., 2008; Seidel et al., 2012). Ob und welcher Zusammenhang zwischen dem Verlust durch das Absterben von Neuronen und den intranukleären Einschlüssen besteht, ist weiterhin unklar und Gegenstand weiterer Studien und Forschungen.

Insgesamt sind die neuropathologisch zu beobachtenden Läsionen, also der Abbau im zentralnervösen System, bei Betroffenen der SCA3 relativ breit, was als eine mögliche Ursache einer Vielzahl bisher nicht wirklich zu erklärender Symptome in Betracht zu ziehen ist (H. Paulson, 2012; Rüb et al., 2008). Weitere detaillierte Informationen über die Muster der zentralnervösen Degeneration sind unabdingbar für das weitere Verständnis und die Entwicklung von Behandlungsmethoden für SCA3 und stellen die Basis für weitere Studien dar (Rüb et al., 2008).

1.2 Ataxin-3

Die Unterschiede in der klinischen Symptomatik der verschiedenen PolyQ-Erkrankungen zeigen, dass das Verständnis der normalen Funktion des mutierten Proteins und seiner Funktion essentiell ist, um auch in der Erforschung der Erkrankungspathologie Fortschritte zu machen (McLoughlin et al., 2020).

Ataxin-3 ist das in SCA3 mutierte und für die Erkrankung verantwortliche Protein, codiert durch das *ATXN3*-Gen auf dem langen Arm von Chromosom 14 (14q24.3–q31) (Kawaguchi et al., 1994). Es ist ein etwa 42 (40 bis 43) kDa schweres (Riess et al., 2008; Weishäupl et al., 2019) Protein, das ubiquitär exprimiert wird und damit im gesamten Körper vorhanden ist (Bettencourt & Lima, 2011). Es befindet sich zytoplasmatisch oder, je nach Zelltyp, nukleär sowie in allen Zellteilen. Die unterschiedliche Lokalisation je nach Zellart lässt vermuten, dass diese eine Bedeutung für die Funktion hat (Klockgether et al., 2019; Matos et al., 2011).

Es handelt sich bei Ataxin-3 um ein evolutionär konserviertes Protein (McLoughlin et al., 2020), das Teil des Ubiquitin-Proteasom-Systems ist (Matos et al., 2011). Als deubiquitinierendes Enzym ist es Teil der Ubiquitin-abhängigen

Proteinqualitätskontrolle (Klockgether et al., 2019). Hierbei handelt es sich um ein System für die Verarbeitung von kurzlebigen oder beschädigten Proteinen (Matos et al., 2011).

Diese Funktion spiegelt sich im Aufbau des Proteins wider. Die N-terminal befindliche Josephin-Domäne ist eine hochkonservierte deubiquitinierende Cysteineprotease (Bettencourt & Lima, 2011). Diese beinhaltet zwei Ubiquitin-bindende Lokalisationen (Nicastro et al., 2009). Die Funktion einer solchen Protease ist das Entfernen von Ubiquitin von Proteinen; im Falle von Ataxin-3 werden bevorzugt Ubiquitinketten mit mindestens vier Ubiquitin-Einheiten bearbeitet (McLoughlin et al., 2020).

Das C-terminale Ende ist durch alternative Splice-Formen insgesamt variabler gestaltet und beinhaltet neben der in SCA3 irregulär expandierten CAG-Wiederholungssequenz zwei oder drei sogenannte *Ubiquitin Interaction Motifs* (UIMs), die ebenfalls für die Bindung und Verarbeitung ubiquitiniertes Proteine eine Rolle spielen (Bettencourt & Lima, 2011) und sich um den PolyQ-Trakt herum befinden (McLoughlin et al., 2020).

Da die Markierung mittels Ubiquitinketten für den zellulären Abbau eines Proteins durch das Proteasom eine entscheidende Rolle spielt, kann mittels dieser Methode die zelluläre Konzentration verschiedener Proteine reguliert werden, indem ihr Abbau beeinflusst wird.

Darüber hinaus gibt es Hinweise auf eine Beteiligung von Ataxin-3 an der Regulation der Transkription und der Organisation des Zytoskeletts (Matos et al., 2011).

Insgesamt sind bereits über 100 Substrate oder Interaktionspartner für Ataxin-3 bekannt. (McLoughlin et al., 2020). Die exakte Funktionalität von Ataxin-3 sowie sämtliche Pfade, an denen es beteiligt ist, sind daher bisher noch nicht abschließend geklärt und Gegenstand weiterer Forschung.

Im Falle eines mutierten Ataxin-3-Proteins durch die bei SCA3 vorhandene CAG-Triplet-Expansion im *ATXN3*-Gen kommt es zum Erkrankungsbild der Spinocerebellären Ataxie Typ 3 / Machado-Joseph Disease. Der exakte Pathomechanismus der Erkrankung ist, ebenso wie die physiologische Funktion von Ataxin-3,

noch nicht vollständig geklärt. Einige Mechanismen und Beobachtungen sind allerdings bekannt oder Gegenstand weiterer Hypothesen und Forschung.

Zum einen kommt es zur bereits beschriebenen Bildung von Proteinaggregaten, die neben anderen Bestandteilen der zellulären *Pathways* auch die pathologischen Proteine beinhalten (McLoughlin et al., 2020; H. L. Paulson et al., 1997; Rüb et al., 2008). Ursprünglichen Annahmen, dass die Bildung der Aggregate an sich neurotoxisch und damit krankheitsverursachend ist, stehen Hypothesen entgegen, die besagen, dass es sich hierbei um einen Schutzmechanismus handelt, um das mutierte Protein aus den zellulären Kreisläufen zu entfernen (Bettencourt & Lima, 2011; Buijsen et al., 2019; Matos et al., 2011). Hierzu gibt es widersprüchliche Erkenntnisse und Studien, sodass bisher kein eindeutiger wissenschaftlicher Konsens gefunden wurde (Matos et al., 2011). Gezeigt werden konnte, korrelierend mit der Bildung von Aggregaten, die Abnahme von löslichem mutiertem Ataxin-3 im Laufe des Fortschreitens der Erkrankung (Nguyen et al., 2013).

Neben dem expandierten ATXN3-Protein wurde in den gebildeten Aggregaten auch zusätzlich das entsprechende Wildtypprotein mit nicht-pathologischem PolyQ-Trakt gefunden. Das wirft den Verdacht auf, dass Ataxin-3 in seiner physiologischen Funktion als Schutzfaktor gegen die Toxizität von PolyQ-Proteinen fungieren könnte. Dies stellt die Wichtigkeit des expandierten PolyQ-Trakts für die Bildung der Proteinaggregate in Frage und dieser Theorie die Möglichkeit gegenüber, dass Wildtyp-Ataxin-3 hier in seiner physiologischen Funktion zu finden ist (Matos et al., 2011).

Die Hypothese, dass es sich bei der Zusammenlagerung von mutiertem Ataxin-3 in zellulären Einschlüssen um eine neuroprotektive Funktion handelt, überschneidet sich teilweise mit dem Wissen, dass das mutierte PolyQ-Protein proteolytisch gespalten wird (Buijsen et al., 2019; Matos et al., 2011). Die dadurch entstehenden Fragmente besitzen eine größere Toxizität als das intakte mutierte Protein (Buijsen et al., 2019). Es wurde insbesondere für SCA3 ein Zusammenhang zwischen der proteolytischen Spaltung des mutierten Ataxin-3 und der Bildung von Proteinaggregaten gezeigt (Bichelmeier et al., 2007; Buijsen et al., 2019; Weber et al., 2017), und auch mögliche Zusammenhänge zwischen dem

Auftreten proteolytischer Spaltung und den von Neuronendegeneration betroffenen Arealen wurden bereits untersucht (Matos et al., 2011). Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass die Entstehung der PolyQ-Fragmente die Aggregatentstehung induziert (Buijsen et al., 2019). Verantwortlich für diese möglicherweise neurotoxische Funktion sind unter anderem Caspasen sowie Calpain-Proteasen (Matos et al., 2011), sodass auch diese in Hinblick auf pathogene Mechanismen der SCA3 weiter untersucht werden sollten.

Zusätzlich wurde festgestellt, dass das mutierte PolyQ-Protein zu einer transkriptionellen Dysregulation führt. PolyQ-beinhaltende Proteine agieren als Transkriptionsfaktoren, wodurch es zu einer möglicherweise schädlichen Veränderung in der Transkription der Zielgene von PolyQ-Proteinen kommt (Buijsen et al., 2019). Als pathogener Mechanismus kommen hiermit also auch DNA-Schäden sowie eine dysfunktionale DNA-Reparatur in Frage (McLoughlin et al., 2020).

Neben den pathologischen und zytotoxischen Eigenschaften des mutierten Ataxin-3-Proteins ist möglicherweise Teil der Pathogenität der Genmutation, dass das Protein mit expandiertem PolyQ-Trakt seine physiologische Funktion verliert oder verändert. Da es gegebenenfalls auch eine Rolle bei der Stressantwort einer Zelle spielt (Matos et al., 2011), könnte es hier zu einer Beeinträchtigung und einer ausgeprägteren Folgereaktion kommen.

Insgesamt ist es bei der Betrachtung der pathologischen Mechanismen in SCA3 wichtig, nicht nur die Funktion des Proteins an sich zu betrachten. Ataxin-3 ist ein ubiquitär vorhandenes, im gesamten Körper des Menschen exprimiertes Protein. Dennoch ist für SCA3 bisher nur ein markanter Zelluntergang in bestimmten Teilen des Gehirns und Nervensystems beschrieben worden. Der Erkrankungsmechanismus ist daher stets im gesamten zellulären Kontext zu sehen (Matos et al., 2011).

1.3 Therapiemöglichkeiten – mögliche Ansätze

Wie bereits beschrieben gibt es bisher keine klinisch erprobte kurative Therapie für SCA3 (Buijsen et al., 2019). Prinzipiell stehen dabei derzeit zwei verschiedene Therapieansätze zur Verfügung: Solche, die symptomatisch behandeln, und andere, die die Erkrankung und die zugrunde liegenden Mechanismen modifizieren

(Ashizawa et al., 2018; Saute & Jardim, 2015). Für einige der in SCA3 prävalenten Symptome existieren bereits symptomatische Therapieoptionen aus anderen Erkrankungen, bei denen diese ebenfalls zum Symptom- und Erkrankungsspektrum gehören (Duarte-Silva & Maciel, 2018; Saute & Jardim, 2015). Beispiele sind zum Beispiel die Anwendung von Physiotherapie (Ashizawa et al., 2018; Duarte-Silva & Maciel, 2018; Saute & Jardim, 2015) oder die Behandlung von Schlafstörungen, chronischen Schmerzzuständen und depressiven Symptomen (Saute & Jardim, 2015). Darüber hinaus sind verschiedene aus anderen Behandlungsansätzen bekannte pharmakologische Substanzen spezifisch für SCA-Symptome getestet worden, bisher ohne, dass es infolgedessen zu einer Zulassung der Substanzen für die Behandlung durch US-amerikanische oder europäische Arzneimittelbehörden kam (Ashizawa et al., 2018).

Krankheitsmodifizierend bestehen verschiedene Ansätze. So gibt es unter anderem Versuche, mittels Autophagie-Induktion als zentralen Mechanismus des zellulären Proteingleichgewichts und damit der neuronalen Gesundheit eben dieses aufrecht zu erhalten und das mutierte Ataxin-3 aus dem zellulären Kreislauf zu entfernen (Buijsen et al., 2019; Duarte-Silva & Maciel, 2018). Hierfür wurde unter anderem Lithium als Substanz getestet, allerdings bisher ohne klare therapeutische Erfolge (Buijsen et al., 2019; Saute & Jardim, 2015). Wie bereits beschrieben (siehe Kapitel 1.2) sind es möglicherweise insbesondere Fragmente des mutierten PolyQ-Proteins, die eine toxische Wirkung haben. Daher besteht ein weiterer Therapieansatz darin, die Entstehung dieser Fragmente zu verhindern, zum Beispiel durch die Inhibition der dafür verantwortlichen Calpain-Proteasen (Buijsen et al., 2019). Auch die transkriptionelle Deregulation wird als mögliches Ziel für pharmakologische Therapien betrachtet (Buijsen et al., 2019; Duarte-Silva & Maciel, 2018).

Neben den bereits beschriebenen pharmakologischen Möglichkeiten werden außerdem gentherapeutische Möglichkeiten erforscht. Buijsen et al. haben 2019 verschiedene der hier zur Verfügung stehenden Angriffsmöglichkeiten dargestellt und den aktuellen Forschungsstand zusammengefasst, unter anderem

therapeutische Ansätze der Reduktion der Menge an mutiertem Ataxin-3 mittels RNA-Wechselwirkungen (*microRNA*, *short hairpin RNA*, *small interfering RNA*), *Antisense*-Oligonukleotiden oder Bearbeitung der DNA selbst (zum Beispiel durch CRISPR-Techniken) (Buijsen et al., 2019). Ein gentherapeutischer Ansatz hat den Vorteil einer hochspezifischen Therapie, die idealerweise mit weniger (unerwünschten) Nebenwirkungen versehen ist. Vielversprechende Ansätze gibt es bisher insbesondere im Bereich der *Antisense*-Oligonukleotide, die auf verschiedene Arten die Menge an expandiertem Ataxin-3 reduzieren könnten und dies in Mausmodellen bereits nachweislich getan haben (McLoughlin et al., 2018; Moore et al., 2017; Toonen et al., 2016, 2017). Dieser Ansatz hat bisher zu zwei klinischen Studien der Phase I geführt: BII132, ein *Antisense*-Oligonukleotid wurde seit 2022 im Rahmen von intrathekalen Injektionen untersucht. Die Studie wurde 2023 beendet, da der Geldgeber seine Finanzierung nicht weiter fortführte (Biogen, 2023). VO659, ein weiteres *Antisense*-Oligonukleotid, wird derzeit im Rahmen der intrathekalen Applikation bei Patienten mit SCA1, SCA3 und HD getestet. Es soll durch das Binden an den *CAG-Repeat* in RNA-Transkripten der ursächlichen Gene die intrazelluläre Konzentration des expandierten Proteins reduzieren (Vico Therapeutics B. V., 2023).

Ebenfalls Teil von Untersuchungen sind mögliche Ansätze im Bereich der Stammzelltherapie (Buijsen et al., 2019; Saute & Jardim, 2015). Hier wird zum Beispiel die Nutzbarkeit von mesenchymalen Stromazellen zur Verzögerung des Krankheitsfortschritts in PolyQ-SCAs untersucht, da diese Zellen die Fähigkeit besitzen, sich in das neuronale Netzwerk einzugliedern und sich in Zellen weiterzuentwickeln, die neurotrophische Faktoren sezernieren (Buijsen et al., 2019).

Da Studien in Tiermodellen Hinweise darauf geben, dass es einfacher ist, den Erkrankungsbeginn hinauszuzögern oder zu verhindern, als insbesondere einen fortgeschrittenen Erkrankungsprogress zu verlangsamen, zu stoppen oder rückgängig zu machen (Ashizawa et al., 2018), sollten Interventionen idealerweise so früh wie möglich erfolgen. Dies bedeutet, auch präataktische Mutationsträger in

Studien einbeziehen zu können, was eine Möglichkeit der Therapieüberwachung für diese Patientengruppe erfordert (siehe Kapitel 1.4).

Da sämtliche der bisher bekannten PolyQ-SCAs zu den seltenen genetischen Erkrankungen gehören, könnte es sich darüber hinaus als lukrativ herausstellen, Gemeinsamkeiten der verschiedenen SCA-Formen als therapeutische Ansätze zu nutzen und hieraus gemeinsame therapeutische Ansätze abzuleiten (Buijsen et al., 2019). Diese Möglichkeit besteht für gentherapeutische Ansätze nur begrenzt, würde aber ansonsten eine Bündelung des zur Verfügung stehenden Forschungskontingents und damit eventuell raschere Fortschritte erlauben.

1.4 Biomarker für SCA3

SCA3 ist, wie in vorangegangenen Kapiteln (siehe 1.1 und 1.3) dargestellt, bisher eine Erkrankung ohne kurativen Therapieansatz. Darüber hinaus können viele der pathologischen Mechanismen bisher an Hirngewebe untersucht (siehe Kapitel 1.1 und 1.2) und damit entweder *post mortem* oder invasiv dargestellt werden. Für die weitere Forschung im Bereich möglicher Therapien ist es daher essenziell, den Erkrankungsverlauf nicht-invasiv zu überwachen und nicht nur den äußerlichen klinischen Zustand, sondern auch das Fortschreiten der internen pathogenen Mechanismen der beteiligten Patienten wiederholt und objektiv festhalten zu können. Nur dann kann ein mögliches Medikament auf seine Wirksamkeit hin überprüft und in Studien in einen effektiven Vergleich gesetzt werden. Es benötigt also einen messbaren, sensiblen Parameter, der den Krankheitsprozess widerspiegelt und dabei gleichzeitig auch prognostisch sensibel ist, wie es zum Beispiel der HbA1c-Wert für Diabetes Mellitus darstellt (Sherwani et al., 2016).

Bisherige Empfehlungen geben zur Überwachung des Fortschreitens einer Erkrankung und damit auch eines möglichen Therapieerfolgs zum Beispiel den SARA-Score an (Saute et al., 2015), der für SCAs validiert wurde (Schmitz-Hübsch et al., 2006; Subramony, 2007). Dieser ist allerdings trotz der breiten Anwendung nicht ohne Kritik, die stets im Hinterkopf behalten werden sollte: So handelt es sich hierbei um einen Score, der auf der klinischen Untersuchung beruht, womit die Möglichkeit besteht, dass die subjektive Einschätzung des

Untersuchers das Ergebnis beeinflusst (Subramony, 2007). Darüber hinaus handelt es sich bei SARA nicht um eine linear zu verwendende Skala; das heißt die gleiche Differenz in der Punktzahl steht nicht immer für den gleichen Unterschied an Symptomschwere (Subramony, 2007).

Es wird daher an der Erforschung weiterer möglicher Parameter für die Überwachung der Krankheitsaktivität gearbeitet. Hierbei werden aufgrund der einfacheren klinischen Machbarkeit unter anderem peripher messbare Marker untersucht, auch wenn es sich bei SCA3 um eine zentralnervöse Erkrankung handelt, die primär im Cerebellum stattfindet. Voraussetzung für die Eignung eines peripher, zum Beispiel im Blutserum bestimmten Markers ist daher entweder, dass es diesem möglich ist, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, oder dass er die Eigenschaft besitzt, sowohl im zentralen Nervensystem (ZNS) als auch peripher aktiviert zu werden (Furtado et al., 2019). Hierbei wurden als Serummarker in der Vergangenheit unter anderem Neuronenspezifische Enolase, ein Marker der bei der Zerstörung von neuronalem Gewebe entsteht, Glutation-Peroxidase, ein antioxidatives Enzym, sowie Eotaxin, ein Enzym, das peripher in T-Lymphozyten und im ZNS durch Astrozyten ausgeschüttet wird, untersucht. Alle drei dieser Marker konnten mit verschiedenen anderen klinischen Merkmalen oder Markern der Krankheitsaktivität korreliert werden, ohne, dass sich hieraus bereits gesicherte Zusammenhänge ergeben hätten, sodass weitere Messungen und Bestätigungen nötig sind (Furtado et al., 2019).

Mittels RNA-Sequenzierung wurde außerdem bereits versucht, weitere transkriptionelle Veränderungen, die im Rahmen einer SCA3-Erkrankung im Blut auftreten, zu ermitteln, um darüber weiterte mögliche Marker ausfindig zu machen (Raposo et al., 2023).

Eine aktuelle, vielversprechende Größe, die als Biomarker für SCA3 im Gespräch und auch in Studien nun schon mehrfach aufgefallen ist, sind die sogenannten Neurofilamente, spezifischer *Neurofilament light-chain* (NfL) und ihre Konzentration im Blutserum. Bei Neurofilamenten handelt es sich um Filamente mit einem Durchmesser von 10 nm, die vor allem in Axonen auftreten und dort für

Wachstum und Erhalt der Axone zuständig sowie an der Übertragung elektrischer Impulse und damit der Erzeugung der Nervenleitgeschwindigkeit beteiligt sind (Yuan et al., 2012). Sie bestehen, sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem, aus vier verschiedenen Untereinheiten, wobei diese sich je nach Lokalisation (zentral gegenüber peripher) unterscheiden. In beiden Fällen am Aufbau der Neurofilamente beteiligt sind die NfL (Yuan et al., 2012). Im Falle von axonalen Schäden, wie sie in einer Vielzahl neurologischer Erkrankungen und Störungen vorkommen, kommt es daher zu einem Anstieg der NfL im Liquor (Gaetani et al., 2019). Durch neue, hochsensitive Untersuchungsmethoden können die NfL auch im Blut nachgewiesen und gemessen werden, sodass eine Überwachung der Blut-NfL-Konzentration möglich ist (Gaetani et al., 2019). Die Konzentration von NfL sowohl im Liquor als auch im Blut wird daher als möglicher diagnostischer sowie prognostischer Biomarker für neurologische Erkrankungen diskutiert (Gaetani et al., 2019). Studien in dieser Hinsicht gibt es zum Beispiel bereits für Parkinson-Erkrankungen, für die sich eine Korrelation zwischen hoher NfL-Konzentration und insbesondere der neurokognitiven und dementiellen Komponente zeigte (Aamodt et al., 2021). Auch für multiple Sklerose (MS), insbesondere progressive Formen, wurde NfL als möglicher Biomarker untersucht. Auch hier zeigten sich signifikante Korrelationen, zum Beispiel zwischen der Konzentration von NfL im Serum und der Wahrscheinlichkeit, in der Bildgebung aktuelle Krankheitsaktivität zu sehen. Außerdem wurden bei in Behandlung befindlichen Patienten niedrigere Konzentrationen gemessen (Yang et al., 2022). Es wurde allerdings auch eine deutliche Überlappung der gemessenen Werte von Erkrankten sowie gesunden Kontrollprobanden gemessen (Yang et al., 2022), was auf Schwierigkeiten für die individuelle Diagnostik im Vergleich zu größer gefassten Probandengruppen hinweist. Auch in der Schlaganfall-Forschung wurden NfL bereits erfolgreich als möglicher prognostischer Marker untersucht (Pekny et al., 2021).

Die damit bereits untersuchte breite Nutzbarkeit von NfL als Biomarker in neurologischen Erkrankungen führte zur weiteren Forschung auch im Bereich der SCA3. Hier zeigten sich Unterschiede in der NfL-Konzentration im Plasma zwischen Mutationsträgern und Kontrollen, sowie ein Zusammenhang zwischen

klinischen Parametern wie dem SARA-Score und der NfL-Konzentration (Garcia-Moreno et al., 2022; Q.-F. Li et al., 2019). Auch in präataktischen Mutationsträgern zeigten sich bereits deutlich erhöhte NfL-Werte im Vergleich zu Kontrollprobanden (Faber et al., 2023; Q.-F. Li et al., 2019). Darüber hinaus konnte eine mögliche Vorhersagekraft für das Maß des cerebellären Volumenverlusts sowie das Voranschreiten der Erkrankung im Sinne einer Verschlechterung klinischer Scores durch die Plasma-NfL-Konzentration festgestellt werden (Coarelli et al., 2021; Q.-F. Li et al., 2019). Der Zusammenhang zwischen, in diesem Fall mittels dem ultra-sensitiven *single-molecule array* (Simoa) bestimmter, NfL-Plasma-Konzentration und Ataxie-bedingten motorischen Defiziten konnte auch für das YACQ84-Mausmodell bestätigt werden (Mengel et al., 2023), wodurch eine Nutzbarkeit für präklinische Studien gegeben sein könnte.

Es ist allerdings hervorzuheben, dass NfL als möglicher Marker axonaler Degeneration nicht krankheitsspezifisch ist (Yang et al., 2022), was insbesondere im Bereich von möglichen Komorbiditäten zu diagnostischen Problemen führen könnte. Darüber hinaus ist ein Einfluss durch den *Body Mass Index* (BMI), das Alter und die Gesamtmenge an Blut vorbeschrieben (Yang et al., 2022).

Ein weiterer Marker, der auch im peripheren Blut bestimmt werden könnte und auf dem diese Arbeit beruht, ist die Konzentration von mutiertem Ataxin-3 in *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs). Hierfür konnte in vorangegangenen Arbeiten und Studien bereits eine Korrelation mit der Erkrankungsschwere, dargestellt mittels SARA, etabliert werden (Gonsior et al., 2021). Auch in präataktischen Mutationsträgern wurden bereits erhöhte Konzentration an mutiertem Ataxin-3 nachgewiesen (Faber et al., 2023).

Die Bestimmung aus PBMCs hat hierbei den Vorteil, dass diese gering invasiv und ohne großes Risiko für den betroffenen Patienten mittels einer einfachen Blutentnahme aus Vollblut gewonnen und nach standardisierten Protokollen behandelt werden können (Santana et al., 2023). Hiermit haben diese einen untersuchungstechnischen Stärke gegenüber Materialien wie zum Beispiel Liquor, dessen Gewinnung stets mit einem höheren Risiko einhergeht.

Da es sich bei Ataxin-3 um das erkrankungsverursachende Protein handelt, besteht die Vermutung, dass hiermit ein insbesondere sehr erkrankungsspezifischer Biomarker gefunden werden könnte, der in geringerem Maße als zum Beispiel NfL durch mögliche Komorbiditäten beeinflusst werden könnte.

Der Zusammenhang zwischen der Ataxin-3-Konzentration im Blut und der Erkrankungsaktivität und -schwere sowie insbesondere weitere Einflussfaktoren neben der Erkrankung an sich werden im Rahmen dieser Arbeit weitergehend untersucht (siehe auch Kapitel 1.8).

Ein weiterer möglicher, nicht-invasiver Ansatz zur Überwachung der Erkrankungsaktivität liegt in der Bildgebung.

So kann zum Beispiel das Volumen von Cerebellum, Basalganglien und Hirnstamm mittels magnetresonanztomographischer Bildgebung *in vivo* bestimmt werden. Dies, für SCA3 insbesondere das Volumen des Striatum als Teil der Basalganglien, zeigte sich als teils sensitiver als Maß für Veränderungen als der SARA-Score, sodass die Nutzung der Volumetrie und struktureller Hirnveränderungen, wie sie im MRT gezeigt werden können, als möglicher Surrogatmarker für klinische Studien diskutiert wird (Reetz et al., 2013).

Ein etwas komplexerer Ansatz ist, neben der Betrachtung struktureller Veränderungen und der Berechnung des Hirnvolumens aus vorliegenden Bildern, die Bestimmung neurochemischer Unregelmäßigkeiten aus MRT-Bildern. Eine Studie, die aus den vorliegenden Bildgebungen sogenannte „MRS Scores“ berechnete, konnte hierfür eine signifikante Korrelation mit dem klinisch bestimmten SARA-Score zeigen und fand auch in präataktischen Mutationsträgern bereits Auffälligkeiten (Joers et al., 2018). Hierdurch könnten möglicherweise Therapieansätze, die bereits das Auftreten erster Erkrankungssymptome verhindern sollen, effektiv überwacht werden, und dadurch die Individuen, die möglicherweise am ehesten von einer Therapie profitieren können, mit in die Studien eingeschlossen (Ashizawa et al., 2018).

Neben Ansätzen, die MRT als Grundlage für die Auswertung bildgebender Verfahren nutzen, wurde auch die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) untersucht. Aufgrund der bei einer PET entstehenden Strahlenbelastung und daraus

resultierenden Sorgen sowie der größeren Verfügbarkeit des MRTs im Vergleich wurden letztere allerdings deutlich besser und breiter untersucht, sodass hier besser validierte Ergebnisse vorliegen (Ashizawa et al., 2018).

1.5 ESMI und BIGPRO – Herkunft der beteiligten Patientenkohorten

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden Proben von Patient*innen untersucht, die entweder im Rahmen des ESMI-Projekts oder als Teil der BigPro-Kohorte gewonnen wurden.

Bei ESMI handelt es sich um die *European Spinocerebellar Ataxia Type 3/Machado-Joseph Disease Initiative*, ein Studienprojekt, dessen Koordination in den Händen von Prof. Thomas Klockgether liegt und das durch das *EU Joint Programme – Neurodegenerative Disease Research* gefördert wurde. In Deutschland sind die Standorte Bonn und Tübingen sowie Aachen, Essen und Frankfurt vertreten; darüber hinaus gibt es beteiligte Zentren in Portugal, Großbritannien und den Niederlanden. Kooperationen bestehen mit Projekten in Frankreich, den USA und Brasilien. Vor dem Hintergrund, dass bisher keine Therapie für die Erkrankung besteht, soll im Rahmen des ESMI-Projekts eine *Trial-Ready*-Kohorte aus SCA3-Patienten und Risikopersonen (Angehörige ersten Grades) zusammengestellt werden, die für zukünftige Medikamentenstudien zur Verfügung steht. Hierfür werden die Studienteilnehmer nach standardisierten Protokollen untersucht (u.a. klinisch-neurologische Untersuchung, Blutentnahmen, ggf. Liquorentnahmen, bildgebende Verfahren, Erfassung von Alltagseinschränkungen) und die Daten in einer zentralen Datenbank zusammengeführt. Weiterer Fokus der Studie ist die Biomarker-Forschung (<https://www.dzne.de/forschung/studien/klinische-studien/esmi>, zuletzt abgerufen am 21.02.2024, 14:41, (DZNE, 2024)). Eine hohe Standardisierung der Proben wurde durch detailliert festgelegte, belegte Protokolle erreicht (Santana et al., 2023).

Für die Erforschung möglicher Einflussfaktoren auf untersuchte Biomarker ist nicht nur eine möglichst große Kohorte notwendig; es sollte auch eine

entsprechende Vielfalt der Patientenkohorte in Hinblick auf zum Beispiel Lebensstil und ethnischen und geographischen Ursprung sichergestellt werden. Darüber hinaus ist SCA3 selbstverständlich eine nicht auf den europäischen Raum beschränkte Erkrankung (siehe Kapitel 1.1). Daher wurden im Rahmen einer Kooperation mit einem Zentrum in Brasilien, beheimatet an der Universidade Federal do Rio Grande do Sul beziehungsweise dem Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Proben aus der BIGPRO (Biomarkers and genetic modifiers in a study of presymptomatic and symptomatic SCA3/MJD carriers)-Studie mit in die Untersuchungen eingeschlossen.

Bei BIGPRO handelt es sich um eine longitudinale Studie, geleitet durch Laura Bannach Jardim, deren primäres Ziel die Erforschung von Biomarkern für den Krankheitsprogress der SCA3 ist. Eingeschlossen wurden die Daten (klinische Untersuchungen, Probenentnahmen, neurophysiologische Untersuchungen und bildgebende Verfahren) von insgesamt 90 Probanden, von denen 84 im Rahmen dieser Arbeit vorlagen und im Rahmen der Kooperation untersucht wurden (<https://bigpro.webnode.page/>, zuletzt abgerufen am 21.02.2024, 15:00, (Bigpro study, 2024)).

1.6 *Time-resolved fluorescence energy transfer (TR-FRET)-Immunoassay*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Konzentration von Ataxin-3 in PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) mittels TR-FRET gemessen und als ein möglicher Biomarker (siehe Kapitel 1.4) für den Erkrankungsverlauf der SCA3 diskutiert.

Im Folgenden wird daher zunächst das Funktionsprinzip eines TR-FRET beschrieben.

Der TR-FRET (*Time-resolved fluorescence energy transfer*, auch *Time-resolved Förster energy transfer*)-Immunoassay ist eine Methode, welche die Quantifizierung auch gering exprimierter spezifischer Proteine erlaubt (Paganetti et al., 2009). Im Rahmen dieser Arbeit wird er verwendet, um den Gehalt von expandiertem ATXN3, das in einer Probe gelöst vorlag, zu bestimmen. Dieser

Immunoassay erlaubt durch seine Einfachheit einen hohen Durchsatz und wird als leicht reproduzierbar beschrieben (Bidinosti et al., 2012).

Diese Methode nutzt die von Theodor Förster beschriebene Energieübertragung zwischen einem angeregten Molekül an ein benachbartes Molekül. Diese Übertragung geschieht ohne Strahlung und ist abhängig von der Distanz der Moleküle zueinander (Förster, 1948).

Im Falle eines TR-FRET-Immunoassays werden zwei verschiedene Antikörper je mit einem als Energiedonor fungierenden Molekül und einem Molekül, das als Energieakzeptor dienen kann, verbunden. Die beiden Antikörper sind so gestaltet, dass sie beide an dem zu quantifizierenden Protein binden. Kommt es zu einer Bindung der beiden Antikörper an das gleiche Protein und damit die beiden Moleküle nah genug aneinander heran, transferiert das Donormolekül Energie an das Akzeptormolekül, sobald es angeregt wird. Beide Moleküle geben in diesem Fall Fluoreszenzsignale jeweils unterschiedlicher Wellenlängen ab, die in einem entsprechenden Gerät gemessen werden können. Die Stärke des TR-FRET-Signals steht dabei im Verhältnis zur Menge des vorhandenen Zielproteins, da das Signal nur zustande kommt, wenn beide Antikörper am gleichen Molekül gebunden haben (Cui et al., 2014).

Als Energiedonormolekül werden dabei die sogenannten Metalle der seltenen Erden, die Lanthanoide, verwendet, in diesem Fall Terbium (Tb). Deren Kryptanden haben mehrere Eigenschaften, die für den TR-FRET-Immunoassay von Vorteil sind. Zum einen liegt die Distanz, über die ein Energietransfer nach Förster möglich ist, für diese Metalle bei bis zu 9 nm (Paganetti et al., 2009), wodurch die Auswahl der Antikörperbindungsstellen innerhalb eines Moleküls etwas freier gestaltet werden kann. Zum anderen können sie als Donor für langlebige Fluoreszenzsignale verwendet werden (Mathis, 1993). Insbesondere der letzte Punkt ist entscheidend für das Design der TR-FRET-Messung. Da das Signal des Energiedonors lange anhält, währt auch das ansonsten kurzlebige Signal des Energieakzeptors lang, was zeitaufgelöste Messungen erlaubt (Mathis, 1993). Durch eine zeitverzögerte Messung können unspezifische kurzlebige Fluoreszenzsignale, die andererseits zum gemessenen Wert beigetragen hätten, eliminiert

werden (Bidinosti et al., 2012; Cui et al., 2014). Hierzu gehören neben allgemeinen Hintergrundemissionen biologischer Bestandteile auch die Signale der ungebundenen, gelösten Moleküle (Mathis, 1993), wobei um den Beitrag letzterer zu minimieren auch die Wahl einer passenden Verdünnung wichtig ist (Paganetti et al., 2009). Um alle diese Faktoren widerzuspiegeln, wurde für diese Messreihe für die Messung des TR-FRET-Immunoassays eine Zeitverzögerung von 100 μs nach dem anregenden Signal gewählt, wie von Imbert et al., 2007 vorgeschlagen im Kontrast zu den zuvor häufig gewählten 50 μs . Dieser Mechanismus der zeitverzögerten Messung ist in Abbildung 1 dargestellt. Als Energieakzeptor wurde in diesem Fall eine D2-Fluorophore gewählt, das in Untersuchungen eine erhöhte Signalstabilität im Vergleich zu ähnlichen verwendeten Molekülen aufweist (Imbert et al., 2007).

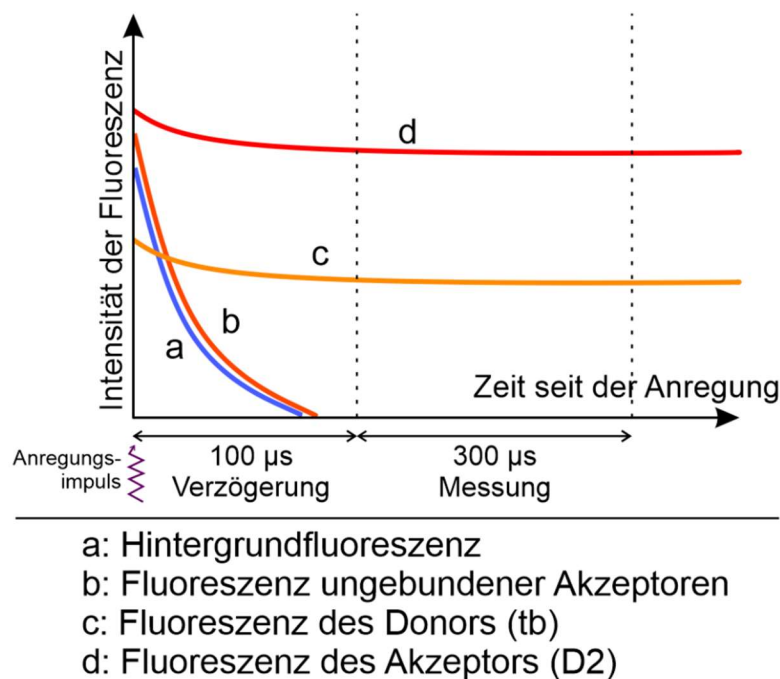


Abbildung 1: Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzsignale während einer TR-FRET-Messung. Die Hintergrundfluoreszenz (a) sowie das Signal, das von ungebundenen Akzeptormolekülen (b) abgegeben wird, ist kurzlebig und klingt kurzfristig nach dem Anregungsimpuls wieder ab. Dadurch, dass das Signal des Energiedonors (c) nach der Anregung lange erhalten bleibt, ist auch das Signal des Energieakzeptors (d) langlebig. Das 300 μs lange Messfenster wird mit einer Zeitverzögerung von 100 μs so gewählt, dass die Störsignale a und b weitmöglichst abgeklungen sind, während das Donor- und Akzeptorsignal noch stabil gemessen werden können. Abbildung modifiziert nach Imbert et al., 2007 und Cui et al., 2014.

Gemessen wird sowohl die Emission bei einem Filter von 615 nm als auch die bei 665 nm. Erstere ist die des Terbiums, also des Energiedonors, und zweitere die des D2, also des Energieakzeptors. Dabei fluoresziert Terbium konstant nach der Anregung, und D2 in Abhängigkeit davon, wie viele Moleküle dieses in der Nähe gebunden haben (Bidinosti et al., 2012).

Aus den beiden gemessenen Werten wird das TR-FRET-Signal berechnet, das als ΔF bezeichnet wird. Dieses stellt die prozentuelle Steigerung des Probenwerts gegenüber des durch den Puffer erzeugten Hintergrunds dar. Dieses normalisiert den abhängigen Messwert (die Fluoreszenz des Terbiums, gemessen bei 665 nm) gegen den unabhängigen Messwert (die Fluoreszenz von D2, gemessen bei 615 nm) und rechnet das Hintergrundsignal heraus (Bidinosti et al., 2012). Die Berechnung des Verhältnisses zwischen der Akzeptor- und der Donor-Fluoreszenz erlaubt dabei das Verrechnen von Pipettierfehlern oder Messunterschieden zwischen den einzelnen Wells (Imbert et al., 2007).

Sämtliche im Rahmen dieser Arbeit für den TR-FRET-Immunoassay verwendete Antikörper sind dabei in Tabelle 17 aufgeführt. Es wurden daraus Messungen mit zwei Antikörperkombinationen durchgeführt, bei denen jeweils ein Antikörper tb- und einer D2-markiert eingesetzt wurde. Beide Kombinationen enthielten dabei den ATXN3 Antikörper Klon 1H9. Dieser Antikörper bindet spezifisch an Ataxin-3, und zwar n-terminal des Polyglutamintrakts (H. L. Paulson et al., 1997). Als weiterer Antikörper wurde in einer Kombination der PolyQ-spezifische Antikörper Klon MW1 eingesetzt, in der anderen ebenfalls ein PolyQ-spezifischer Antikörper Klon 1C2. MW1 bindet an und detektiert damit Polyglutaminketten mit über 15 Glutaminen. Dabei werden diese eher gebunden, je länger sie sind. Bei Vorhandensein von Proteinen mit expandierten und nicht-expandiertem PolyQ-Trakt werden erstere von MW1 bevorzugt gebunden, wie Versuche mit Huntingtin gezeigt haben (Ko et al., 2001). Im Zusammenhang mit 1H9 wird MW1 verwendet, um Ataxin-3 mit einer expandierten PolyQ-Region zu markieren. Diese Kombination wurde von Nguyen et al., 2013 auf Ataxin-3 adaptiert und angewendet und auch von Gonsior et al., 2021 verwendet und bestätigt. 1C2 wurde ursprünglich für die Interaktion mit dem TATA-Box Bindungsprotein eingesetzt. Es bindet aber in niedrigen Konzentrationen spezifisch an den expandierten PolyQ-Trakt der

Proteine, die im Erkrankungsmechanismus von PolyQ-Erkrankungen eine Rolle spielen, wie neben Chorea Huntington auch die Spinozerebelläre Ataxie Typ 3 (Trottier et al., 1995). Hierbei werden PolyQ-Regionen mit mehr als 37 Glutaminen erkannt. Die Kombination aus 1H9 und 1C2 ist daher ebenfalls geeignet, die Menge des expandierten Ataxin-3 in einem Probenhomogenat zu bestimmen. Für einzelne Messreihen wurde außerdem die Menge an Gesamt-Ataxin-3 bestimmt. Dies geschah mit der Kombination der beiden Ataxin-3-spezifischen Antikörper 1H9 und Ataxin-3 N-term (Gonsior et al., 2021). Die Funktionsweise des FRETs ist noch einmal schematisch am Beispiel der Kombination 1H9-tb und MW1-D2 in Abbildung 2 dargestellt.

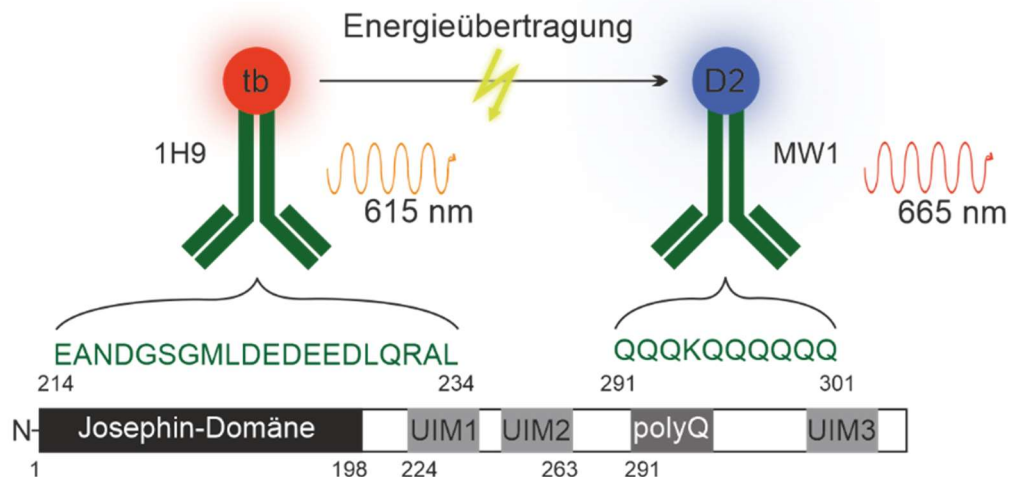


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips eines FRETs. Hier am Beispiel der Antikörperkombination 1H9 und MW1. Beide Antikörper binden an das Ataxin-3-Protein. Die Aminosäureabfolge (kodiert nach dem Einbuchstabencode) der Bindungsstellen und ihre Lokalisation innerhalb des Ataxin-3-Proteins ist im unteren Teil der Abbildung dargestellt. Die Zahlen geben hierbei die Aminosäureposition innerhalb des Proteins an. Die beiden Antikörper sind mit unterschiedlichen Fluorophoren markiert, tb (Terbium) und D2. Bei Anregung durch einen Laserimpuls kommt es zum einen zu einer Fluoreszenzemission von 615 nm durch das tb-Molekül, zum anderen kann dieses an in der Nähe gebundenes D2 Energie übertragen. Diese Energieübertragung nach Förster (FRET) sorgt für eine Anregung des D2-Moleküls, das dadurch eine Fluoreszenz der Wellenlänge 665 nm abgibt. UIM = Ubiquitin-interagierende Domäne, polyQ = Polyglutamintrakt.

Beim TR-FRET handelt es sich, wie bereits beschrieben, um eine hochsensitive Methode, die in der Lage ist, bereits kleine Änderungen in der gemessenen Konzentration wahrzunehmen. Es ist daher neben sorgfältiger Arbeit insbesondere wichtig, mögliche Einflussfaktoren auf die Messung zu erkennen und zu

spezifizieren, um das Messergebnis besser zu interpretieren und Ataxin-3 als potenziellen Biomarker besser nutzbar zu machen. Ein Beispiel, bei dem dies bereits in der klinischen Praxis angewandt wird, ist zum Beispiel der altersadaptierte Cut-Off bei der Messung von D-Dimeren, wodurch die Voraussagekraft in Hinblick auf die Erkennung venöser Thromboembolien signifikant verbessert wurde (Schouten et al., 2013). Nachdem die Messung der Ataxin-3-Konzentration in PBMCs mittels TR-FRET bereits in vorangegangenen Studien als möglicher Biomarker im Gespräch war (Gonsior et al., 2021) ist die weitere Evaluation möglicher Einflussfaktoren daher der nächste Schritt in Hinblick auf die Evaluation des hier vorliegenden Potentials, da sich hierdurch auch möglicherweise die Sensibilität und Spezifität erhöhen lassen könnte.

1.7 SNP-Varianten im *ATXN3*- und *PARK2*-Gen

Bei einem Einzelnukleotid-Polymorphismus (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) handelt es sich um eine genetische Variante, bei der sich eine einzelne Base an einer definierten Stelle im Genom in einem Individuum oder auf einem Allel dieses Individuums im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung unterscheidet. Bei Einzelnukleotid-Austauschen handelt es sich um die häufigste Art der Mutation, die, um als Polymorphismus und damit SNP bezeichnet zu werden, verbreitet sein und damit in mindestens 1 % der Bevölkerung auftreten muss. (Wright, 2005). Es gibt geschätzt etwa 3 bis 10 Millionen dieser Varianten im menschlichen Genom (Wright, 2005). Im Rahmen des 1000 genomes project wurden insgesamt über 84 Millionen SNPs beschrieben (1000 Genomes Project Consortium et al., 2015).

SNPs können sowohl in Abschnitten der kodierenden DNA als auch in nicht-kodierenden Abschnitten auftreten. Im Falle eines SNPs in einem kodierenden Abschnitt kann es aufgrund der Redundanz des genetischen Codes zu einer stillen Mutation kommen, wenn das betroffene Gentiplot nach dem Austausch weiterhin für die gleiche Aminosäure kodiert. Darüber hinaus sind sogenannte *Non-sense*-Mutationen möglich (Verlust eines Start-Codons durch die Mutation oder Erzeugung eines vorzeitigen Stopp-Codons) sowie *Missense*-Mutationen (das betroffene Gentiplot kodiert für eine andere Aminosäure). Durch diese

Möglichkeiten kann der Aufbau sowie die Funktion des kodierten Proteins verändert werden oder verloren gehen, sodass es zu krankheitserzeugenden oder -modifizierenden Effekten kommen kann.

Innerhalb von SCA3 lässt sich zum Beispiel beobachten, dass es zwar eine deutliche und mehrfach beschriebene inverse Korrelation zwischen der Anzahl an CAG-Wiederholungen im *ATXN3*-Gen und dem *Age at Onset* gibt, erstere aber nicht in der Lage ist, sämtliche Variationen im Erkrankungsalter zu erklären. Es lässt sich daher der Einfluss weiterer genetischer Variablen vermuten (Riess et al., 2008). Insgesamt lässt die zunehmende Forschung im Bereich der SNPs eine größere Bedeutung dieser vermuten, auch durch SNPs in nicht-kodierenden Bereichen.

Im Zuge dieser Arbeit wird die Häufigkeit und Verteilung sowie verschiedene Korrelationen von drei SNPs im *ATXN3*-Gen sowie von zwei SNPs im *PARK2*-Gen genauer untersucht. Diese werden in Kapitel 1.7.1 und 1.7.2 genauer dargestellt.

1.7.1 Untersuchte Varianten im *ATXN3*-Gen

Im Rahmen dieser Arbeit werden insgesamt drei Varianten im *ATXN3*-Gen untersucht. Diese sind in Tabelle 2 tabellarisch dargestellt und im Folgenden genauer beschrieben. Ist eine Position nach Basenpaar (Bp) angegeben, so ist diese stets für eine Anzahl von 13 CAG-Wiederholungen beschrieben.

Tabelle 2: Untersuchte Varianten im *ATXN3*-Gen. A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, Arg = Arginin, Gly = Glycin, Met = Methionin, Tyr = Tyrosin, Val = Valin, STOP = Stopp-Codon, Bp = Basenpaar. Häufigkeiten nach <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/> (NCBI SNP, 2024).

rs-Nummer	Lokalisation nach Basenpaar (bei 13 CAG-Wiederholungen) und Exon	Basenaustausch inkl. Häufigkeit, bezogen auf die Gesamtbevölkerung	Aminosäurenaustausch
rs1048755	Bp 669, Exon 8	G (75 %) -> A (25 %)	Val -> Met
rs12895357	Bp 987, Exon 10	G (89 %) -> C (11 %)	Gly -> Arg
rs7158733	Bp 1118, Exon 10	C (81 %) -> A (19 %)	Tyr -> STOP

Der SNP mit rs1048755 liegt in Exon 8 des *ATXN3*-Gens an der Stelle von Basenpaar 669 und wird daher im Rahmen dieser Arbeit so bezeichnet (Bp 669). Es liegt damit vor dem *CAG-Repeat* im Exon 8. Der Austausch der Base G durch A an dieser Stelle im *ATXN3*-Gen führt zu einem Aminosäuren-Austausch von Valin durch Methionin und damit zu einer *Missense*-Variante (NCBI SNP, 2024). G ist an dieser Stelle mit 75 % deutlich häufiger vertreten als die Variante A. Beschrieben wurde diese Variante bereits zuvor, inklusive Unterschieden zwischen Mutationsträgern und Kontrollprobanden (Gaspar et al., 2001; Goto et al., 1997). Die Mutation wird als vermutlich gutartig eingestuft (NCBI SNP, 2024); eine Studie beschrieb keinen Zusammenhang mit erhöhter intergenerationaler Instabilität der Anzahl an *CAG*-Wiederholungen (Maciel et al., 1999).

Der SNP mit rs12895357 liegt in Exon 10 des *ATXN3*-Gens an der Stelle von Basenpaar 987 (SNP Bp 987). Da er damit kurz hinter dem *CAG-Repeat* liegt, ist die exakte Position von der Anzahl der *CAG*-Wiederholungen abhängig. Die hier erfolgte Angabe ist für den Fall von 13 *CAG*-Wiederholungen. In 11 % der Fälle wird das üblicherweise hier befindliche G durch ein C ausgetauscht, was zu einer *Missense*-Mutation führt. Glycin wird hierbei durch Arginin ersetzt (NCBI SNP, 2024). In seltenen Fällen kommt es zu einem Austausch durch A oder T (NCBI SNP, 2024). Auch dieser SNP ist bereits vorbeschrieben worden (Kawaguchi et al., 1994). Die Mutation wird nach NCBI ((NCBI SNP, 2024), Stand 22.02.2024) als gutartig beziehungsweise wahrscheinlich gutartig eingestuft. Es wurde allerdings bereits eine erhöhte intergenerationale Instabilität der Länge der *CAG-Repeat*-Kette abhängig von der Ausprägung beobachtet (Maciel et al., 1999; Riess et al., 2008).

Der SNP mit rs7158733 liegt ebenfalls in Exon 10 des *ATXN3*-Gens an der Stelle von Basenpaar 1118 (SNP Bp 1118) und damit in relativer Nähe zu SNP Bp 987 und der *CAG-Repeat*-Kette. Auch hier ist durch die Lage nach dem *CAG-Repeat* die exakte Position abhängig von der Anzahl der *CAG*-Wiederholungen und in diesem Fall für 13 *CAG*-Wiederholungen angegeben. In 81 % der Fälle liegt hier ein C vor, in 19 % ein A. In vereinzelt Fällen sind auch ein Austausch durch G

und T beschrieben (NCBI SNP, 2024). Dieser SNP wurde zusammen mit Bp 669 vorbeschrieben (Maciel et al., 1999), wobei hier auch Bp 987 weitergehend mit-untersucht wurde. Da das Codon für Tyrosin durch das Vorliegen der Base A zu einem Stoppcodon wird, liegt in diesem Fall eine *Nonsense*-Mutation vor, die zu einer verkürzten Ataxin-3-Isoform führt (Goto et al., 1997; Weishäupl et al., 2019). Auch für diese Variante ist eine erhöhte intergenerationale Instabilität der Länge der *CAG-Repeat*-Kette beschrieben (Maciel et al., 1999).

Neben den möglich Einflussfaktoren, die die jeweilige Ausprägung selbst auf den Krankheitsverlauf haben könnte, sind insbesondere SNPs, die aufgrund ihrer regionalen Nähe mit dem *CAG-Repeat* in Verbindung stehen, von Interesse. Bei einer klaren und eindeutigen Zuordnung zwischen SNP und mutiertem Allel besteht die Möglichkeit, das entsprechende Allel mittels spezifischer Therapien, beispielsweise im Rahmen der Verwendung von *Antisense*-Oligonukleotiden (siehe Kapitel 1.3) anzusprechen und dadurch gezielt zu regulieren (Claassen et al., 2020; Hauser et al., 2022; Helm et al., 2022). Dies verspricht möglicherweise eine nebenwirkungsärmere Therapie, sollte hierdurch die Synthese des Wildtyp-Proteins nicht ebenfalls beeinflusst werden.

1.7.2 Untersuchte Varianten im *PARK2*-Gen

Parkin ist ein vom *PARK2*-Gen kodiertes Protein. *PARK2* liegt auf Chromosom 6q25.2-27. Im Fall von Mutationen in diesem Gen und damit Veränderungen im entsprechenden Protein kommt es zu einer autosomal-rezessiv vererbten, juvenilen Form von Parkinson (Kitada et al., 1998). Damit rückt Parkin zum Einen in den Fokus von SCA3-bezogenen Forschungen, da bei Typ IV der SCA3 Parkinson-ähnliche Symptome beschrieben sind, also ein möglicher Zusammenhang vermutet werden kann (Rüb et al., 2013), zum Anderen bestehen bereits beschriebene und untersuchte Interaktionen zwischen Parkin und Ataxin-3. Bei Parkin handelt es sich um eine E3-Ligase, deren Stabilität und Aktivität durch die deubiquitinierende Funktion von Ataxin-3 beeinflusst und reguliert wird (Durcan & Fon, 2013). Insbesondere die mutierte (expandierte) Form von Ataxin-3 wird als Förderer des Abbaus von Parkin beschrieben (Durcan et al., 2011; Durcan &

Fon, 2011), sodass Parkin als Interaktionspartner auch in Hinblick auf mögliche pathogene Mechanismen in den Fokus rückt und SNPs des *PARK2*-Gens relevanten Teil von Forschungen macht.

Die beiden im Rahmen dieser Arbeit untersuchten SNPs sind im Folgenden näher beschrieben und in Tabelle 3 tabellarisch dargestellt.

Tabelle 3: Untersuchte Varianten im *PARK2*-Gen. A = Adenin, C = Cytosin, G = Guanin, Asn = Asparagin, Leu = Leucin, Ser = Serin, Val = Valin, Bp = Basenpaar. Häufigkeiten nach ALFA Allele Frequency, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/> (NCBI SNP, 2024).

rs-Nummer	Lokalisation nach Basenpaar und Exon	Basenaustausch inkl. Häufigkeit, bezogen auf die Gesamtbevölkerung	Aminosäurenaustausch
rs1801474	Bp 601, Exon 4	G (96 %) -> A (4 %)	Ser -> Asn
rs1801582	Bp 1239, Exon 10	G (84 %) -> C (16 %)	Val -> Leu

Der erste von zwei untersuchten SNPs mit der Bezeichnung rs1801474 liegt an der Stelle von Bp 601 in Exon 4 des *PARK2*-Gens und wird daher im Rahmen dieser Arbeit als SNP Exon 4 bezeichnet. Durch den Austausch des in der überwiegenden Anzahl der Fälle vorliegenden G mit einem A kommt es zu einer *Mis-sense*-Mutation, bei der Serin durch Asparagin ersetzt wird (NCBI SNP, 2024). In NCBI wird diese Mutation als gutartig gewertet (NCBI SNP, 2024). Es gibt Beschreibungen, dass die Ausprägung des SNPs das AAO von Parkinson-Patienten beeinflusst (Ghione et al., 2007), sodass ein ähnlicher Zusammenhang auch für SCA3 untersucht werden könnte.

Der zweite SNP mit der Bezeichnung rs1801582 liegt an der Stelle von Bp 1239 in Exon 10 (SNP Exon 10). Innerhalb der allgemeinen Bevölkerung liegt hier in der Mehrzahl der Fälle ein G vor, das durch ein C ersetzt werden kann. Hierdurch kommt es zu einer *Missense*-Mutation, bei der Valin durch Leucin ersetzt wird. In seltenen Fällen findet ein Austausch durch A oder T statt (NCBI SNP, 2024). Diese Variante wird nach NCBI ebenfalls als gutartig gewertet (NCBI SNP, 2024). Ähnlich wie für den SNP Exon 4 gibt es hier ebenfalls beschriebene

Zusammenhänge mit dem AAO von Parkinson-Patienten (Ghione et al., 2007). Darüber hinaus wurde auch bereits eine Korrelation bestimmter Ausprägungen mit dem Auftreten von sporadischen Parkinson-Erkrankungen beschrieben (Lücking et al., 2003).

1.8 Ziel der vorliegenden Arbeit

Als eine von mehreren mittlerweile bekannten PolyQ-Erkrankungen handelt es sich bei der Spinocerebellären Ataxie Typ 3 um eine der häufigeren. Für die in den 1970er Jahren erstmals beschriebene, autosomal dominant vererbte Erkrankung besteht bisher kein klinisch erprobter und erfolgreicher kausaler oder kurativer Therapieansatz. Bisherige Therapiemöglichkeiten beschränken sich daher auf symptomatische Therapien sowie Forschungsprozesse zu krankheitsmodulierenden Möglichkeiten und Ansätzen.

Um deren Effektivität, insbesondere perspektivisch für klinische Studien, untersuchen und objektiv beurteilen zu können, fehlen für die SCA3 bisher zuverlässige Biomarker. Aktuell wird der Krankheitsfortschritt primär mittels klinischer Scores wie dem SARA-Score festgehalten und beurteilt. Dieser ist allerdings wenig sensitiv für kleinteilige Änderungen und hat darüber hinaus weitere in den vorangehenden Kapiteln beschriebene Schwächen, die andere Möglichkeiten zur Therapieüberwachung erforderlich machen. Darüber hinaus sollten Therapien idealerweise begonnen werden, bevor es bereits zu ausgeprägten Symptomen durch möglicherweise nicht rückgängig zu machende neuronale Schäden kommt, sodass auch für präataktische und damit präklinische Patienten zuverlässige Marker benötigt werden.

Ataxin-3 wurde bereits in vorangegangenen Studien und Arbeiten innerhalb der gleichen Forschungsgruppe als möglicher vielversprechender Biomarker für SCA3 diskutiert und untersucht. Da es sich bei mutiertem und damit expandiertem Ataxin-3 um das krankheitsverursachende Protein der SCA3 handelt, besteht hier das Potential für einen Biomarker mit einer hohen Spezifität.

Für die einfache Verfügbarkeit wird ihm Rahmen dieser Arbeit die Ataxin-3-Konzentration in einem gering invasiv zu gewinnenden Medium untersucht: In aus peripherem Blut isolierten PBMCs. Diese können mittels einer einfachen

Blutentnahme ohne großes Risiko für den betroffenen Patienten entnommen und weiter untersucht werden. Die Proben wurden dann mittels des hochsensitiven TR-FRET-Immunoassays untersucht und die Konzentration des Ataxin-3-Proteins bestimmt, sodass Korrelationen zu bereits etablierten (klinischen) Parametern der Krankheitsüberwachungen erforscht werden konnten.

Zur Standardisierung eines möglichen Biomarkers ist die Bestimmung möglicher nicht-krankheitsrelevanter Einflussfaktoren unabdingbar. Diese Arbeit machte es sich daher insbesondere zur Aufgabe, mittels einer Vergrößerung der bereits im Rahmen des ESMI-Projekts durch andere Doktoranden untersuchten ESMI-Kohorte, sowie das Hinzuziehen von Proben einer zweiten Kohorte der BIGPRO-Studie, verschiedene mögliche Einflussfaktoren auf die Ataxin-3-Konzentration zu analysieren. Außerdem wurde das Spektrum der Herkunft der Probanden dadurch, dass die BIGPRO-Kohorte in Brasilien angesiedelt ist, erweitert.

Eine zweite Zielsetzung war die Untersuchung möglicher genetischer Einflussfaktoren, in diesem Fall insgesamt fünf untersuchte SNPs, auf den Krankheitsverlauf. Hierdurch bestehen möglicherweise prädiktive oder, durch mögliche Assoziationen von SNPs mit bestimmten Faktoren der SCA3, auch krankheitsmodulierende Therapieansätze. Darüber hinaus wurde versucht, eine weitere, vereinfachte Methode der SNP-Bestimmung zu etablieren, um die Analysen an dieser Stelle einfacher zu gestalten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Probenherkunft, Ethikvotum

Die verwendeten Proben stammen sowohl aus dem zuvor beschriebenen ESMI-Programm und damit aus Zentren innerhalb von Europa, als auch vom Serviço de Genética Médica des Hospital de Clínicas de Porto Alegre in Porto Alegre, Brasilien.

Die Gewinnung der Proben geschah nach hoch-standardisierten und festgelegten Protokollen innerhalb ESIMs beziehungsweise am Institut in Brasilien. Es wurden dabei anamnestische Daten wie Alter, Geschlecht, Zeitpunkt der letzten Mahlzeit und krankheitsbezogene Informationen erhoben sowie Blutproben abgenommen. Zur Analyse nach Tübingen weitergegeben wurde ein Milliliter EDTA-Blut für die DNA-Isolation zum Zwecke der genetischen Analysen sowie ein mit Hilfe eines *Cell Preparation Tubes* von BD aus Vollblut gewonnenes Pellet aus mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMC).

Die Untersuchungen an humanem Probenmaterial von Patienten wurde von der lokalen Ethikkommission genehmigt. Die zugehörigen Ethiknummern sind 598/2011BO1 und 911/2019BO2 für die Sammlung der Proben und die Analysen respektive. Für die Abnahme der Blutproben bei den Europäischen Partnern lagen Genehmigungen der entsprechenden lokalen Behörden vor.

2.1.2 Geräte

Tabelle 4: Verzeichnis der verwendeten Geräte

Gerät	Gerätetyp	Hersteller (Hauptsitz, Land)
µCuvette	µCuvette G1.0	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)
Geldokumentation	Transilluminator View (UV-light)	Bio biostep GmbH (Burkhardtsdorf, Deutschland)

Gerät	Gerätetyp	Hersteller (Hauptsitz, Land)
Gelkammer Agarosegele	PerfectBlue™ gel sys- tem, Mini S	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)
	PerfectBlue™ gel sys- tem, Mini L	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)
Gelkammer Blot	Western- Mini-PROTEAN System	Tetra Bio-RAD (Hercules, USA)
Heizblock	ThermoStat plus	Eppendorf SE (Ham- burg, Deutschland)
Heizschüttler	Thermomixer compact	Eppendorf SE (Ham- burg, Deutschland)
Kamera	Olympus Camedia C- 4040 (4.1 MP)	Olympus (Hamburg, Deutschland)
Kühlzentrifuge	Centrifuge 5415R	Eppendorf SE (Ham- burg, Deutschland)
LightCycler	LightCycler® 480 II	Roche (Basel, Schweiz)
PCR-Cycler <i>mocycler</i>	<i>Ther-</i> G-STORM Thermal Cy- cler GSI	Alpha Metrix Biotech GmbH (Rödermark, Deutschland)
	T100 Thermal Cycler	Bio-RAD (Hercules, USA)
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf SE (Ham- burg, Deutschland)
Plattenlesegerät	Sirius HT / Synergy HT	BioTek (Winooski, USA)
Schüttelwasserbad	Schüttelwasserbad 1083	LAUDA-GFL, Gesell- schaft für Labortechnik mbH (Burgwedel, Deutschland)

Gerät	Gerätetyp	Hersteller (Hauptsitz, Land)
Sequenzierer	CEQ 8000 Genetic Analysis System	Beckman Coulter (Brea, USA)
	CEQ 8800 Genetic Analysis System	Beckman Coulter (Brea, USA)
Sterilbank	HeraSafe HS12	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Swing-Out-Zentrifugen	Centrifuge 5810R	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)
	Centrifuge 5804	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)
Thermodrucker	Drucker P91D	Mitsubishi (Ratingen, Deutschland)
TR-FRET-Laser	TRF Light Unit 337 nm	PerkinElmer (Waltham, USA)
TR-FRET-Lesegerät	Multimode Plate Reader EnVision	PerkinElmer (Waltham, USA)
Transferkammer	TE22 Mighty Small Transfer Unit	Hoefer (Holliston, USA)
UV-Tisch	UV-Transilluminator	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)
Vakuumtrockner	Concentrator 5301	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)
Wasserbad	Wasserbad WB 7	Memmert GmbH + Co. KG (Schwabach, Deutschland)
Western-Blot-Dokumentation	LI-COR® Odyssey® Fc Imaging System	LI-COR Biosciences (Lincoln, USA)
Zentrifugen	Centrifuge 5810	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)

Gerät	Gerätetyp	Hersteller (Hauptsitz, Land)
	Centrifuge 5418	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)
	Centrifuge 5417C	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 5: Verzeichnis der verwendeten Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie / Reagenz	Hersteller (Hauptsitz, Land)
Ammoniumpersulfat (für die Molekularbiologie, für die Elektrophorese)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Ampuwa H ₂ O (Wasser für Injektionszwecke)	Fresenius Kabi (Bad Homburg vor der Höhe, Deutschland)
Acrylamid-Lösung (30%) – Mix 29:1 für die Molekularbiologie	PanReac AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Agarose (SeaKem LE Agarose)	Lonza Group AG (Basel, Schweiz)
Betainlösung	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Bicin (für Pufferlösungen)	PanReac AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Bis-Tris	PanReac AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Borsäure	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
<i>Bovine Serum Albumin Fraction V</i> (BSA)	Roche (Basel, Schweiz)
Coomassie Brilliantblau G250	Honeywell Fluka (Charlotte, USA)
cOmplete Mini, EDTA-frei	Roche (Basel, Schweiz)
CutSmart® Buffer	New England Biolabs (Ipswich, USA)

Chemikalie / Reagenz	Hersteller (Hauptsitz, Land)
1,4-Dithiothreitol (DTT) (für die Biochemie)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
DPBS (1x) (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Gibco® by Life Technologies™ (Carlsbad, USA)
Essigsäure (Eisessig) 100% (wasserfrei zur Analyse)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol absolute p. A.	PanReac AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Dinatriumsalzlösung	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Ficoll™ PM400	GE Healthcare (Chicago, USA)
Formamid	Applied Biosystems (Foster City, USA)
<i>GenomeLab DNA Size Standard Kit – 600</i>	Beckman Coulter (Brea, USA)
<i>GenomeLab Separation Buffer</i>	Beckman Coulter (Brea, USA)
<i>GenomeLab Separation Gel</i>	Beckman Coulter (Brea, USA)
Glycerin 86% (ROTIPURAN®, p.a.)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Glycin (PUFFERAN® ≥99 %, p.a.)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Lithiumdodecylsulfat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Isopropanol	Honeywell International Inc. (Charlotte, USA)
Magermilchpulver (Skim Milk Powder for Microbiology)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

Chemikalie / Reagenz	Hersteller (Hauptsitz, Land)
Methanol	Honeywell International Inc. (Charlotte, USA)
MgSO ₄ 25mM	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)
MOPS (für die Molekularbiologie)	PanReac AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Natriumacetat (NaAcetat)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumchlorid (ACS, Reag. Ph. Eur.)	VWR International (Leuven, Belgien)
Natriumfluorid (NaF)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH ₂ PO ₄)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
NEBuffer™ 3.1	New England Biolabs (Ipswich, USA)
<i>O'GeneRuler DNA Ladder Mix</i>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Orange G	Omikron (Neckarwestheim, Deutschland)
<i>PCR Grade Nucleotide Mix</i>	Roche (Basel, Schweiz)
<i>PCR Buffer 10x</i> (inkl. 15 mM MgCl ₂)	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Phenolrot (für die Zellkultur)	PanReac AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
<i>Precision Plus Protein™ Dual Color Standards</i>	Bio-RAD (Hercules, USA)
<i>Protein Assay Dye Reagent Concentrate</i>	Bio-RAD (Hercules, USA)
<i>Pwo</i> -DNA-Polymerase	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)
<i>Q-Solution (5x)</i>	Qiagen (Hilden, Deutschland)

Chemikalie / Reagenz	Hersteller (Hauptsitz, Land)
<i>Reactionbuffer complete for Pwo-DNA-Polymerase</i>	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)
<i>Reactionbuffer incomplete for Pwo-DNA-Polymerase</i>	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)
Salzsäure, rauchend 37%, ROTIPURAN® p.a., ACS, ISO	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
SDS-Pellets (≥99%, für die Biochemie)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Taq DNA Polymerase	Qiagen (Hilden, Deutschland)
TEMED	PanReac AppliChem (Darmstadt, Deutschland)
Triton X® 100	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Trizma® (Primärstandard und Puffer, ≥99,9% (Titration), kristallin)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Tween®-20 für die Molekularbiologie	PanReac AppliChem (Darmstadt, Deutschland)

2.1.4 Verbrauchsmittel

Tabelle 6: Verzeichnis der verwendeten Verbrauchsmittel

Bezeichnung	Hersteller (Hauptsitz, Land)
0,2 ml 8er-Streifen PCR-Gefäße	STARLAB International GmbH (Hamburg, Deutschland)
96-Well Assay Mikrotiterplatte	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhäusen, Deutschland)
Amersham™ Protran™ Premium 0.2µm Nitrocellulose Blotting Membran	GE Healthcare (Chicago, USA)
BD Vacutainer® CPT™ (Mononuclear Cell Preparation Tube)	BD / Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, USA)

Bezeichnung	Hersteller (Hauptsitz, Land)
<i>epT.I.P.S. Reloads 0.1-10µl</i>	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)
<i>epT.I.P.S. Reloads 2-200µl</i>	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)
<i>FrameStar® 480/384 with qPCR Adhesive Seal, white wells, clear frame</i>	4titude (Surrey, UK)
Reaktionsgefäß (Cellstar® Zentrifugenröhrchen) 15 ml und 50 ml	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhau- sen, Deutschland)
GeXP Probenplatte	Beckman Coulter (Brea, USA)
GeXP Pufferplatte	Beckman Coulter (Brea, USA)
Kryoröhrchen CRYO.S™	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhau- sen, Deutschland)
Pasteur Kapillarpipetten, 230 mm	Wilhelm Ulbrich GdbR (Bamberg, Deutschland)
ProxiPlate™-384 TC Plus, weiß, hohl mit 384 Vertiefungen, mit De- ckel	PerkinElmer (Waltham, USA)
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhau- sen, Deutschland)
Safe-Lock Reaktionsgefäße 1,5 ml, braun (UV-Licht-geschützt)	Eppendorf SE (Hamburg, Deutschland)
TipOne Pipettenspitzen 10µl	STARLAB International GmbH (Ham- burg, Deutschland)
TipOne Pipettenspitzen 200µl	STARLAB International GmbH (Ham- burg, Deutschland)
TipOne Pipettenspitzen 1000µl	STARLAB International GmbH (Ham- burg, Deutschland)
Whatman medium thickness 3MM Chr paper (Filterpapier)	GE Healthcare (Chicago, USA)

2.1.5 Hersteller-Kits

Tabelle 7: Verzeichnis der verwendeten Hersteller-Kits

Bezeichnung	Hersteller (Hauptsitz, Land)
<i>FlexiGene DNA Kit</i>	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<i>GenomeLab DTCS Quick Start Kit</i>	Beckman Coulter (Brea, USA)
<i>LightCycler® 480 High Resolution Melting Master</i>	Roche (Basel, Schweiz)
<i>QIAquick® Gel Extraction Kit</i>	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<i>SYPRO® Ruby Protein Blot Stain</i>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

2.1.6 Puffer und Lösungen

Tabelle 8: Verzeichnis der verwendeten Puffer und Lösungen. In Klammern ist jeweils die Methode angegeben, bei der diese Verwendung finden.

Puffer / Lösung	Zusammensetzung / Herstellung
APS-Lösung, 10 % (Western Blot)	10 % Ammoniumpersulfat ddH ₂ O ad 30 ml
Bis-Tris-Puffer (3,5x) (Western Blot)	1,25 M Bis-Tris ddH ₂ O ad 200ml
<i>Blocking</i> -Puffer, 5 % (Western Blot)	5 % Magermilchpulver TBS (1x) ad 5ml
BSA, 1 % (Bradford-Assay)	10 % BSA (10 µg/µl) ddH ₂ O
cComplete Mini, verdünnt (Lyse PBMC-Proben)	1 Tablette cComplete Mini, EDTA-frei ddH ₂ O ad 2 ml
Detektionspuffer (TR-FRET)	50 mM NaH ₂ PO ₄ 400 mM NaF 0,1 % BSA 0,05 % Tween-20
1 M DTT-Lösung (Western Blot)	1 M 1,4-Dithiothreitol ddH ₂ O
0,5 M EDTA; pH 8,0	0,5 M EDTA

Puffer / Lösung	Zusammensetzung / Herstellung
(Agarosegel)	ddH ₂ O ad 1 l pH auf 8,0 einstellen
100 mM EDTA-Na ₂ ; pH 8,0 (Sequenzierung)	100 mM EDTA-Na ₂ H ₂ O ad 250 ml pH auf 8,0 einstellen
Ethanol, 70% (Sequenzierung)	70 % Ethanol (100 %) H ₂ O ad 50 ml
LDS-Puffer (4x) (Western Blot)	2 ml 2,5 M Tris-HCl pH 8,5 2,5 ml 86 % Glycerin 0,125 ml 1 % Phenolrot 0,4 g Lithiumdodecylsulfat (LDS) 0,003 g EDTA 0,375 ml Coomassie
Lysepuffer (Lyse PBMC-Proben)	40 µl cComplete Mini, verdünnt 1% TritonX 100 DPBS ad 1ml
MOPS-Laufpuffer (20x) (Western Blot)	1 M MOPS 1 M Trizma 69,4 mM SDS 20,5 mM EDTA ddH ₂ O
MOPS-Laufpuffer (1x) (Western Blot)	MOPS-Laufpuffer (20x) 1:20 mit ddH ₂ O verdünnt
3 M NaAcetat; pH 5,2 (Sequenzierung)	3 M NaAcetat ddH ₂ O ad 250 ml pH auf 5,2 einstellen
5 M NaCl-Lösung (Western Blot)	5 M Natriumchlorid ddH ₂ O
Orange G Ladepuffer (6x) (Gelelektrophorese)	0,044 mM Orange G 0,35 mM Ficoll™ PM400 ddH ₂ O ad 50 ml

Puffer / Lösung	Zusammensetzung / Herstellung
1 % Phenolrot (Western Blot)	1 % Phenolrot ddH ₂ O
<i>Protein Assay Dye Reagent Concentrate</i> , 1:2,2 verdünnt (Bradford-Assay)	45 % <i>Protein Assay Dye Reagent Concentrate</i> (100 %) ddH ₂ O
<i>Stripping-Puffer</i> ; pH 2,0 (Western Blot)	25 mM Glycin 34,7 mM SDS 1 % Tween 20 ddH ₂ O mit 25 % Salzsäure auf pH 2,0 einstellen
TBE-Puffer (10x) (Agarosegel)	890 mM Trizma 890 mM Borsäure 4 % 0,5 M EDTA-Na ₂ pH 8,0 ddH ₂ O ad 1 l
TBE-Puffer (1x) (Agarosegel)	10 % TBE-Puffer (10x) ddH ₂ O ad 2 l
TBS (10x) (Western Blot)	10 % 1 M Tris-HCl (pH 7,5) 30 % 5 M NaCl-Lösung ddH ₂ O
TBS (1x) (Western Blot)	10 % TBS-Puffer (10x) ddH ₂ O
TBS-T (10x) (Western Blot)	10 % 1 M Tris-HCl (pH 7,5) 30 % 5 M NaCl-Lösung 1% Tween 20 ddH ₂ O
TBS-T (1x) (Western Blot)	10 % TBS-T (10x) ddH ₂ O
Transferpuffer (20x) (Western Blot)	0,5 M Bicin 0,5 M Bis-Tris 20,5 mM EDTA ddH ₂ O ad 500 ml

Verwendung	Bezeichnung	Hersteller (Hauptsitz, Land)
<i>EnVision 2105</i> (TR-FRET-Immunoassay)		
<i>Microplate Reader Synergy HT</i> (Bradford-Assay)	Gen5™ (Version 2.01.14)	BioTek (Winooski, USA)
Bedienung und Analyse <i>CEQ 8000 Genetic Analysis System</i>	GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System (Version 10.2)	Beckman Coulter (Brea, USA)
Statistische Auswertung	GraphPad Prism 9	GraphPad Software (San Diego, USA)
Darstellung Western Blot	Image Studio (Version 4.0.21)	LI-COR Biosciences (Lincoln, USA)
Bedienung und Analyse LightCycler	LightCycler® 480 SW (Version 1.5.1)	Roche (Basel, Schweiz)
Datenverwaltung und Darstellung	Microsoft Office (Word + Excel) 365 Plus	Microsoft Corporation (Redmond, USA)

2.1.8 *Primer*

Sämtliche nachfolgend genannten *Primer* wurden von der Firma metabion international AG (Planegg, Deutschland) hergestellt. Sofern nicht anders angegeben, wurde als Aufreinigung „entsalzt“ ausgewählt. Sämtliche *Primer* wurden in einer Konzentration von 10 pmol/μl eingesetzt.

Tabelle 10: Verzeichnis der Primer für die Bestimmung der CAG-Wiederholungen mittels Fragmentlängenanalyse

Primer	Sequenz (5' - 3')	Produktlänge [bp]
ATXN3 vorwärts (P247), 5'Cy5 fluoreszenzmarkiert	CCA GTG ACT ACT TTG ATT CG	202 (bei 10 CAG-Wiederholungen)

Primer	Sequenz (5' - 3')	Produktlänge [bp]
ATXN3 (P248)	rückwärts TGG CCT TTC ACA TGG ATG TGA A	

Tabelle 11: Verzeichnis der Primer für die Sanger-Sequenzierung

Primer	Sequenz (5' - 3')	Produktlänge [bp]
ATXN3 vorwärts (R479)	CCA GTG ACT ACT TTG ATT CGA	405
ATXN3 (R478)	rückwärts GGT AAC TGC TCC TTA ATC CAG GG	(bei 10 CAG-Wiederholungen)

Tabelle 12: Verzeichnis der Primer für die Fragmentlängenanalyse / Duplex-PCR zur Bestimmung des ATXN3-SNPs Bp 987

Primer	Sequenz (5' - 3')	Produktlänge [bp]
ATXN3 SNP Bp 987 vorwärts (T982)	CCA GTG ACT ACT TTG ATT CG	
ATXN3 SNP Bp 987 rückwärts 1 (U312), 5'IRD700 fluoreszenzmarkiert, HPLC-aufgereinigt	ACT CTG TCC TGA TAG GTC CCC	181 (bei 10 CAG-Wiederholungen)
ATXN3 SNP Bp 987 rückwärts 2 (U313), 5'Cy5 fluoreszenzmarkiert, HPLC-aufgereinigt	ACT CTG TCC TGA TAG GTC CCG	

Tabelle 13: Verzeichnis der Primer für die High-Resolution Melting Analysis

Primer	Sequenz (5' - 3')	Produktlänge [bp]
ATXN3 SNP Bp 669 vorwärts (T979), HPLC-aufgereinigt	TAC TAG AGC TTA TTT GCC AG	221
ATXN3 SNP Bp 669 rückwärts (T980), HPLC-aufgereinigt	CAG AGC CCT CTG CAA ATC CT	
ATXN3 SNP Bp 1118 vorwärts (T981), HPLC-aufgereinigt	GCT CAC CAT TCA TCA TGT TCG C	160
ATXN3 SNP Bp 1118 rückwärts (T981), HPLC-aufgereinigt	GGT AAC TGC TCC TTA ATC CAG GG	

Tabelle 14: Verzeichnis der Primer für die Restriktionsfragmentlängenanalyse

Primer	Sequenz (5' - 3')	Produktlänge [bp]
PARK2 SNP Exon 4 (Bp 601) vorwärts (T890)	GCC CGA TTC TCT TGG CAG TA	696
PARK2 SNP Exon 4 (Bp 601) rückwärts (T891)	TCA CAC CGT AAC AGA AGC CC	
PARK2 SNP Exon 10 (Bp 1239) vorwärts (T886)	TGT TGC ACA AGC CAG AGG AA	648
PARK2 SNP Exon 10 (Bp 1239) rückwärts (T887)	GGG CAT GAT GCT GCT AAA GG	

Tabelle 15: Verzeichnis der Primer für die Etablierung einer Multiplex-PCR nach Costa et al., 2019

Primer	Sequenz (5' - 3')	Produktlänge [bp]
ATXN3 vorwärts (U277)	CAA TTA TTG GCC TTT CTG AAC C	1537
ATXN3 rückwärts (U278)	TGC TCC TTA ATC CAG GGA AAT TTA G	(bei 10 CAG-Wiederholungen)
ATXN3 vorwärts (U279)	CCA GTG ACT ACT TTG ATT CG	1508
ATXN3 rückwärts (U280)	TGC CTG GTC AGC TAT AAG CA	(bei 10 CAG-Wiederholungen)

2.1.9 Restriktionsendonukleasen

Tabelle 16: Verzeichnis der Restriktionsendonukleasen. N = A/C/G/T, K = G/T, M = A/C

Enzym	Schnittstelle (mit * markiert)	Hersteller (Hauptsitz, Land)
AlwNI (#R0514S)	5'...CAGNNN*CTG...3' 3'...GTC*NNNGAC...5'	New England Biolabs (Ipswich, USA)
BaeGI (#R0708S)	5'...GKGCM*C...3' 3'...C*MCGKG...5'	New England Biolabs (Ipswich, USA)

2.1.10 Antikörper

Tabelle 17: Verzeichnis der Antikörper für den TR-FRET-Immunoassay

Antikörper	Eigenschaften	Hersteller (Hauptsitz, Land)
N-terminale Aminosäuren (ab96316, N-term)	Anti-Ataxin-3, Tb-Label	Abcam (Cambridge, UK)
MW1 (AB_528290)	Anti-PolyQ (>15Q), D2-Label	Developmental Studies Hybridoma Bank (Iowa City, USA)
1H9 (MAB5360)	Anti-Ataxin-3, D2-Label	Chemicon International (Temecula, USA)

Antikörper	Eigenschaften	Hersteller (Hauptsitz, Land)
1H9 (MAB5360)	Anti-Ataxin-3, Tb-Label	Chemicon International (Temecula, USA)
5TF1-1C2 (MAB1574)	Anti-PolyQ (>37Q), D2-Label	Merck Millipore (Burlington, USA)

Tabelle 18: Verzeichnis der Antikörper für den Western Blot

Antikörper	Eigenschaften	Hersteller (Hauptsitz, Land)
Primärantikörper anti-Ataxin-3, produziert in Maus	Anti-Spinocerebellar Ataxia Type 3 Antibody, clone 1H9, MAB5360	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Primärantikörper anti- α -Spectrin, produziert in Maus	Anti-Spectrin alpha chain (nonerythroid) Antibody, clone AA6, MAB1622	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Sekundärantikörper anti-Mouse	IRDye® 800CW, Goat anti-Mouse	LI-COR Biosciences (Lincoln, USA)

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Isolation aus EDTA-Vollblut

Die für die genetischen Analysen eingesetzte DNA wurde unter Verwendung des *FlexiGene DNA Kits* (Qiagen) aus 1 ml EDTA-Blut gewonnen. Dabei wurde nach Anleitung des Herstellers (Version von 02/2003) vorgegangen. Diese wurde wie folgt modifiziert: Die Zentrifugation in Schritt 2 erfolgte mit 3000 x g statt der angegebenen 2000 x g, um ein besser haftendes Pellet aus den Zellbestandteilen zu garantieren. Die Schritte 7 bis 11 wurden wie folgt angepasst: Nach Zugabe von Isopropanol und Ausfällen der DNA wurde diese mit einer Pipettenspitze aus der Lösung aufgenommen, zum Waschen in 70%igem Ethanol geschwenkt und anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dann wurde mit Schritt 12

(5 Minuten Lufttrocknen) fortgefahren. Die Menge an FG3-Puffer, die in Schritt 13 für das Lösen der DNA verwendet wird, wurde in Abhängigkeit der Größe des DNA-Pellets zwischen 30 und 100 µl gewählt.

Im Anschluss wurde die DNA-Konzentration in der Probe mit Hilfe der µCuvette (Eppendorf) im Photometer bestimmt. Zur Konzentrationsbestimmung wurde hierbei die Extinktion bei 260 nm herangezogen. Auskunft über die Reinheit gaben zusätzlich die Quotienten E260/E280 (dieser sollte bei etwa 1,8 liegen; ein deutlich niedrigerer Wert ist ein Indiz für eine Proteinverunreinigung) und E260/E230 (dieser sollte größer als 2,0 sein; ein kleinerer Wert indiziert eine Verunreinigung durch zum Beispiel kontaminierende Salze wie EDTA) sowie die Extinktion bei 320 nm (diese sollte so gering wie möglich sein).

Die Lagerung sämtlicher DNA-Proben erfolgte bei -20 °C.

2.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Eine Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) dient der gezielten Vervielfältigung eines zuvor festgelegten Genabschnitts (Mullis et al., 1986).

Hierzu wurde zunächst ein reaktionsspezifischer *Master-Mix* aus der hitzestabilen *Taq*-Polymerase, dNTPs und den *Primern*, die den Beginn und das Ende des zu vervielfältigenden Genabschnitts darstellen, hergestellt und die zu amplifizierende DNA hinzugegeben. Mit diesem Reaktionsansatz wurden nun mehrere Zyklen eines festgelegten Protokolls durchgeführt. Der erste Schritt jedes Zyklus besteht aus der Trennung (Denaturierung) der zusammen vorliegenden DNA-Stränge durch eine Temperatur von 95 °C. Im Anschluss wird die Reaktionslösung abgekühlt auf die *Annealing*-Temperatur der verwendeten *Primer*, die sich dabei an die DNA anlagern. Sämtliche verwendeten *Primer* sind in Tabelle 10 bis Tabelle 15 dargestellt. Im anschließenden, dritten Schritt erfolgt wieder eine Erhöhung der Temperatur auf 72 °C, um das optimale Arbeiten der DNA-Polymerase und damit die Elongation des DNA-Abschnittes zu gewährleisten.

Diese drei Schritte werden mehrfach wiederholt; mit jedem Zyklus erhöht sich dabei die Menge des gewünschten Genprodukts.

Das Prinzip der PCR wurde im Rahmen der Bestimmung der Anzahl der CAG-Wiederholungen, für die Bestimmung des SNPs Bp 987 des *ATXN3*-Gens (einmal im Rahmen der Grundlage für die Sanger-Sequenzierung des *ATXN3*-Gens und einmal als Duplex-PCR mit Fragmentlängenanalyse), für die Bestimmung der SNPs Bp 669 und Bp 1118 des *ATXN3*-Gens im Rahmen der *High Resolution Melting Analysis (HRMA)*, für die Bestimmung der SNPs Exon 4 und Exon 10 des *PARK2*-Gens und für die Etablierung einer weiteren Multiplex-PCR zur einfacheren Bestimmung mehrerer SNPs in einem Ansatz verwendet.

Die verschiedenen Analysen erfordern dabei verschiedene *Master-Mixe*. Für deren Herstellung wurden zunächst sämtliche Komponenten abzüglich der DNA-Polymerase in ein Reaktionsgefäß pipettiert und gründlich durchmischt. Die Zugabe der Polymerase erfolgte nach Lagerung des Reaktionsgefäßes auf einem Eisblock. Auch die weiteren Pipettierschritte und die Lagerung bis zur Weiterverarbeitung im PCR-Cycler erfolgten auf einem Eisblock, um ein vorzeitiges Reagieren der Polymerase zu verhindern.

In Tabelle 19 bis Tabelle 21 sind die jeweiligen Reaktionsansätze der einzelnen PCRs dargestellt. Im Falle einer spezifischen einzusetzenden DNA-Menge wurde, sofern nötig, die ursprüngliche Probe mit H₂O Ampuwa auf die nötige Konzentration verdünnt.

Tabelle 19: Reaktionsansatz für die PCR für die Bestimmung der Anzahl der CAG-Wiederholungen

Reagenz	Menge
Puffer 10x	2,5 µl
Vorwärtsprimer (P247)	1 µl
Rückwärtsprimer (P248)	1 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl
dNTPs	0,5 µl
Q-Solution	4 µl
H ₂ O Ampuwa	12,8 µl
DNA	3,0 µl

Tabelle 20: Reaktionsansatz für die PCR für die Sanger-Sequenzierung des ATXN3-Gens

Reagenz	Menge
Puffer 10x	2 µl
Vorwärtsprimer (R479)	1 µl
Rückwärtsprimer (R478)	1 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl
dNTPs	0,4 µl
Q-Solution	4 µl
H ₂ O Ampuwa	11,4 µl
DNA (120 ng in 2 µl)	2,0 µl

Tabelle 21: Reaktionsansatz für die PCR für die Bestimmung der SNPs Exon 4 und Exon 10 des PARK2-Gens

Reagenz	Menge
Puffer 10x	2 µl
Vorwärtsprimer (siehe Tabelle 14)	1 µl
Rückwärtsprimer (siehe Tabelle 14)	1 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl
dNTPs	0,5 µl
H ₂ O Ampuwa	13,3 µl
DNA (50-100 ng in 2 µl für den SNP Exon 4)	2,0 µl

Der jeweilige Reaktionsansatz wurde in 8er-Streifen mit 0,2 ml-Reaktionsgefäßen pipettiert und diese anschließend in den PCR-Cycler eingesetzt. Dieser wurde auf die jeweiligen in Tabelle 22 und Tabelle 23 dargestellten PCR-Programme programmiert und die PCR gestartet.

Das Reaktionsprodukt wurde bis zur Weiterverarbeitung und Analyse bei 4 bis 10 °C gelagert.

Tabelle 22: PCR-Programm für die PCR für die Bestimmung der Anzahl der CAG-Wiederholungen und für die PCR für die Sanger-Sequenzierung des ATXN3-Gens

Temperatur	Dauer	Zyklen
94 °C	5 min	1
94 °C	60 s	
60 °C	60 s	30
72 °C	120 s	
72 °C	10 min	1
10 °C	∞	1

Tabelle 23: PCR-Programm für die PCR für die Bestimmung der SNPs Exon 4 und Exon 10 des PARK2-Gens

Temperatur	Dauer	Zyklen
95 °C	5 min	1
95 °C	45 s	
55 °C	60 s	35
72 °C	45 s	
72 °C	10 min	1
10 °C	∞	1

Die PCR-Bedingungen für die Bestimmung des SNP Bp 987 des *ATXN3*-Gens über Duplex-PCR mit Fragmentlängenanalyse, die PCR-Protokolle für die *HRMA* sowie die für die Etablierung der Multiplex-PCR nach Costa et al., 2019 sind in den jeweiligen Kapiteln ausgeführt und dargestellt (siehe Kapitel 2.2.7, Kapitel 2.2.8 und Kapitel 2.2.10 respektive).

2.2.3 Gelelektrophorese

Zur Überprüfung des Erfolgs der PCR und zum Nachweis des gewünschten Genprodukts wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Diese kann Substanzen wie DNA nach ihrer Größe auftrennen, sodass außerdem eine grundlegende Einschätzung der Länge des Genprodukts möglich ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl 1%-ige als auch 2,5%-ige Agarosegele verwendet.

Zur Herstellung eines solchen Gels wurde die entsprechende Menge Agarosepulver (0,9 g für ein 1%-iges Gel / 2,25 g für ein 2,5%-iges Gel) in 90 ml TBE-Puffer (1x) durch Erhitzen in einem Erlenmeyerkolben in der Mikrowelle vollständig aufgelöst. Im Anschluss wurde die Lösung mit 5 µl Ethidiumbromid versetzt, in eine Form gegossen und ein Kamm mit der gewünschten Anzahl an Taschen eingesteckt. Nach Aushärten des Gels über mindestens 20 Minuten konnte der Kamm entfernt und das Gel in eine mit TBE-Puffer (1x) gefüllte Gelkammer eingesetzt werden. Nun konnte jede Tasche mit 10 µl eines 1:1 Gemischs aus PCR-Produkt und Orange G Ladepuffer (6x) beladen werden, sowie zusätzlich pro Taschenreihe eine Tasche mit 5 µl eines Markers (*O'GeneRuler DNA Ladder Mix*) als Längenstandard.

Eine im Anschluss über das Gel angelegte elektrische Spannung von 80 bis 120V sorgte dafür, dass die negativ geladenen DNA-Fragmente sich von der Kathode zur Anode durch das Gel bewegten. Kleinere Fragmente bewegen sich dabei schneller in Richtung der Anode als größere, sodass eine Auftrennung nach Länge der Fragmente geschieht.

Nach einer Laufzeit von 30 bis 60 Minuten wurde das Gel zur Begutachtung und Dokumentation auf den UV-Tisch gelegt. Dadurch, dass das dem Gel hinzugefügte Ethidiumbromid beim Interkalieren mit DNA sein Absorptionsspektrum verändert, können die Banden durch UV-Licht sichtbar gemacht und damit der Erfolg der PCR überprüft werden.

2.2.4 Extraktion von DNA aus Agarosegel

Sowohl für die Sanger-Sequenzierung als auch die Analyse des SNP Bp 1118 des *ATXN3*-Gens wurde das PCR-Produkt mit Hilfe eines Agarosegels aufgetrennt. Die Banden wurden auf dem UV-Tisch dargestellt, mit einem Skalpell einzeln ausgeschnitten und in entsprechend vorbereitete und beschriftete 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben. Im Anschluss wurde das PCR-Produkt unter Verwendung des *QIAquick® Gel Extraction Kits* (Qiagen) zur Weiterverarbeitung aus den ausgeschnittenen Agarosegel isoliert und aufgereinigt. Dabei wurde nach Anleitung des Herstellers (Quick-Start Protocol, Version von 07/2015) vorgegangen. Diese wurde wie folgt modifiziert: Für sämtliche Schritte, in denen die Wahl

zwischen einer Zentrifugation mit 17.900 x g oder der Applikation von Vakuum bestand, wurde die Zentrifugation gewählt. Für Schritt 3 wurden die Reaktionsgefäße in einen Heizschüttler bei 300 rpm eingesetzt, um ein gleichmäßiges Auflösen des Gels zu garantieren. Die maximale Menge an Probenvolumen pro *QIAquick column* in Schritt 5 wurde auf 700 µl festgelegt. Für den Überschuss bei größeren Probenvolumina wurde ein zweiter Durchlauf durchgeführt. Schritt 6 wurde gestrichen. In Schritt 7 wurde aufgrund der knapp bemessenen Größe der *QIAquick column* nur 740 µl PE-Puffer hinzugegeben. Schritt 9 wurde wie folgt angepasst: Zunächst wurden 30 µl EB-Puffer in die Mitte der Membran pipettiert. Nach Zentrifugation für eine Minute wurde der Durchlauf erneut in die Mitte der Membran pipettiert, um die Reinheit der DNA zu erhöhen. Im Anschluss wurde die DNA-Konzentration in der Probe mit Hilfe der µCuvette (Eppendorf) im Photometer bestimmt (siehe auch Kapitel 2.2.1). Die Lagerung der isolierten DNA erfolgte bei -20 °C.

2.2.5 Bestimmung der Anzahl der CAG-Wiederholungen

Die Anzahl der CAG-Wiederholungen in den verwendeten Proben wurde mittels einer PCR und einer sich anschließenden Fragmentlängenanalyse bestimmt. Dafür wurde zunächst die in Kapitel 2.2.2 beschriebene PCR zur Bestimmung der Anzahl der CAG-Wiederholungen durchgeführt. Durch Auftragen auf ein 1%-iges Agarosegel, wie Kapitel 2.2.3 beschrieben, wurde der Erfolg der PCR überprüft. Hierbei konnte auch bereits eine Einteilung der Proben in solche mit (mindestens) einem expandierten *ATNX3*-Allel und Kontrollen erfolgen: Die Proben der Kontrollprobanden zeigten lediglich eine Bande geringer Größe, in der sich beide Allele mit CAG-Wiederholungen im normalen Bereich befanden, während bei den Proben der SCA3-Mutationsträger neben der kurzen eine längere Bande mit der expandierten CAG-Wiederholung zu sehen war.

Da einer der beiden für die PCR verwendeten *Primer* eine Fluoreszenzmarkierung beinhaltete, konnte im Anschluss die Länge der entstandenen DNA-Fragmente mit Hilfe eines Sequenzierers bestimmt werden. Dies geschah durch Mitarbeiter*innen des Instituts für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik der Universitätsklinik Tübingen mit dem Sequenzierer *CEQ 8800 Genetic*

Analysis System (Beckman Coulter) der Diagnostik. Die Ergebnisse wurden im Anschluss zur Auswertung zurück übergeben. Abbildung 3 zeigt ein Beispiel einer Fragmentlängenanalyse. Aus der bestimmten Länge des gesamten PCR-Produkts (in der Formel durch x repräsentiert), bestehend aus der CAG-Repeat-Region sowie einer flankierenden Sequenz von insgesamt 159 Basenpaaren, konnte nun die Anzahl der CAG-Wiederholungen mit Hilfe folgender Formel bestimmt werden:

$$\frac{x - 159}{3}$$

Hierdurch konnte auch die zuvor anhand der Auswertung des Kontrollgels getätigte Einteilung in Kontrollprobanden und Träger des expandierten *ATXN3*-Allels überprüft werden.

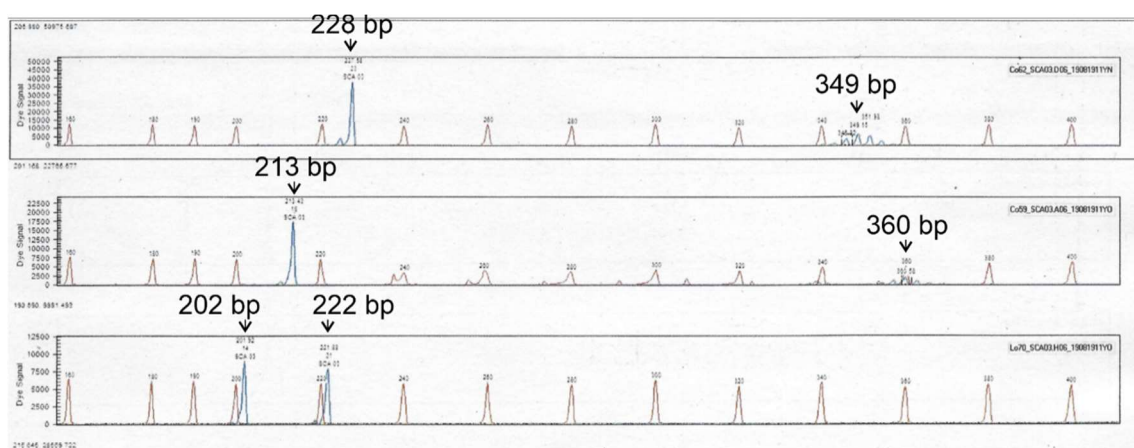


Abbildung 3: Darstellung der Messergebnisse einer Fragmentlängenanalyse für die Proben Co62, Co59 und Lo70 in der Analysesoftware des Sequenzierers. Die regelmäßig erscheinenden roten Peaks stellen einen mitlaufenden Längenstandard dar. Die blauen Peaks entsprechen dem Fluoreszenzsignal des PCR-Produktes (erzeugt durch die Markierung am eingesetzten Primer), welches je nach CAG-Repeat-Länge variiert. Die Länge des PCR-Produkts wurde hier, unter Zuhilfenahme des Längenstandards, durch die Software bestimmt und im Fall von Nachkommastellen gerundet. Für nicht-expandierte Allele (228 bp, 213 bp, 202 bp, 222 bp) gab es einen einzelnen, eindeutig zu erkennenden Peak. Die Replikation bei längeren CAG-Wiederholungen war etwas fehlerbehafteter, sodass mehrere kleine Peaks nebeneinander entstanden. Aus diesen wurde der jeweils größte ausgewählt (349 bp, 360 bp) und als Wert x für die Berechnung verwendet. Bei nicht-ganzzahligen Ergebnissen wurden diese gerundet.

2.2.6 Sanger-Sequenzierung des *ATXN3*-Gens zur Bestimmung des SNP Bp 987

Grundlage der Etablierung der Bestimmung des SNP Bp 987 des *ATXN3*-Gens mittels der Duplex-PCR war die Bestimmung durch die bereits etablierte Sequenzierung nach Sanger zum Vergleich.

Bei dieser Methode wurde zunächst die in Kapitel 2.2.2 beschriebene PCR zur Sanger-Sequenzierung des *ATXN3*-Gens durchgeführt. Diese replizierte den Abschnitt des Gens, der den SNP Bp 987 enthält, sowie die direkt davor gelegene *CAG-Repeat*-Region.

Nach der PCR wurden die Proben wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen. Hierdurch konnte zum einen der Erfolg der PCR überprüft werden. Zum anderen konnte, da die Region der *CAG*-Wiederholungen Teil des PCR-Produkts war, erneut zwischen Proben von Kontrollprobanden und denen von *SCA3*-Mutationsträgern unterschieden werden. Im Falle eines vorhandenen expandierten *CAG*-Bereichs wurden die beiden Allele in der Gelelektrophorese getrennt und konnten daher im Folgenden isoliert voneinander analysiert werden, wodurch eine Zuteilung des SNPs zum jeweiligen Allel möglich war.

Die jeweiligen Banden wurden dafür auf dem UV-Tisch nicht nur dargestellt, sondern auch mit einem Skalpell einzeln ausgeschnitten. Die DNA wurde im Anschluss mit der in Kapitel 2.2.4 geschilderten Methode aus dem Agarosegel isoliert, sodass nun mit dem so gewonnenen Material die eigentliche Sequenzierung durchgeführt werden konnte.

Diese erfolgte nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al., 1977). Dabei wird dem Reaktionsansatz (siehe Tabelle 24), im Gegenzug zur herkömmlichen PCR, nur ein *Primer* hinzugefügt, sowie der *Quickstart*-Mix aus dem *GenomeLab DTCS Quick Start Kit*. Dieser enthält neben den zur Vervielfältigung von DNA benötigten dNTPs zusätzlich ddNTPs der verschiedenen Nukleobasen, die jeweils mit respektiv unterschiedlichen Fluoreszenzmolekülen versehen sind. Beim Einbau dieser in die DNA wird die Synthese des DNA-Strangs an dieser Stelle unterbrochen, sodass DNA-Fragmente verschiedener Länge entstehen, die im Anschluss mit Hilfe eines Sequenzierers nach ihrer Länge aufgetrennt werden können. Durch die unterschiedliche Fluoreszenz der

verschiedenen Nukleinbasen ist es möglich, jeweils zu bestimmen, mit welcher Base die Synthese des jeweiligen Strangs beendet wurde, sodass durch die Auftrennung nach Länge die DNA-Sequenz analysiert werden kann.

Dieser Vorgang ist schematisch in Abbildung 4 dargestellt.

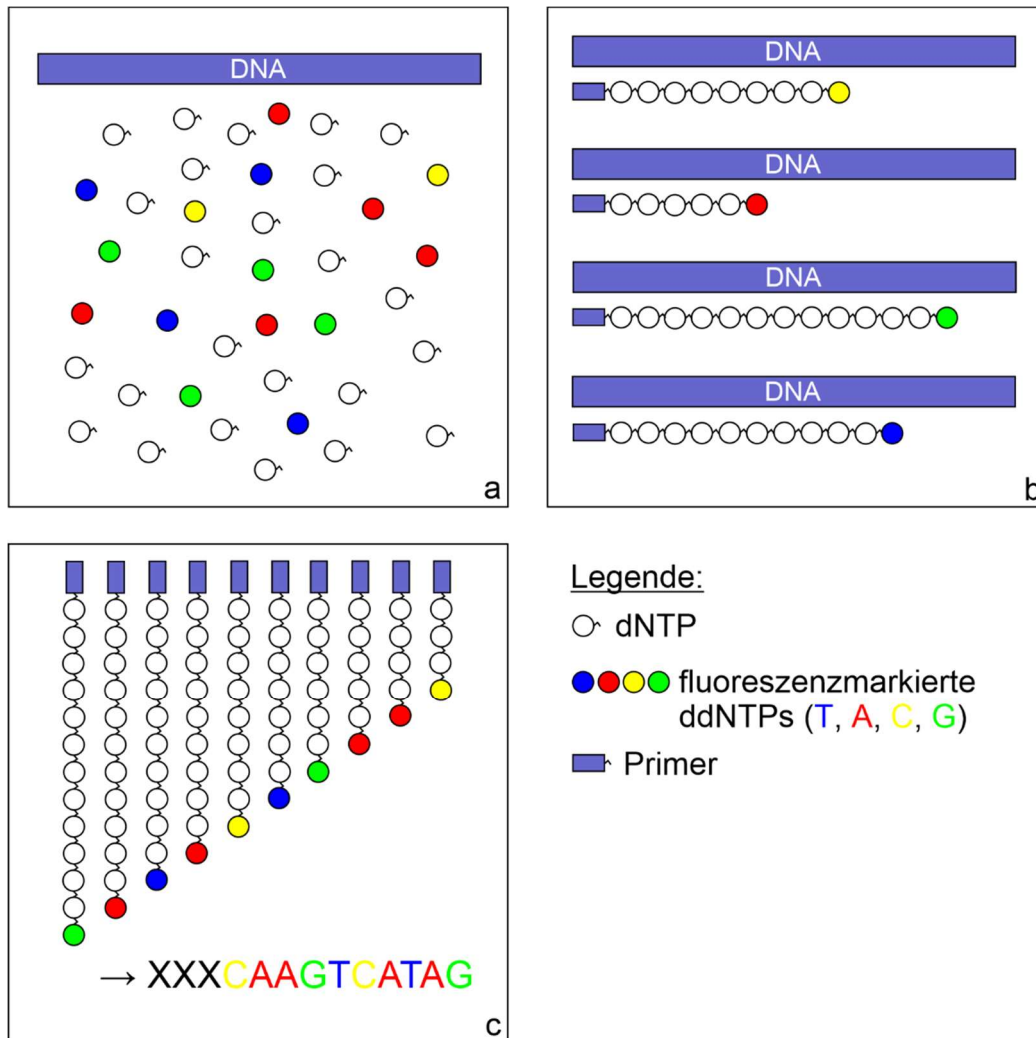


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Prinzips der Sequenzierung nach Sanger. a: Im Mix für die PCR sind sowohl die üblichen dNTPs als auch fluoreszenzmarkierte ddNTPs aus dem Quickstart-Mix enthalten. Dabei ist jede Base mit einer unterschiedlichen Fluoreszenz markiert. b: Wird im Elongationsschritt der PCR eine der markierten ddNTPs eingebaut, bricht die Elongation an dieser Stelle ab. Es entsteht ein Produkt einer spezifischen Länge mit einer spezifischen Fluoreszenz. Diese stellt die Base an der Position korrespondierend zur Länge dar. Da nur ein Primer eingesetzt wird, wird der DNA-Strang immer von der gleichen Seite synthetisiert. c: Die DNA-Fragmente werden in einem Sequenzierer der Länge nach aufgetrennt und die jeweilige Fluoreszenz gemessen. Dadurch ist eine Zuordnung der Fluoreszenz zur Basenposition möglich. So kann die Basenabfolge des synthetisierten DNA-Strangs entschlüsselt werden.

Der Reaktionsansatz für die PCR mit der Kettenabbruchmethode ist in Tabelle 24 beschrieben; das dazugehörige PCR-Protokoll in Tabelle 25. Dabei wurde der erste Schritt, die Trennung (Denaturierung) der DNA-Stränge, nur mit der

Ausgangs-DNA durchgeführt. Im Anschluss wurde das PCR-Programm pausiert, der reaktionsspezifische *Master-Mix* zu jeder Probe hinzugefügt und dann das Programm ohne weitere Unterbrechungen fortgesetzt.

Zu beachten war dabei, dass der *Quickstart-Mix* aufgrund der enthaltenen Fluoreszenzmoleküle lichtempfindlich ist, sodass die Reaktionsgefäße für die PCR für die Dauer des Pipettiervorgangs in Alufolie eingepackt und das PCR-Produkt lichtgeschützt bei 4 bis 10°C gelagert wurde.

Tabelle 24: Reaktionsansatz für die Kettenabbruchsynthese

Reagenz	Menge
DNA	11 µl
Primer (R478)	1 µl
Quickstart-Mix	4 µl
Q-Solution	4 µl

Tabelle 25: PCR-Programm für die Kettenabbruchsynthese

Temperatur	Dauer	Zyklen
98 °C	3 min	1
Manuell pausieren, <i>Master-Mix</i> hinzufügen		
96 °C	20 s	31
55 °C	20 s	
60 °C	4 min	
10 °C	∞	1

Im Anschluss wurde das PCR-Produkt für ein besseres Analyse-Ergebnis aufgereinigt. Dafür wurde für die entsprechende Probenzahl ein Stopp-Mix nach dem Ansatz in Tabelle 26 vorbereitet. In UV-geschützte Reaktionsgefäße wurden dann pro Probe zu 10 µl des PCR-Produkts 15,5 µl Stopp-Mix und 60 µl eisgekühltes, 100%-iges Ethanol gegeben. In der Kühlzentrifuge wurden die Proben bei 4 °C für 30 Minuten bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert. Dann wurde die Flüssigkeit aus dem Gefäß vorsichtig abgekippt, wobei das Pellet mit dem PCR-

Produkt auf dem Boden des Reaktionsgefäßes zurückblieb. Als nächstes wurde 190 µl eisgekühltes, 70%-iges Ethanol auf jede Probe gegeben, und diese dann in der Kühlzentrifuge bei gleichbleibender Temperatur und Geschwindigkeit für 20 Minuten zentrifugiert. Der Schritt des Abkippens wurde wiederholt und erneut 90 µl eisgekühltes, 70%-iges Ethanol zur Probe hinzugegeben. Die erneute Zentrifugation bei 4 °C und maximaler Geschwindigkeit erfolgte dieses Mal für 15 Minuten, und dann erneut das Abkippen der Flüssigkeit.

Zum Abschluss wurden die Proben für 12 Minuten offen im Vakuumtrockner bei 30 °C getrocknet. Dieser wurde dabei, um die Proben weiterhin vor Licht zu schützen, abgedeckt.

Tabelle 26: Stopp-Mix für die Aufreinigung des PCR-Produkts der Kettenabbruchsynthese

Reagenz	Menge
H ₂ O Ampuwa	10 µl
3 M Natriumacetat pH 5,2	2,2 µl
100 mM Na ₂ -EDTA pH 8,0	2,2 µl
Glykogen	1,1 µl

Zur Vorbereitung der Analyse wurde dann 42 µl SLS-Puffer aus dem *GenomeLab DTCS Quick Start Kit* in jedes Reaktionsgefäß gegeben und die Proben für einen Zeitraum von 30 Minuten bis zu einer Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

Die eigentliche Analyse erfolgte dann im Sequenzierer *CEQ 8000 Genetic Analysis System*. Zur Vorbereitung wurden jeweils 40 µl der inkubierten Probenlösung in ein Well einer Probenplatte gegeben und 1 Tropfen Mineralöl aus dem *GenomeLab DTCS Quick Start Kit* darauf gegeben, um die Probe vor möglichem Verdampfen zu schützen. In einer Pufferplatte wurden die korrespondierenden Wells bis zur Ringmarke mit einem Puffer zur Reinigung der Kapillaren gefüllt. Die vorbereiteten Platten wurden bis zur Sequenzierung bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

Vor der Sequenzierung wurde am Gerät ein Probenbelegungsplan erstellt und das Programm „LFR-b“ ausgewählt. Die Programmeinstellungen sind in Tabelle 27 dargestellt.

Tabelle 27: Einstellungen für das Programm "LFR-b" zur Sequenzierung nach Kettenabbruchsynthese

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

Die Auswertung und damit Bestimmung des SNP Bp 987 erfolgte mit Hilfe der zum Gerät gehörenden *GenomeLab GeXP* Software durch den Vergleich mit einer bekannten *ATXN3*-Sequenz und dadurch Einordnung der entsprechenden Lokalisation.

2.2.7 Fragmentlängenanalyse / Duplex-PCR zur Bestimmung des *ATXN3*-SNPs Bp 987

Der *ATXN3*-SNP Bp 987 wurde im Rahmen dieser Arbeit durch eine Duplex-PCR und Fragmentlängenanalyse bestimmt. Dafür wurde eine PCR mit einem Vorwärts-, aber zwei verschiedenen Rückwärts-*Primern* durchgeführt. Der zu bestimmende SNP befand sich dabei innerhalb der Bindungsstelle des Rückwärts-*Primers*, sodass abhängig davon, welche Base am Bp 987-Locus vorhanden war, entweder der eine oder der andere *Primer* gebunden und damit als Ausgangsbasis für die PCR verwendet wurde. Die beiden *Primer* wurden mit einer unterschiedlichen Fluoreszenz markiert (siehe auch Tabelle 12). Da die *Primer* Teil des PCR-Produkts sind, konnte durch die Detektion mit einem entsprechenden

Gerät festgestellt werden, welcher *Primer* im Produkt vorhanden ist und welche Länge dieses hat. So konnte nicht nur mit geringem Aufwand festgestellt werden, welcher SNP vorliegt, sondern es war, da die *CAG-Repeat-Region* Teil des PCR-Produkts war, über die Länge auch eine Allel-Zuordnung möglich.

Zunächst wurde für die entsprechende Probenzahl der reaktionsspezifische *Master-Mix* wie in Tabelle 28 dargestellt zunächst ohne DNA, angesetzt, dann wurde 1 µl der zu untersuchenden DNA hinzugegeben. Da im Labor die Verfügbarkeit von Formamid zwischenzeitlich eingeschränkt war, wurde in der Etablierung neben dem hier dargestellten Ansatz mit Formamid zusätzlich ein zweiter ausprobiert, in dem das Formamid durch die gleiche Menge an SLS-Puffer aus dem *GenomeLab DTCS Quick Start Kit* ersetzt wurde, da dieses laut Herstellerangaben zu 90 % aus Formamid besteht. Sämtliche ausgewertete Messungen nach der ursprünglichen Etablierung wurden mit Formamid durchgeführt.

Im Anschluss wurde die PCR in einem PCR-Cycler nach dem in Tabelle 29 beschriebenen Protokoll durchgeführt.

Tabelle 28: Reaktionsansatz für die Fragmentlängenanalyse / Duplex-PCR zur Bestimmung des ATXN3-SNPs Bp 987

Reagenz	Menge
Puffer 10x	2 µl
Formamid	0,5 µl
Vorwärtsprimer (T982)	0,8 µl
Rückwärtsprimer 1 (U312)	0,8 µl
Rückwärtsprimer 2 (U313)	0,8 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl
dNTPs	0,5 µl
H ₂ O Ampuwa	13,4 µl
DNA	1 µl

Tabelle 29: PCR-Programm für die Fragmentlängenanalyse / Duplex-PCR zur Bestimmung des ATXN3-SNPs Bp 987

Temperatur	Dauer	Zyklen
94 °C	4 min	1
94 °C	15 s	
59,5 °C	30 s	35
72 °C	1 min	
72 °C	6 min	1
10 °C	∞	1

Zur Kontrolle des PCR-Erfolgs wurde ein Kontrollgel mit einem 1%-igem Agarosegel durchgeführt, wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben. Nach Analyse auf dem UV-Tisch und Dokumentation konnte dieses verworfen werden.

Die Proben, bei denen im Kontrollgel ein PCR-Produkt nachgewiesen konnte, wurden dann weiter analysiert. Dies geschah mit Hilfe des Sequenzierers *CEQ 8000 Genetic Analysis System*. Eine Probenplatte wurde pro Well mit 35 µl eines Standard-Mixes, bestehend aus 34,5 µl SLS-Puffer aus dem *GenomeLab DTCS Quick Start Kit* und 0,5 µl eines internen Standards (*GenomeLab DNA Size Standard Kit – 600*) befüllt sowie 5 µl des hierfür 1:20 mit H₂O Ampuwa verdünnten PCR-Produkts. In einem parallel gestarteten Durchlauf wurden die gleichen Proben noch einmal unverdünnt eingesetzt, um zu ermitteln, ob dies aufgrund der dann höheren DNA-Menge ein besseres Ergebnis erzeugt. Für die endgültigen Analysen wurde aber aufgrund der in Kapitel 3.2.3 dargestellten Ergebnisse die 1:20 Verdünnung gewählt.

Im Anschluss wurde jedes beladene Well mit einem Tropfen Mineralöl aus dem *GenomeLab DTCS Quick Start Kit* abgedeckt, um die Probe vor Verdampfen zu schützen. Zusätzlich wurden in einer Pufferplatte die korrespondierenden Wells bis zur Ringmarke mit einem Puffer zur Reinigung der Kapillaren gefüllt.

Nach der Erstellung eines Probenbelegungsplans am Gerät wurde dieses Beladen und das Programm „Frag-2“ ausgewählt. Die Programmeinstellungen sind in Tabelle 30 dargestellt.

Tabelle 30: Einstellungen für das Programm "Frag-2" zur Fragmentlängenanalyse

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

Die Analyse der Ergebnisse und damit die Bestimmung des SNP Bp 987 erfolgte in der *GenomeLab GeXP* Software. Die beiden verschiedenen Fluoreszenzen der eingesetzten Rückwärtsprimer wurden durch unterschiedlich farbige Spitzen in der graphischen Auswertung dargestellt. Durch den Vergleich der Produktlänge mit dem Längenstandard aus dem Standard-Mix konnte bei heterozygoten Merkmalsträgern eine Zuordnung des Ergebnisses zum expandierten oder nicht-expandierten Allel erfolgen. Das Vorgehen bei der Auswertung wird gemeinsam mit den Ergebnissen der Etablierung in Kapitel 3.2.3 erläutert.

2.2.8 High Resolution Melting Analysis (HRMA) zur Bestimmung der ATXN3-SNPs Bp 669 und Bp 1118

Die Bestimmung der SNPs Bp 669 und Bp 1118 des *ATXN3*-Gens geschah über die *High Resolution Melting Analysis* (HRMA). Diese stellt eine schnelle, einfache und günstige Methode für die Genotypisierung von SNPs dar (Liew et al., 2004). Sämtliche Reaktionsschritte können dabei in einem einzigen, verschlossenen Reaktionsgefäß ohne zusätzliche Zugabe von Reagenzien nach den initialen Pipettierschritten durchgeführt werden (Liew et al., 2004).

Die Methode basiert auf einer PCR und der darauf folgenden Erstellung einer Schmelzkurve. Die initiale PCR vervielfältigt den Abschnitt, in dem sich die zu analysierende Variante befindet. Die Auswahl kleinerer Amplikons erlaubt dabei

schnellere Reaktionen (Liew et al., 2004), sodass die für die PCR veranschlagte Zeit im Gesamtprozess kürzer ist.

Ohne weitere Zugabe von Reagenzien kann im Anschluss die Erstellung einer Schmelzkurve erfolgen. Dies ist möglich, da das dafür benötigte Reagenz, LCGreen, bereits im ursprünglichen Ansatz vorhanden ist. LCGreen ist bis zu einer Sättigung von mehr als 90 % als nicht-inhibierend für eine PCR beschrieben worden (Wittwer et al., 2003). Als weiteren Vorteil erzeugt es gut zu differenzierende Schmelzkurven nicht nur für heterozygote, sondern auch für homozygote SNPs, die mit Farbstoffen wie SYBR Green I nur schwer zu analysieren sind (Wittwer et al., 2003). LCGreen ist ein Sättigungsfarbstoff, der in der Gegenwart von doppelsträngiger DNA fluoresziert. Bei steigender Temperatur nimmt diese Fluoreszenz ab. Dies ist unter anderem eine Folge der Erwärmung an sich, so dass das Herausrechnen des Hintergrunds eine wichtige Rolle spielt. In Analysesoftwarelösungen für das *High Resolution Melting* kann dies zumeist automatisiert werden (Reed et al., 2007). Für die Analyse relevant ist die massive und rapide Abnahme der Fluoreszenz an dem Punkt, an dem die DNA in Einzelstränge getrennt wird, der sogenannten Schmelztemperatur oder dem Schmelzpunkt (Reed et al., 2007). Neben dem Gehalt an C-G-Bindungen beeinflussen auch Basenpaare, die nach Watson-Crick nicht zusammenpassen, die Schmelztemperatur (Myers et al., 1987), sodass diese zum Beispiel Aufschluss über den Austausch einzelner Basen geben kann.

Dabei sind SNPs in kleineren Amplikons im Nachhinein einfacher und sicherer zu differenzieren als in größeren, sodass für letztere höhere Auflösungen nötig sind, um eine Unterscheidung treffen zu können (Wittwer et al., 2003). Diese kann unter anderem durch einen langsamen Schmelzprozess, bei dem viele Messungen pro ansteigendem Grad Celsius durchgeführt werden, erreicht werden (Reed et al., 2007). Bei SNPs in Amplikons bis zu einer Länge von 400 Basenpaaren wurde eine Sensitivität und Spezifität bis zu 100 % beschrieben, wobei hierbei neben dem Austausch einzelner Basen auch Insertionen und Deletionen zuverlässig detektiert werden konnten (Reed et al., 2007).

Zur Analyse wichtig ist dabei nicht nur die Schmelztemperatur selbst, sondern die gesamte Schmelzkurve, deren Form ebenfalls Auskunft über den

vorliegenden Genotypen gibt (Reed et al., 2007). Hierbei ist zu beachten, dass heterozygote Proben darüber einfach differenziert werden können, während homozygote Proben die gleiche Form aufweisen, sich aber in der Schmelztemperatur unterscheiden (Liew et al., 2004). Es ist daher essenziell, die Proben von anderen Einflüssen auf die Schmelztemperatur zu bereinigen. So sollte zum Beispiel für alle Proben der gleiche DNA-Puffer verwendet werden, um eine Vergleichbarkeit herzustellen (Liew et al., 2004). Die Unterscheidung homozygoter Proben über die Schmelztemperatur ist in etwa 96 % der Fälle möglich (Reed et al., 2007). Um ähnliche Schmelzkurven miteinander vergleichen zu können, empfiehlt es sich, bekannte Proben gemeinsam mit unbekanntem zu analysieren, um Kurven für den direkten Vergleich zur Verfügung zu haben (Reed et al., 2007). Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei verschiedene SNPs im *ATXN3*-Gen über diese Methode analysiert. Für die Bestimmung des Bp 669 wurde als Ausgangsmaterial die DNA, wie sie aus Vollblut isoliert worden war, verwendet. Für die Analyse des Bp 1118 wurde mit dieser zunächst die PCR für die Sanger-Sequenzierung des *ATXN3*-Gens aus Kapitel 2.2.2 durchgeführt. Das Produkt enthält dabei sowohl den zu analysierenden SNP, als auch die Region der *CAG-Repeats*. Handelte es sich bei einer Probe um die eines Mutationsträgers, konnte so vor der Analyse das expandierte Allel vom Wildtyp-Allel in einem 1%-igen Agarosegel getrennt und die beiden unabhängig voneinander analysiert werden. Dadurch war eine eindeutige Zuordnung der SNP-Ausprägung zum Allel möglich. Nach der Auftrennung im Agarosegel wurde das PCR-Produkt wie in Kapitel 2.2.4 dargestellt aus diesem extrahiert und im Folgenden als DNA-Grundlage verwendet.

Für die *HRMA* wurde wie im Handbuch des *LightCycler 480® High Resolution Melting Master* (Version von 09/2016) beschrieben vorgegangen. Verwendet wurde der Blocktyp 384, entsprechend mit einer 384 Well-Platte in Weiß. Entgegen der Empfehlungen im Handbuch wurde für die Bestimmung des SNP Bp 669 eine DNA-Menge von 50 ng (20 ng/µl, verdünnt mit H₂O PCR-Grad aus dem *LightCycler® 480 High Resolution Melting Master*-Kit) verwendet. Für die Bestimmung des SNP Bp 1118 wurde die aus Agarosegel extrahierte Probe unverdünnt eingesetzt. Der Reaktionsansatz pro Probe ist in Tabelle 31 dargestellt.

Sämtliche Reagenzien, abzüglich der Primer und der DNA, entstammen dabei dem *LightCycler® 480 High Resolution Melting Master-Kit*. Der *Primer-Mix* wurde für jeden SNP nach den Angaben in Tabelle 32 hergestellt. Für die Negativkontrolle wurden 2,5 µl H₂O PCR-Grad eingesetzt.

Nach dem Pipettieren wurde die 384-Well-Platte mit einer Folie versiegelt und nach dem in Tabelle 33 angegeben Programm im *LightCycler® 480 II* verarbeitet und analysiert. Für das Reaktionsvolumen wurden 10 µl eingestellt.

Tabelle 31: Reaktionsansatz für die HRMA. Die Reagenzien wurden, abzüglich des Primer-Mix und der DNA, dem *LightCycler® 480 High Resolution Melting Master-Kit* entnommen.

Reagenz	Menge
Master Mix, 2x konzentriert	5 µl
<i>Primer-Mix</i>	0,5 µl
MgCl ₂ 25 mM	1,5 µl
H ₂ O, PCR-Grad	0,5 µl
DNA, konzentrationsangepasst	2,5 µl

Tabelle 32: Zusammensetzung der Primer-Mischungen für die HRMA

Primer-Mix für Analyse von	Zusammensetzung
Bp 669	184 µl H ₂ O PCR-Grad
	8 µl Primer T979
	8 µl Primer T980
Bp 1118	184 µl H ₂ O PCR-Grad
	8 µl Primer T983
	8 µl Primer T981

Die Auswertung erfolgte im Anschluss mit der zum Gerät gehörigen *LightCycler® 480 SW-Software*. Diese automatisierte Berechnungsschritte zur Erstellung der Schmelzkurven und -spitzen für jede einzelne Probe, wie zum Beispiel das bereits beschriebene Herausrechnen des Hintergrunds. Die erzeugten Kurven konnten im Anschluss mit den innerhalb der Arbeitsgruppe durch Melanie Gansel

bereits etablierten Schmelzkurven für die verschiedenen SNP-Ausprägungen verglichen und dadurch auf einen Genotyp festgelegt werden.

Tabelle 33: Programm für die PCR und Analyse im LightCycler

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Prä-Inkubation	95 °C	10 min	1
Amplifikation	95 °C	10 s	45
	56 °C	15 s	
	72 °C	10 s	
Schmelzkurve	95 °C	1 min	1
	40 °C	1 min	
	65 °C	1 s	
	95 °C	kontinuierlich	
Kühlen	40 °C	10 s	1

2.2.9 Restriktionsfragmentlängenanalyse zur Bestimmung der *PARK2*-SNPs Exon 4 und Exon 10

Die SNPs Exon 4 und Exon 10 des *PARK2*-Gens wurden im Rahmen dieser Arbeit über einen Restriktionsendonukleasenverdau bestimmt. Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die DNA bei Erkennen einer spezifischen Basensequenz an dieser Stelle schneiden und damit bei Verdau der gleichen DNA stets ein spezifisches Produkt mit definierten Längen erstellen. Durch Einsatz einer Restriktionsendonuklease und der anschließenden Analyse der Länge der dabei entstehenden Fragmente konnte festgestellt werden, ob die Restriktionsendonuklease das Produkt gar nicht, einmalig oder mehrfach geschnitten hatte. Da der zu untersuchende SNP jeweils in einer möglichen Schnittstelle für die Endonuklease lag (je nachdem, welcher Genotyp vorlag), war darüber dessen Bestimmung möglich.

Zur Bestimmung wurde zunächst die in Kapitel 2.2.2 angegebene PCR für die Restriktionsfragmentlängenanalyse zur Bestimmung der *PARK2*-SNPs durchgeführt. Je nach eingesetzter *Primer*-Kombination konnte hierbei mit dem gleichen

PCR-Protokoll entweder der Abschnitt, in dem sich der SNP Exon 4 befand, oder der mit dem SNP Exon 10 amplifiziert werden. Das PCR-Produkt wurde im Anschluss bis zur weiteren Verarbeitung mittels Restriktionsenzymverdau bei 4 bis 10 °C gelagert.

Im Anschluss wurde der Verdau durch die Restriktionsendonuklease angesetzt. Die dafür verwendeten Enzyme mit ihren Eigenschaften sind in Tabelle 34 dargestellt.

Tabelle 34: Übersicht über die Eigenschaften der verwendeten Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonuklease	Verwendeter Puffer	Bestimmung von	Verdautemperatur	Fragmentlängen nach Verdau, nach Genotyp	
				Genotyp	Fragmentlänge (bp)
AlwNi	CutSmart® Buffer	Exon 4	37 °C	A/A	696 bp
				A/G	339, 357, 696 bp
				G/G	339, 357 bp
BaeGI	NEBuffer™ 3.1	Exon 10	37 °C	G/G	281, 367 bp
				C/G	161, 206, 281, 367 bp
				C/C	161, 206, 181 bp

Der Reaktionsansatz für den Verdau ist in Tabelle 35 ersichtlich und geschah in 0,2 ml Reaktionsgefäßen. Sämtliche Pipettierschritte wurden hierbei auf Eis oder in einem Kühlblock durchgeführt, um die vorzeitige Aktivierung der Restriktionsendonukleasen zu verhindern.

Im Anschluss wurden die Proben in einem *Thermocycler* zunächst für 60 Minuten auf die Verdautemperatur der jeweils eingesetzten Restriktionsendonuklease gebracht. Als zweiter Schritt folgte die Inaktivierung des Enzyms durch ein Erhitzen auf 80 °C für zwanzig Minuten. Bis zur Analyse wurden die Proben erneut bei 4 bis 10 °C gelagert.

Tabelle 35: Reaktionsansatz für den Restriktionsendonukleasenverdau

Reagenz	Menge
PCR-Produkt	8,75 µl
Restriktionsendonuklease	0,25 µl
Passender Puffer	1 µl

Für die Analyse wurde ein 2,5%-iges Agarosegel (siehe Kapitel 2.2.3) gegossen. Hierbei wurde ein höherprozentiges Gel gewählt, um die teilweise sehr ähnlich langen Fragmente aus dem Restriktionsendonukleasenverdau besser auftrennen und damit bewerten zu können.

Zur Kontrolle wurde das Gel nicht nur mit dem Produkt nach dem Verdau, sondern auch für jede Probe zusätzlich mit dem Produkt der ursprünglichen unverdauten PCR beladen. Dadurch konnte der Erfolg beider Schritte unabhängig voneinander überprüft und eventuelle Verunreinigungen im Pipettierprozess ausgeschlossen werden.

2.2.10 Etablierung einer Multiplex-PCR nach Costa et al., 2019 für verschiedene SNPs des ATXN3-Gens

Die Bestimmung der einzelnen SNPs durch Methoden wie die Sanger-Sequenzierung ist teils aufwendig und komplex. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit auch versucht, neben der Fragmentlängenanalyse weitere an anderen Stellen beschriebene Methoden innerhalb der eigenen Arbeitsgruppe und Laborbedingungen zu etablieren. Dadurch sollte die Analyse der verschiedenen SNPs vereinfacht werden und möglicherweise auch mehrere in einen Ansatz bestimmt.

In dem *Paper* „A Pipeline to Assess Disease-Associated Haplotypes in Repeat Expansion Disorders: The Example of MJD/SCA3 Locus“ (Costa et al., 2019) wurde eine *Multiplex*-PCR beschrieben. Eine *Multiplex*-PCR hat gegenüber einer *Singleplex*-PCR den Vorteil, dass hierbei mehrere PCR-Reaktionen im gleichen Ansatz stattfinden können, wodurch Zeit, Aufwand und Material gespart wird. Die Produkte dieser spezifischen *Multiplex*-PCR beinhalteten mehrere der auch im Rahmen dieser und vorangehender Arbeiten aus der SCA3-Gruppe bestimmten SNPs, spezifisch den SNP Bp 987 und Bp 1118 des *ATXN3*-Gens.

Aus dem *Paper* wurden zur Vereinfachung zunächst lediglich die in Tabelle 15 dargestellten *Primer* ausgewählt. Daraus ergaben sich zunächst zwei *Singleplex-PCR*: Eine mit *Primer*-Paar 1 (U277/U278) und eine mit *Primer*-Paar 2 (U279/U280, jeweils dargestellt in Tabelle 15). Der Reaktionsansatz wurde aus dem *Paper* übernommen und wie in Tabelle 36 gezeigt an die hiesigen vorhandenen Reagenzien angepasst. Die DNA wurde dabei in einer Menge von 15 ng in 2 μ l eingesetzt. Dafür wurde eine entsprechende Verdünnung mit Ampuwa H₂O mit 7,5 ng/ μ l für die verwendeten Proben hergestellt. Da die mögliche Pipetiermenge nach unten begrenzt war, wurde bei sehr hohen DNA-Konzentrationen der Ursprungsprobe eine Verdünnung aus 0,5 μ l Probe und 7,5 μ l Ampuwa H₂O angesetzt und damit eine etwas höhere Menge DNA im Reaktionsansatz in Kauf genommen, um eine zu geringe Durchmischung bei sehr kleinen Probenvolumina im Verdünnungsansatz zu vermeiden. Für sämtliche Ansätze im Rahmen der Etablierung wurden DNA-Proben verwendet, deren SNP-Haplotypen zuvor bereits mit etablierten Methoden bestimmt worden waren, um das Ergebnis überprüfen zu können.

Tabelle 36: anfänglicher Reaktionsansatz für die Etablierung einer Multiplex-PCR

Reagenz	Menge
DNA (verdünnt auf 15 ng in 2 μ l)	2 μ l
Vorwärts <i>primer</i>	0,4 μ l
Rückwärts <i>primer</i>	0,4 μ l
Puffer 10x	2 μ l
dNTPs	1 μ l
Q-Solution	2 μ l
Taq-Polymerase	0,2 μ l
H ₂ O Ampuwa	12 μ l

Tabelle 37: anfängliches PCR-Programm für die Etablierung einer Multiplex-PCR

PCR 1			PCR 2		
Temperatur	Dauer	Zyklen	Temperatur	Dauer	Zyklen
95 °C	5 min	1	95 °C	5 min	1
95 °C	45 s	35	95 °C	45 s	20
60 °C	90 s		58 °C	90 s	
72 °C	2 min		72 °C	2 min	
72 °C	10 min	1	95 °C	45 s	20
10 °C	∞	1	57 °C	90 s	
			72 °C	2 min	
			72 °C	10 min	1
			10 °C	∞	1

Aufgrund der verschiedenen *Primer*-Paare wurden beide Versuchsreihen in verschiedenen *Thermocyclern* nach unterschiedlichen PCR-Protokollen behandelt. Diese sind in Tabelle 37 angegeben. Der Erfolg der Reaktion wurde mit einem 1%-igen Agarosegels überprüft (siehe auch Kapitel 2.2.3).

Bei einem Misserfolg der PCR mit den ursprünglich angesetzten Parametern wurden zum Zwecke der Etablierung verschiedene Anpassungen vorgenommen und Ansätze ausprobiert.

Zunächst wurden die geschätzten *Annealing*-Temperaturen der *Primer* berechnet. Diese lagen für das erste *Primer*-Paar bei 52 und 60 °C, für das zweite bei 48 und 50 °C. Daher wurde im Folgenden eine Gradienten-PCR durchgeführt, um zu überprüfen, ob eine Veränderung der *Annealing*-Temperatur im PCR-Protokoll den PCR-Erfolg verbessern kann. Hierfür wurde erneut auf das PCR-Protokoll für PCR 1 aus Tabelle 37 zurückgegriffen, mit folgenden Anpassungen: Anstatt 60 °C wurde für den Schritt des *Primer-Annealing* ein Gradient, beginnend bei 50 °C und endend bei 60 °C, eingestellt. Somit wurde dieser Schritt auf der linken Seite im *Thermocycler* mit 50,1 °C durchgeführt, auf der rechten Seite mit 60,2 °C und dazwischen mit weiteren zehn verschiedenen Temperaturen. Der Reaktionsansatz wurde erneut wie in Tabelle 36 beschrieben gewählt, allerdings wurde die Menge der eingesetzten Q-Solution pro Probe auf 4 µl erhöht und die

an Ampuwa H₂O dafür um 2 µl auf ein totales Volumen von 10 µl verringert, um die Effektivität der PCR-Reaktion zu erhöhen. Die Gradienten-PCR wurde für beide *Primer*-Kombinationen getrennt umgesetzt. Eine Negativkontrolle lief jeweils bei einer *Annealing*-Temperatur von 54,3 °C mit.

Zusätzlich wurde eine *Touchdown*-PCR durchgeführt. Hierbei wurde der Schritt des *Primer-Annealing* im ersten Zyklus mit 62 °C durchgeführt und dann graduell über zehn Zyklen mit jedem Zyklus um 1 °C auf letztlich 52 °C verringert. Das Protokoll hierfür ist in Tabelle 38 dargestellt. Auch hierfür wurde die Menge an Q-Solution pro Ansatz auf 4 µl erhöht und dafür die von Ampuwa H₂O um 2 µl verringert. Die Gradienten-PCR wurde zweimalig durchgeführt und für die Wiederholung die Verdünnungen des *Primers* aus der Originallieferung neu angesetzt. Außerdem wurde die Menge der eingesetzten *Primer* auf jeweils 1 µl erhöht.

Der Erfolg der PCR wurde mit einem 1%-igen Agarosegel überprüft (siehe Kapitel 2.2.3). Um sicherzugehen, dass eine zu kurze oder zu lange Laufzeit des Gels die Sichtbarkeit des Ergebnisses nicht beeinflusst, wurde dieses sowohl nach 15 als auch nach 45 Minuten betrachtet.

Tabelle 38: PCR-Protokoll der Touchdown-PCR für die Etablierung einer Multiplex-PCR

Temperatur	Dauer	Zyklen
95 °C	5 min	1
95 °C	45 s	
<i>Touchdown</i>		
max 62 °C, min 52 °C	90 s	10
72 °C	2 min	
95 °C	45 s	
52 °C	90 s	30
72 °C	2 min	
72 °C	6 min	1
10 °C	∞	1

Bei einem erneuten Misserfolg der PCR erfolgten weitere Anpassungen am Reaktionsansatz. Die üblicherweise in dieser Arbeit verwendete Taq-Polymerase von Qiagen wurde hierfür durch *Pwo*-Polymerase, und im Einklang damit auch der korrespondierende Puffer durch *Reactionbuffer complete for Pwo-DNA-Polymerase* (enthält MgSO₄ in einer Konzentration von 20 mM; im Ansatz entsteht dadurch eine Konzentration von 2 mM) in jeweils gleicher Menge ersetzt. Mit allen Anpassungen und Änderungen ergab sich nun der in Tabelle 39 dargestellte Reaktionsansatz. Mit beiden *Primer*-Kombinationen wurde dann erneut eine Gradienten-PCR wie zuvor beschrieben durchgeführt. Zusätzlich zur Anpassung der *Annealing*-Temperatur wurde dabei die Elongationstemperatur von 72 °C in sämtlichen Schritten auf die Arbeitstemperatur der *Pwo*-Polymerase reduziert. Diese liegt bei 68 °C. Die Negativkontrolle lief in diesem Ansatz bei 56,9 °C mit. Der Erfolg der PCR wurde erneut mit einem 1%-igen Agarosegel überprüft (siehe Kapitel 2.2.3).

Tabelle 39: angepasster Reaktionsansatz für die Etablierung einer Multiplex-PCR

Reagenz	Menge
DNA (verdünnt auf 15 ng in 2 µl)	2 µl
Vorwärtsprimer	1 µl
Rückwärtsprimer	1 µl
<i>Reactionbuffer complete for Pwo-DNA-Polymerase</i>	2 µl
dNTPs	1 µl
Q-Solution	4 µl
<i>Pwo</i> -Polymerase	0,2 µl
H ₂ O Ampuwa	8,8 µl

Im Kontrollgel zeigte sich ein Misserfolg von PCR 1 sowie eine schwache Bande bei einer *Annealing*-Temperatur von 50,1 °C in PCR 2.

Tabelle 40: Variationen des angepassten Reaktionsansatzes für die Etablierung einer Multiplex-PCR

Reagenz		Menge	
DNA (unverdünnt)		1 µl	
Vorwärtsprimer		1 µl	
Rückwärtsprimer		1 µl	
dNTPs		1 µl	
Pwo-Polymerase		0,2 µl	
Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 4
2 µl <i>Reac-tionbuffer complete for Pwo-DNA-Polymerase</i>	2 µl <i>Reac-tionbuffer complete for Pwo-DNA-Polymerase</i>	2 µl <i>Reac-tionbuffer incomplete for Pwo-DNA-Polymerase</i>	2 µl <i>Reac-tionbuffer incomplete for Pwo-DNA-Polymerase</i>
4 µl Q-Solution	2 µl Betain	2,4 µl 25mM MgSO ₄	3,2 µl 25mM MgSO ₄
9,8 µl H ₂ O Ampuwa	11,8 µl H ₂ O Ampuwa	11,4 µl H ₂ O Ampuwa	10,6 µl H ₂ O Ampuwa

Tabelle 41: finales PCR-Protokoll für PCR 2 für die Etablierung einer Multiplex-PCR

Temperatur	Dauer	Zyklen
95 °C	5 min	1
95 °C	45 s	40
50 °C	90 s	
68 °C	2 min	
68 °C	6 min	1
10 °C	∞	1

Zur weiteren Optimierung wurde der Reaktionsansatz erneut verändert. Dafür wurde die DNA-Probe nun unverdünnt eingesetzt und 1 µl verwendet. Verschiedene Varianten wurden parallel ausprobiert. Zum einen wurde Q-Solution durch Betain ersetzt, das ebenfalls zur Verbesserung von PCR-Reaktionen beitragen

kann. In zwei weiteren Variationen wurde der Puffer durch *Reactionbuffer incomplete for Pwo-DNA-Polymerase* ersetzt. Da dieser kein MgSO₄ enthält, konnte dieses im Nachhinein hinzugegeben und damit verschiedene Konzentrationen im Ansatz erreicht werden. Gewählt wurde eine Konzentration von 3 mM und 4 mM. Die verschiedenen Reaktionsansätze sind in Tabelle 40 aufgeschlüsselt und wurden jeweils für beide *Primer*-Kombinationen durchgeführt.

Aufgrund der Ergebnisse des vorherigen Ansatzes wurden die jeweiligen PCR-Protokolle für die beiden Varianten unterschiedlich angepasst. Die PCR mit *Primer*-Kombination 1 wurde erneut als *Touchdown*-PCR wie in Tabelle 38 dargestellt durchgeführt, wobei für die weitere Verwendung der *Pwo*-Polymerase die Elongationstemperatur von 72 °C weiterhin auf 68 °C geändert wurde. Die PCR mit *Primer*-Kombination 2 wurde nun nach der Auswertung der letzten Gradienten-PCR auf eine *Annealing*-Temperatur von 50 °C festgelegt. Es ergab sich das PCR-Protokoll in Tabelle 41. Der Erfolg der PCR wurde wie zuvor mit einem 1%-igen Agarosegel überprüft (siehe Kapitel 2.2.3).

Bei einem erneuten Misserfolg der PCR wurde die Etablierung an dieser Stelle abgebrochen.

2.2.11 Gewinnung der PBMC-Proben

Für die Proteinmessungen wurden im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich Homogenate aus mononukleären Zellen des peripheren Bluts verwendet. Die Grundlage dafür bildeten die freundlicherweise von den verschiedenen Zentren als Pellet zur Verfügung gestellten Zellen, wie auch in Kapitel 2.1.1 erläutert. Die Abnahme und Gewinnung der Proben geschah also außerhalb des Rahmens dieser Doktorarbeit. Zum besseren Verständnis verschiedener Einflussfaktoren auf die Probenqualität, die im Rahmen der Probenverarbeitung auftauchen können, wurde in einer weiteren Messreihe der Einfluss der Lagerungszeit der Probe vor ihrer Verarbeitung untersucht. Die Zeitdauer zwischen Probenentnahme und -verarbeitung wurde im Rahmen der ESMI-Kohorte auf maximal 2 Stunden festgelegt (Santana et al., 2023), um eine gleichbleibende, hohe Qualität der Proben zu gewährleisten. Für die Gewinnung dieser Kohorte wurden *CPT-Tubes* der Firma BD verwendet.

Im Rahmen der hier beschriebenen Messreihe wurde einer weiblichen, gesunden Person Blut in insgesamt 7 CPT-*Tubes* abgenommen. Der erste Zentrifugationsschritt (Schritt 2) im Protokoll des Herstellers wurde dabei möglichst zeitnah für alle Entnahmeröhrchen gemeinsam durchgeführt, sodass die Erythrozyten und Neutrophilen vom Rest der Probe abgetrennt wurden. Die Röhrchen wurden im Anschluss aufrechtstehend bei Raumtemperatur aufbewahrt. Das Plasma wurde nicht separat entnommen. Mit der weiteren Verarbeitung bei Schritt 4 des Herstellerprotokolls wurde nun mit einer unterschiedlichen Zeitverzögerung für jedes CPT-*Tube* fortgefahren. Die erste Probe wurde direkt (nach 0 Stunden) weiter behandelt, die weiteren Proben je nach 4, 24, 48, 72, 96 und 168 Stunden. Das verwendete PBS wurde zuvor im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Sämtliche Schritte nach der ersten Zentrifugation wurden im Bereich der Zellkultur durchgeführt. Pipettiert wurde unter einer Sterilbank. Die gewonnenen Zellpellets wurden bis zur weiteren Verarbeitung im Rahmen der Zelllyse (siehe Kapitel 2.2.12) bei –80 °C gelagert.

2.2.12 Lyse der PBMC-Proben

Um aus den gewonnenen beziehungsweise zur Verfügung gestellten PBMC-Proben ein Homogenat herzustellen, wurden die Zell-Pellets einem Lysevorgang unterworfen. Zwischen der Gewinnung der Pellets und der Lyse wurden diese auf Trockeneis transportiert und bis zur Verarbeitung bei -80 °C gelagert. Sämtliche Schritte im Rahmen der Lyse wurden im Bereich der Zellkultur durchgeführt. Pipettiert wurde unter einer Sterilbank.

Zu Beginn wurden die Proben in einem auf 37 °C eingestellten Wasserbad für drei bis fünf Minuten erwärmt. Abhängig vom Probengefäß, in dem der Transport geschah, erfolgte zunächst die Überführung in ein 15 ml Reaktionsgefäß. Dafür wurde das Zellpellet in 500 µl ebenfalls auf 37 °C erwärmtes DPBS aufgelöst und die Lösung in das Reaktionsgefäß gegeben. Zusätzlich wurde das ursprüngliche Transportgefäß noch drei Mal mit weiteren 500 µl DPBS ausgewaschen und die dabei entstehende Lösung jeweils in das gleiche Reaktionsgefäß gegeben.

Dieses wurde für 5 Minuten bei 300 rcf zentrifugiert, wodurch erneut ein Zellpellet am Boden des Gefäßes entstand. Nach Absaugen des Überstands wurden die Reaktionsgefäße bis zur Lyse auf Eis gelagert.

Der Lysepuffer wurde nach den Angaben in Tabelle 8 ebenfalls auf Eis hergestellt und gelagert. Die eingesetzte Menge wurde von der subjektiv bestimmten Größe des Zellpellets abhängig gemacht und lag zwischen 50 µl für sehr kleine Zellpellets bis hin zu 200 µl für große Zellpellets.

Die festgelegte Menge wurde auf das Zellpellet gegeben und inkubiert für 30 Minuten auf Eis. Zu Beginn sowie im weiteren Verlauf der Inkubationszeit wurde darauf geachtet, dass das Pellet sich vollständig im Puffer aufgelöst hat. Dafür wurde die Flüssigkeit während der gesamten Inkubationszeit in regelmäßigen Abständen mit Hilfe eines Vortexmixers durchmischt, sodass das Protein gleichmäßig in der Lösung verteilt wurde.

Nach Ende der Inkubationszeit wurde das entstandene Homogenat vollständig in ein Kryoröhrchen überführt und bis zur Verwendung bei -80 °C eingefroren.

2.2.13 **Bradford-Assay**

Die Proteinquantifizierung nach Bradford beruht auf der Bindung von Coomassie Brilliant Blue G-250 an Proteine und der dabei stattfindenden Veränderung im Absorptionsmaximum (Bradford, 1976). Coomassie Brilliant Blue G-250 bindet in seiner negativen Form am Protein, färbt sich dabei von rot zu blau und weist dann ein Absorptionsmaximum bei 595 nm auf (Compton & Jones, 1985). Dies wird zur Bestimmung der Proteinmenge in einer Lösung unbekannter Konzentration verwendet. Dafür wird eine Standardreihe mit bovinem Serumalbumin erstellt und die Proben im Vergleich dazu gemessen und ausgewertet (Bradford, 1976). Bestimmt wird dabei die Zunahme der Absorption bei 595 nm als Indikator für an Protein gebundenes Färbemittel und daher vorhandene Menge an Protein (Bradford, 1976). Die Komplexbildung aus Protein und Färbemittel ist dabei nach zwei Minuten abgeschlossen und bleibt für eine Stunde weitestgehend stabil. Eine Reduktion der Messwerte über die Zeit ergibt sich über das Ausfallen des Komplexes aus der Lösung, sodass Messzeiten zwischen fünf und zwanzig Minuten nach Zugabe des Färbereagens empfohlen werden (Bradford, 1976).

Für die Durchführung wurde zunächst das 1:2,2 verdünnte *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* sowie das auf 1 % verdünnte BSA hergestellt (siehe Tabelle 8). Die zu messenden Proben wurden auf Eis aufgetaut und gelagert und ein Plattenbelegungsplan für eine 96-Well-Platte erstellt, in dem jede zu messende Probe im Duplikat eingeplant wurde.

In jedes Well wurde der in Tabelle 42 dargestellte Reaktionsansatz pipettiert. Dabei stellen die ersten sieben Proben eine Standardreihe dar, aus der für die Auswertung der Messung eine Eichkurve erstellt werden kann. Für diese wurde das 1%-ige BSA verwendet. Für die Messung der eigentlichen Proben wurden jeweils 5 µl unverdünntes Probenhomogenat eingesetzt.

Tabelle 42: Reaktionsansatz für den Bradford-Assay

Volumen Protein- probe	H₂O Am- puwa	<i>Protein Assay Dye Reagent Concentrate</i> (1:2,2 verdünnt)	Volumen insge- samt	
0 µl	250 µl	200 µl	450 µl	
0,5 µl	249,5 µl	200 µl	450 µl	
1 µl	249 µl	200 µl	450 µl	
2,5 µl	247,5 µl	200 µl	450 µl	
5 µl	245 µl	200 µl	450 µl	
7,5 µl	242,5 µl	200 µl	450 µl	
10 µl	240 µl	200 µl	450 µl	
5 µl	Proben- homogenat	245 µl	200 µl	450 µl

Nach der zuletzt erfolgenden Zugabe des *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* wurde die Platte für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde das Plattenlesegerät für die Messung vorbereitet, sodass baldmöglichst im Anschluss mit der Gen5-Software die Absorption bei 595 nm gemessen wurde. Von allen Messwerten wurde jeweils der Leerwert (Mittelwert

der beiden Messungen für den Ansatz mit 0 µl BSA aus der Eichreihe) abgezogen, um die probenspezifische Absorption zu berechnen.

Da jede Probe, ebenso wie jede Stufe der Standardreihe, zwei Mal zur Messung angesetzt wurde, konnte jeweils der Mittelwert der Duplikate bestimmt werden. Bei einer signifikanten Differenz der beiden Messwerte für die gleiche Probe oder Abweichungen in der Erstellung der Eichkurve wurde entweder die Messung der einzelnen Probe inklusive einer weiteren Standardreihe oder respektive die gesamte Messung aller Proben mit einer neu angesetzten Standardreihe wiederholt. Auch Messungen, deren Werte deutlich oberhalb des obersten Messpunkts der Standardreihe lagen wurden wiederholt. Für die Wiederholung wurde die Menge an Probenvolumen im Ansatz reduziert und durch H₂O Ampuwa ersetzt. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nun aus der Standardreihe eine lineare Eichkurve bestimmt, die die Beziehung zwischen der Absorption bei 595 nm und der Proteinmenge im Ansatz darstellt. Unter Einbeziehung von Steigung und Achsenabschnitt der Standardreihe konnte aus den Messwerten für die Probenhomogenate deren Proteinkonzentration bestimmt werden.

Anhand der Proteinkonzentrationen wurden Verdünnungen angesetzt, die für die späteren Messungen im TR-FRET verwendet werden konnten. Die Proben wurden dabei standardmäßig 1:4 mit dem Verdünnungsmedium für PBMC-Proben (siehe Tabelle 8) verdünnt. Bei einer Proteinkonzentration über 2,5 µg/µl wurde eine 1:8-Verdünnung angesetzt. Dabei wurde stets nie die gesamte Probe verdünnt, sondern 20 µl der entsprechenden Verdünnung hergestellt, um zusätzlich noch Material für unverdünnte Messungen oder weitere Versuche mit anderen Methoden zur Verfügung zu haben. Die verdünnten Proben wurden ebenso wie die Ausgangshomogenate bei -80 °C gelagert.

2.2.14 *Time-resolved fluorescence energy transfer (TR-FRET)-Immunoassay*

Die Funktionsweise des TR-FRET ist in Kapitel 1.6 dargestellt und samt Hintergründen erklärt.

Für die Durchführung wurde zunächst ein Plattenbelegungsplan am Computer erstellt. Dabei wurden sämtliche Proben sowie eine Negativ- und eine Positiv-

kontrolle im Duplikat eingeplant. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurde die gesamte Platte eingesetzt. Einem möglichen Plattenverteilungseffekt durch lang andauernde Pipettiervorgänge und damit unterschiedliche entstehende Inkubationszeiten wurde entgegengewirkt, indem die Platte für die Zugabe von Probe und Antikörper auf Eis gelagert und die Transportzeiten bei Raumtemperatur möglichst kurz gehalten wurden.

Sämtliche verwendeten Proben wurden in der zuvor nach dem Bradford-Assay hergestellten Verdünnung auf Eis aufgetaut, ebenso der Detektionspuffer und die Positiv- und Negativkontrolle. Als Positivkontrolle wurde ein 1:16 verdünntes Probenhomogenat aus HEK293T-Zellen verwendet, in die zuvor *ATXN3* (70Q) zur Überexprimierung eingebracht wurde. Dieses wurde von Dr. med. dent. Gabriele Anna Kaucher zur Verfügung gestellt. Als Negativkontrolle wurde das Medium für die Verdünnung der PBMC-Proben eingesetzt.

Außerdem wurde die für die zu untersuchende Probenanzahl benötigte Menge an Antikörper-Mix hergestellt. Hierfür wurde sowohl vom tb- als auch vom D2-markierten Antikörper jeweils so viel zu einer vorgelegten Menge Detektionspuffer hinzugegeben, dass bei Einsatz von 1 µl der Lösung aus Antikörper und Detektionspuffer die in Tabelle 43 angegebene Menge pro Probe verwendet wurde. Die eingesetzten Antikörper-Konzentrationen wurden von Dr. med. Kathrin Gonsior und Dr. med. dent. Gabriele Anna Kaucher etabliert. Die eingesetzte Menge der Antikörperstocklösung berechnete sich aus der Konzentration des Antikörpers im Stock, die dem jeweiligen Datenblatt zu entnehmen war. Aufgrund der hohen Licht- und Temperaturempfindlichkeit der fluoreszenzmarkierten Antikörper wurden diese stets lichtgeschützt aufbewahrt und baldmöglichst wieder bei -80 °C weggefroren.

Sämtliche Pipettiervorgänge wurden auf Eis durchgeführt. Zunächst wurden pro Well 5 µl des Probenvolumens (verdünnte Probe, Positiv- oder Negativkontrolle) entsprechend des zuvor erstellten Plans in eine 384-Well-Platte vorgelegt. Im Anschluss wurde pro Probe 1 µl des entsprechenden Antikörper-Mix hinzugegeben. Zur Vermeidung des Entstehens von Luftblasen wurde dieser an den Rand gegeben und im Anschluss die 384-Well-Platte in einer Plattenzentrifuge bei 200

rpm an zentrifugiert, um ein Vermischen des Antikörper-Mixes mit der Probe zu gewährleisten.

Tabelle 43: Etablierte Antikörperkonzentrationen für die TR-FRET-Messung

Bestimmung von	Antikörper mit Markierung	Eingesetzte Masse per Probe
Gesamt ATXN3	N-term-tb	0,5 ng
	1H9-D2	10 ng
Expandiertes ATXN3 (>15 Q)	1H9-tb	0,5 ng
Expandiertes ATXN3 (>37 Q)	MW1-D2	3 ng
	1H9-tb	1 ng
	1C2-D2	3 ng

Im Anschluss wurde eine Kontrollmessung mit dem TR-FRET-Lesegerät durchgeführt. Diese diente lediglich der Feststellung grober Fehler, zum Beispiel zur Ermittlung der Frage, ob sich in jedem belegten Well auch Antikörper-Mix befand. Dies war der Fall, wenn die gemessene Fluoreszenz in jedem der Probenwells über der in den leeren Wells lag. Es folgte eine lichtgeschützte Inkubation der Platte über 24 Stunden. Dieser Schritt wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Die sich nach 24 Stunden anschließende Messung erfolgte erneut mit dem TR-FRET-Lesegerät und den in Tabelle 44 angegebenen Einstellungen. Die Wellenlänge von 620 nm für den Kanal 1 wurde so gewählt, um den verfügbaren Emissionsfiltern zu entsprechen.

Tabelle 44: Einstellungen für das TR-FRET-Lesegerät für die Messung

Einstellung	Wert
Gemessene Emission Kanal 1	620 nm
Gemessene Emission Kanal 2	665 nm
Zeitverzögerung der Messung	100 μ s
Messdauer	300 μ s

Aus den gemessenen Werten wurde nun zunächst das Verhältnis der beiden Emissionen berechnet:

$$\text{Ratio}_{\frac{665}{620}} = \frac{\text{Emission Kanal 2 (665 nm)}}{\text{Emission Kanal 1 (620 nm)}}$$

Aus diesen Werten wurde für jede Probe aus den beiden Duplikaten der Pipettierfehler bestimmt. Betrag dieser mehr als zehn Prozent, wurde die Messung verworfen und wiederholt. Zusätzlich wurde überprüft, ob der Wert der Positivkontrolle über allen anderen Werten lag. Nur, wenn dies der Fall war, konnte davon ausgegangen werden, dass auch in allen anderen Proben genug Antikörper für eine Sättigung der Proteine vorhanden war und die Messwerte damit als gültig angenommen werden. Die ΔF -Werte wurden dann wie folgt für jede einzelne Messung bestimmt:

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

Dadurch wurde die Hintergrundfluoreszenz (beschrieben als Mittelwert der beiden Verhältniswerte der Negativkontrolle) herausgerechnet. Das Ergebnis war ΔF als Signal der Probe über dem Hintergrund, angegeben in %. Zusätzlich wurde dem Umstand Rechnung getragen, dass alle Proben eine unterschiedliche Menge an Gesamtprotein beinhalten konnten. Dies wurde wie folgt korrigiert:

$$\Delta F_c = \frac{\Delta F}{\text{Gesamtproteinkonzentration} \left[\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{l}} \right]}$$

Dabei stellt die Gesamtproteinkonzentration den mit dem Bradford-Assay (siehe Kapitel 2.2.13 dar) bestimmten Wert dar, nachdem dieser auf die Konzentration in der entsprechend hergestellten Verdünnung heruntergerechnet wurde. Aus den jeweiligen ΔF_c -Werten der Duplikate einer Probe wurde dann der Mittelwert bestimmt.

2.2.15 Western Blot

Beschrieben und entwickelt von Burnette, 1981, Renart et al., 1979 und Towbin et al., 1979 stellt der Western Blot eine gängige und etablierte Methode des quantitativen und qualitativen Nachweises spezifischer Proteine dar. Dabei werden vorbereitend zunächst die in einer Probe enthaltenen Proteine nach dem Mechanismus der Elektrophorese der Länge nach in einem (Polyacrylamid-)Gel aufgetrennt. Aus dem Gel heraus folgt anschließend die Übertragung auf eine Nitrocellulosemembran im Rahmen des Western Blots. Die Proteine auf der Membran können im Anschluss mit Hilfe von Antikörpern dargestellt und damit nachgewiesen werden. Dafür wird ein Primärantikörper auf den Blot gegeben, der an das darzustellende Protein bindet. Dieser wird gefolgt von einem Sekundärantikörper, der zwei für die Methodik essenzielle Eigenschaften besitzt: Er ist gegen den Primärantikörper gerichtet und bindet damit an diesen, und er ist mit einer Fluoreszenz markiert. Diese Fluoreszenzmarkierung kann mittels geeigneter Gräte detektiert und dargestellt und damit indirekt das Zielprotein des Primärantikörpers nachgewiesen werden. Diese Zuordnung kann bei Mitlaufen eines Markers in der Elektrophorese und Darstellen dieses im Rahmen der Fluoreszenzdetektion durch eine passende Länge des denaturierten Proteins unterstrichen werden. Wird eine definierte Menge Protein eingesetzt sowie ein Housekeeping Protein detektiert, kann das Fluoreszenzsignal außerdem vermessen und damit die Proteinmenge quantifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden lediglich qualitative Darstellungen durchgeführt.

Für die Durchführung wurde zunächst die Gelkammer für die vorbereitende Elektrophorese zusammengebaut und mit Hilfe von destilliertem Wasser auf ihre Dichtigkeit überprüft. Im Anschluss wurde die Lösung für das Gel vorbereitet. Dieses besteht zweigeteilt aus einem Trenn- und einem Sammelgel, die getrennt voneinander angesetzt werden. Die Rezeptur für die beiden Gele ist in Tabelle 45 dargestellt. Dabei ist zu beachten, dass TEMED und die APS-Lösung erst kurz vor dem Gießen dazu gegeben werden, da mit der Zugabe die Polymerisation der Lösung beginnt.

Als erstes wurde nun das Trenngel in die Kammer gegossen. Zum Glätten wurde dieses anschließend mit Isopropanol überschichtet. Dieses konnte nach einer 15-

minütigen Phase des Aushärtens wieder abgegossen werden. Danach wurde die Gelkammer mit dem Sammelgel aufgefüllt und ein Kamm mit der gewünschten Anzahl an Taschen eingesteckt. Auch dieses musste 15 Minuten aushärten. Im Anschluss wurden die Gele mit der Taschenreihe nach oben in das Elektrophoresekammersystem eingebaut und dieses zwischen den gerade eingebauten Platten mit MOPS-Laufpuffer (1x) aufgefüllt. Nach dem vorsichtigen Entfernen des Kamms wurden auch die Geltaschen mit MOPS-Laufpuffer (1x) ausgespült, um mögliche Gelreste zu entfernen und damit ein gleichmäßiges und vergleichbares Laufbild aller Reihen zu gewährleisten.

Tabelle 45: Ansatz für das Gießen eines Gels für die Vorbereitung eines Western Blots, bestehend aus einem Sammel- und einem Trenngel

Reagenz	Menge für ein 6 %	Menge für ein 10 %
	Sammelgel	Trenngel
Destilliertes H ₂ O	1,29 ml	1,91 ml
Bis-Tris-Puffer (3,5x)	0,71 ml	1,42 ml
Acrylamid-Lösung (30%)	0,5 ml	1,67 ml
APS-Lösung, 10 %	12,5 µl	25 µl
TEMED	3,5 µl	7 µl

Da es sich hier um kostbare, lediglich einmal vorhandene humane Proben handelt, wurde im Gegensatz zum laborüblichen Protokoll für das Beladen des Gels ein kleinerer Probenansatz von 15 µl, enthaltend 15 µg Protein, gewählt. Diese Entscheidung wurde getroffen, um die Probe zu schonen und möglichst viele und gegebenenfalls weitergehende Analysen zu erlauben, da eine erneute Gewinnung insbesondere im Rahmen der möglichen Längsschnittbetrachtungen nicht möglich war. Außerdem wurde auf das Erstellen eines Lysats verzichtet und das Experiment stattdessen mit den zuvor nach dem in Kapitel 2.2.12 beschriebenen Vorgehen erstellten Homogenaten der jeweiligen Proben durchgeführt, um auch hier einen unnötigen Probenverlust durch die Lysatherstellung zu vermeiden. Die Proteinkonzentration wurde für jede Probe zuvor mit Hilfe des Bradford-Assays (siehe Kapitel 2.2.13) bestimmt. War es aufgrund einer zu geringen

Konzentration nicht möglich, 15 µg Protein in den Ansatz einzubeziehen, so wurde die maximal mögliche Proteinmenge hinzugegeben und dies entsprechend vermerkt, sodass diese Tatsache bei der Auswertung berücksichtigt werden konnte.

Für die Untersuchung wurde der Probenansatz wie in Tabelle 46 dargestellt vorbereitet und zur Denaturierung der enthaltenen Proteine für 10 Minuten bei 70 °C und 350 rpm in den Heizschüttler gestellt. Danach wurde jede Tasche mit 13 µl des Ansatzes beladen. Hierbei wurde jeweils nur bis zum ersten Druckpunkt der Pipette gearbeitet, um ein Aufsteigen der Probe aus der Tasche durch entstehende Luftblasen zu vermeiden. Zusätzlich wurde pro Gel mindestens eine Tasche mit 3 µl eines Markes (*Precision Plus Protein™ Dual Color Standards*) als Längenstandard befüllt. Hierbei wurde eine symmetrische Verteilung der beladenen Taschen eingehalten.

Tabelle 46: Probenansatz für die Gelelektrophorese zur Vorbereitung des Western Blots

Reagenz	Menge
Probenhomogenat	Passendes Volumen für eine Proteinmenge von 15 µg
1 M DTT-Lösung	1,5 µl
LDS-Puffer (4x)	3,75 µl
DPBS	Ansatz auf 15 µl auffüllen

Nach der Beladung wurde der Rest des Kammersystems mit MOPS-Laufpuffer (1x) aufgefüllt und zunächst eine Spannung von 80 V über das System und damit das Gel angelegt, um die Elektrophorese zu starten. Diese sorgte, ähnlich der bereits in Kapitel 2.2.3 für die Gelelektrophorese von DNA beschrieben, dafür, dass die Proteine sich durch das Gel bewegten. Kleinere Fragmente bewegen sich dabei schneller durch das Gel als größere, sodass die Fragmente der Länge nach aufgetrennt wurden. Nachdem die Proben die Taschen vollständig verlassen hatten, erkennbar an der sich fortbewegenden Ladepuffer-Lauffront, wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Die Elektrophorese wurde gestoppt, wenn die Lauf-front das untere Ende des Gels erreicht hatte.

Für den Western Blot und damit den Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Nitrocellulosemembran wurde 4 Mal Whatman-Filterpapier in der Größe 8,5 x 8,5 cm vorbereitet, sowie ein 7,5 x 7,5 cm Ausschnitt der 0,2 µm Nitrocellulosemembran. Diese wurden zunächst in Transferpuffer (1x) getränkt. Auch auf die Bestandteile der benötigten Blotting-Kassette wurde Transferpuffer (1x) gegeben. Das Gel wurde vorsichtig aus der Kammer gelöst. Im Anschluss wurde die Blotting-Kassette, wie in Abbildung 5 gezeigt, zusammengesetzt, begonnen am unteren Ende am Pluspol der Kassette. Dabei war es insbesondere wichtig, dass sich zwischen Gel und Membran keine Luftblasen befanden, die den Transfer behindern könnten. Jede einzelne Schicht wurde nach dem Auflegen mit Transferpuffer (1x) feucht gehalten, bevor die nächste darauf aufgelegt wurde.

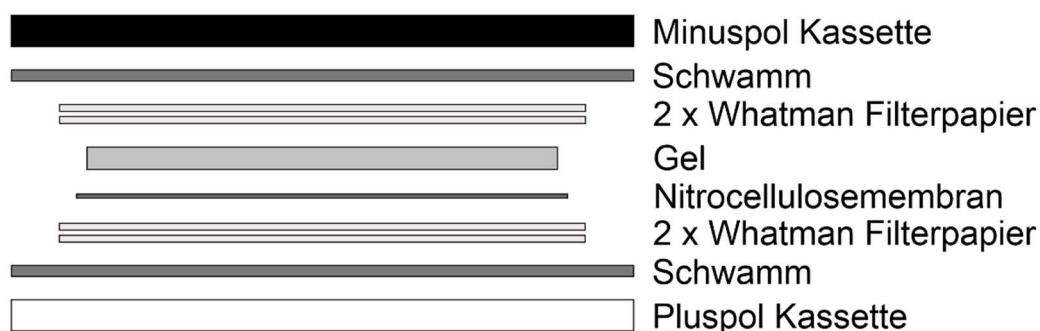


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Zusammenbaus der Blotting-Kassette für den Western Blot. Dieser wird von unten nach oben durchgeführt, begonnen am Pluspol der Kassette. Auf jede Schicht wird nach dem Auflegen Transferpuffer (1x) gegeben. Luftblasen zwischen dem Gel und der Nitrocellulosemembran waren zu vermeiden und wurden im Falle des Entstehens ausgestrichen. Um einen erfolgreichen Transfer zu gewährleisten, war insbesondere die Anordnung von Gel und Nitrocellulosemembran zwischen den Polen essenziell.

Nach dem Zusammenbau wurde die gesamte Kassette entsprechend der Polung in die Transferkammer eingesetzt und diese mit Transferpuffer (1x) aufgefüllt. Zusätzlich wurde ein Rührfisch mit in die Kammer gegeben und diese auf einen Magnetrührer gestellt. Der Transfer fand bei 4 °C und 80 V über 1,5 Stunden statt. Anschließend wurde die Membran in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

Zur Überprüfung des Transfers wurde aufgrund der hohen Sensitivität auch für geringe Proteinmengen ein SYPRO® Ruby Protein Blot Stain durchgeführt. Dabei wurde nach Anleitung des Herstellers (Version vom 30.02.2002) vorgegangen. Diese wurde wie folgt modifiziert: Für Schritt 1.1, 1.2 und 1.4 wurden dabei

jeweils 10 ml der entsprechenden Lösung eingesetzt; in Schritt 1.3 dagegen 5 ml des *SYPRO Ruby blot stain reagent*. Der Waschschrift in 1.4 wurde für 5 Mal je 2 Minuten durchgeführt. Sämtliche Inkubations- und Waschschriffe, auch im Folgenden, geschahen bei leichter Rotation, um eine gleichmäßige Verteilung der entsprechenden Lösung auf der gesamten Membran zu gewährleisten. Im Anschluss erfolgte die Detektion für 2 Minuten bei 600 nm im LI-COR® Odyssey® Fc Imaging System. Die Darstellung der Messung übernahm die Image Studio Software.

Zur Vorbereitung auf weitere Untersuchungen wurde die Membran geblockt. Dieser Vorgang sorgt dafür, dass die noch freien Proteinbindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran dem im weiteren Verlauf zugegebenen Antikörper nicht mehr zur Bindung zugänglich sind. Dadurch wird dessen Spezifität erhöht. Dafür wurde die Membran mit 5 ml *Blocking*-Puffer über 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und danach 2 bis 3 Mal für je 1 Minute mit 10 ml TBS-T (1x) gewaschen, bis die Waschlösung klar wurde.

Währenddessen wurde die Antikörperlösung für den Primärantikörper vorbereitet. Dafür wurde der entsprechende Antikörper in der in Tabelle 47 angegebenen Konzentration in 5 ml TBS-T (1x) mit 0,02 % NaN_3 gelöst. Letzteres gewährleistete die Qualität des Antikörpers für eine Wiederverwendung. Die Lösung mit dem Primärantikörper wurde nach dem *Blocking* auf die Membran gegeben und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die Antikörperlösung wurde im Anschluss bei 4 °C aufbewahrt und die Membran 3 Mal je 5 Minuten mit 10 ml TBS-T (1x) gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde ebenfalls in der in Tabelle 48 angegebenen Konzentration in 5 ml TBS-T (1x) gelöst und die Antikörperlösung nach dem Waschen auf die Membran gegeben. Die Inkubation erfolgte, da es sich hierbei um einen fluoreszenzmarkierten Antikörper handelt, lichtgeschützt für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach diesem Zeitraum wurde die Membran erneut 3 Mal je 5 Minuten mit 10 ml TBS-T (1x) gewaschen.

Für die Darstellung des Sekundärantikörpers wurde die Membran aus dem Reaktionsgefäß entnommen und mit einer Plastikfolie abgedeckt, wobei sichergestellt wurde, dass sich zwischen Folie und Membran keine Luftblasen befinden, die die Messung erschweren. Die anschließende Detektion im LI-COR®

Odyssey® Fc Imaging System erfolgte bei 600 und 700 nm für die Darstellung des Markers und bei der Wellenlänge der Fluoreszenz des Sekundärantikörpers, beschrieben in Tabelle 48. Eingestellt wurden hierfür die in Tabelle 49 angegebenen Parameter. Die anschließende Bearbeitung von Kontrast und Farbgebung geschah mit Hilfe der Image Studio Software.

Tabelle 47: Eingesetzte Primärantikörper für die Immundetektion des Western Blots. Diese wurden jeweils in der in Spalte 3 angegebenen Verdünnung in 5 ml TBS-T mit 0,02% NaN₃ gelöst. In Klammern ist die im Weiteren verwendete Abkürzung für Abbildungen und Analysen angegeben. Die Herstellerspezifikationen sind Tabelle 18 zu entnehmen.

Antikörper	Richtet sich gegen	Eingesetzte Verdünnung
1H9, anti-Ataxin-3, produziert in Maus (1H9)	Ataxin-3	1:2500
anti-α-Spectrin, produziert in Maus (anti-Spectrin)	α-Spectrin	1:1000

Tabelle 48: Eingesetzte Sekundärantikörper für die Immundetektion des Western Blots. Diese wurden jeweils in der in Spalte 3 angegebenen Verdünnung in 5 ml TBS-T gelöst. In Klammern ist die im Weiteren verwendete Abkürzung für die Abbildungen und Analysen angegeben. Die Herstellerspezifikationen sind Tabelle 18 zu entnehmen.

Antikörper	Richtet sich gegen	Eingesetzte Verdünnung	Wellenlänge der Fluoreszenz
IRDye® 800CW, Goat anti-Mouse (anti-ms)	In Maus produzierte Primärantikörper	1:5000	800 nm

Tabelle 49: Detektionseinstellungen in der Image Studio Software.

Detektion bei	Dauer
600 nm	0,5 min
700 nm	0,5 min
Wellenlänge der Fluoreszenz des Sekundärantikörpers	4 min

Um die Membran für die Zugabe eines weiteren Antikörpers vorzubereiten, wurde diese im Anschluss zurück in das Reaktionsgefäß überführt und ein *Stripping* durchgeführt. Dies bewirkte das Lösen der zuvor eingesetzten Antikörper. Dabei waren die Inkubationszeiten genau einzuhalten, um eine akzidentielle Lösung des Probenproteins von der Membran zu vermeiden. Für das *Stripping* wurde die Membran mit 5 ml *Stripping*-Puffer für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss 3 Mal je 5 Minuten mit 10 ml TBS-T (1x) gewaschen.

Die so vorbereitete Membran konnte nun bei 4 °C im Reaktionsgefäß aufbewahrt werden. Alternativ war nach einem erneuten Blocken die Zugabe eines erneuten Primär- und Sekundärantikörpers möglich.

2.2.16 **Statistische Auswertung**

Die statistischen Auswertungen wurden mit Microsoft Excel 365 Plus sowie GraphPad Prism 9 durchgeführt. Hierfür wurde Microsoft Excel insbesondere für die Datenverwaltung und -sortierung sowie für die Berechnung von Mittelwerten verwendet. Außerdem erfolgte hiermit die Erstellung sämtlicher Kuchendiagramme. Die Berechnung aller weiterer statistischer Daten, die Durchführung statistischer Tests sowie die Erstellung aller über Kuchendiagramme hinausgehenden statistischen Grafiken erfolgte mittels GraphPad Prism 9.

Bei der Analyse mehrerer Datengruppen wurden diese im Fall von mehr als zwei miteinander zu vergleichenden Gruppen zunächst im Kruskal-Wallis-Test für mehr als zwei nicht-normalverteilte Kohorten gemeinsam auf statistisch signifikante Unterschiede geprüft und, sofern signifikante Unterschiede festgestellt wurden, die einzelnen Gruppen mittels Mann-Whitney-Test miteinander verglichen und auf Signifikanz geprüft.

Für Korrelationsanalysen wurde zunächst der Shapiro-Wilk-Test verwendet, um zu ermitteln, ob die Daten normalverteilt waren. Diese Entscheidung wurde getroffen, da je nach Analyse neben größeren Kohorten, für die zum Beispiel auch der Anderson-Darling-Test verwendet werden könnte, auch kleinere Stichproben vorhanden waren. Um eine einheitliche Analyse zu gewährleisten, wurde daher durchgehend der Shapiro-Wilk-Test verwendet.

Wenn eine Normalverteilung vorlag, wurde im Anschluss der Pearson-Test für normalverteilte Daten zur Prüfung auf eine Korrelation verwendet, andernfalls wurde dies mit dem Spearman-Test, der auch auf nicht-normalverteilte Kohorten anwendbar ist, durchgeführt.

Für die graphische Darstellung wurde im Falle der Darstellung von Korrelation für jeden Datenpunkt ein graphischer Punkt eingesetzt. Im Rahmen von Boxplots präsentiert die Box stets den Interquartilsabstand, geteilt durch den Median, und die Whisker das Minimum und Maximum der Daten.

3 Ergebnisse

3.1 Einführung und Übersicht

Die Spinozerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3) ist eine neurodegenerative Erkrankung, die autosomal dominant vererbt wird. Krankheitsverursachend ist, ähnlich wie bei Erkrankungen wie der Chorea Huntington, ein expandierter PolyQ-Trakt. Dieser liegt im Ataxin-3-Protein und ist die Folge eines ebenfalls expandierten CAG-*Repeats* im *ATXN3*-Gen. Diese genetische Veränderung liegt bei den meisten Patienten heterozygot vor. Die Erkrankung führt zu einem Untergang von Neuronen im Kleinhirn. Es kommt dadurch unter anderem zu ataktischen Störungen in der Koordination und Motorik, in der Sprache und im Gangbild. Die Krankheitsschwere wird dabei mit Hilfe klinischer Scores wie der *Scale for the Assessment and Rating of Ataxia* (SARA), der ein Maß für die ataktischen Symptome darstellt (Schmitz-Hübsch et al., 2006), und dem *Inventory of Non-Ataxia Symptoms* (INAS) zur Messung der extrazerebellären Symptome (Jacobi et al., 2013) ermittelt.

Während einzelne Facetten der SCA3, wie zum Beispiel der Tremor, symptomatisch behandelt werden können, gibt es bisher keine etablierte Therapie, die zur Heilung der Erkrankung führt oder ein Fortschreiten dieser verhindert. Für die Etablierung neuer Therapiekonzepte ist ein gutes, objektives Monitoring des Krankheitsverlaufs unabdingbar. Da klinische Scores wie SARA und INAS mit ihren eigenen Schwächen einhergehen, ist die Erforschung möglicher Biomarker für die Therapieentwicklung ein wichtiger Fokus. Das Level des Ataxin-3-Proteins in PBMCs, bestimmt mittels TR-FRET, wurde bereits in vorangegangenen Studien als potenzieller Biomarker untersucht. Dies wird im Rahmen dieser Arbeit fortgeführt.

Dabei war es das Ziel dieser Arbeit, biologische humane Proben von zwei verschiedenen Kohorten zu gewinnen und zu verwenden. Eine Kohorte wurde im Rahmen des ESMI-Projekts (*European Spinocerebellar Ataxia Type 3/Machado-Joseph Disease Initiative*) zusammengestellt und analysiert. Im Rahmen dieser wurden Proben aus verschiedenen europäischen SCA3-Zentren, einschließlich Deutschland (aus Bonn, Tübingen, Aachen und Heidelberg; zusammengeführt in Bonn und Tübingen), Portugal (aus Coimbra und von den Azoren), UK (aus

London) und aus den Niederlanden (aus Groningen und Nijmegen; zusammengeführt in Nijmegen) gesammelt und zur Untersuchung zusammengeführt. Sie umfasst neben an SCA3 erkrankten Personen, die ataktische Symptome aufweisen, auch gesunde Kontrollen sowie eine Stichprobe präataktischer Mutationsträger. Neben der Erhebung anamnestischer und klinischer Parameter wie dem Erkrankungsalter, der Erkrankungsdauer, dem Zeitpunkt der letzten Nahrungsaufnahme vor der Untersuchung und dem SARA- und INAS-Score wurden von diesen Patienten Blut- und PBMC-Proben hoch standardisiert entnommen und bearbeitet (Santana et al., 2023). Für einzelne Probanden gab es außerdem eine zweite Probe, die etwa ein Jahr später entnommen wurde, wodurch longitudinale Analysen möglich waren. Diese Proben wurden gemeinschaftlich und über einen längeren Zeitraum von verschiedenen Doktorand*innen der Arbeitsgruppe bearbeitet und analysiert, sodass hier bereits einiges an Ergebnissen vorlag. Der Anteil dieser Arbeit ist in Kapitel 0 dargestellt. Eine zweite Kohorte wurde zum Vergleich im Serviço de Genética Médica des Hospital de Clínicas de Porto Alegre in Porto Alegre, Brasilien, gewonnen. Auch hier handelte es sich um Kontrollprobanden sowie präataktische und bereits erkrankte Mutationsträger. Anamnestische und klinische Daten auch hier erhoben sowie PBMC-Proben für Proteilmessungen abgenommen. Die Bestimmung der *CAG-Repeat*-Länge erfolgte noch in Brasilien und wurde für statistische Analysen übermittelt.

Zentraler Bestandteil dieser Arbeit sollte die Analyse der Kohorte aus Brasilien sowie deren Vergleich mit der zuvor bereits ausgewerteten Kohorte aus dem ESMI-Projekt werden. Ein hierbei interessanter Faktor war zum Beispiel die Untersuchung eines möglichen Einflusses der Nahrungsaufnahme auf das Level des gemessenen Ataxin-3 im TR-FRET, da sämtliche Probanden der Brasilien-Kohorte nüchtern zur Probenentnahme kamen. Aufgrund von Komplikationen und Schwierigkeiten beim Transport sowie einer daraus folgenden Unsicherheit über die Einhaltung der Kühlkette war die Qualität der Proben aus Brasilien allerdings nicht sichergestellt. Deswegen wurde diese über die Analyse eines Western Blots gesondert untersucht und beurteilt. Die PBMC-Proben wurden zwar ebenfalls lysiert und mit dem TR-FRET untersucht; ein Schwerpunkt lag aber

auch hier auf der Analyse der demographischen, anamnestischen und klinischen Daten.

Bestimmt wurden neben der Ataxin-3-Konzentration im TR-FRET auch bestimmte Polymorphismen (SNPs) und deren möglicher Einfluss. Da Parkin einen wichtigen Interaktionspartner von Ataxin-3 darstellt, wurden neben drei SNPs des *ATXN3*-Gens auch zwei SNPs des *PARK2*-Gens untersucht.

Abbildung 6 gibt einen schematischen Überblick über die erfolgten Arbeitsschritte und Untersuchungen für die einzelnen Proben.

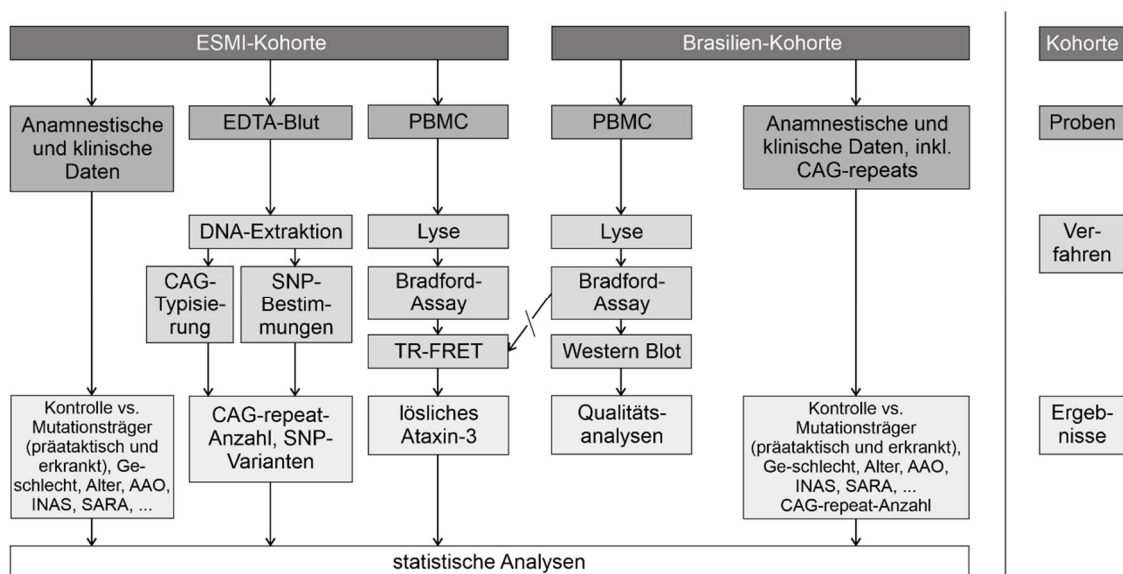


Abbildung 6: Workflow dieser Promotion. Aus den jeweiligen Kohorten wurden verschiedene Proben entnommen und diese je nach Zielparameter analysiert. Am Ende steht die statistische und vergleichende Auswertung sämtlicher erhobenen Daten. PBMC = mononukleären Zellen des peripheren Bluts, TR-FRET = time-resolved fluorescence energy transfer, AAO = Age at Onset, INAS = Inventory of Non-Ataxia Symptoms, SNP = Single Nucleotide Polymorphism, SARA = Scale of the Assessment and Rating of Ataxia.

Es wurden unter anderem folgende Fragestellungen analysiert:

- Lässt sich die in Costa et al., 2019 beschriebene Multiplex-PCR in unserem Labor nachstellen?
- Sind die aus Brasilien erhaltenen Proben in ihrer Qualität eingeschränkt?
- Welche Einflussfaktoren könnten die Ataxin-3-Messwerte in den analysierten Proben beeinflussen?
- Wie sind die untersuchten Kohorten zusammengesetzt?

- Bestehen Zusammenhänge zwischen anamnestischen und klinischen Daten und der gemessenen Ataxin-3-Konzentration in PBMCs?
- Beeinflussen die untersuchten SNPs im *ATXN3*-Gen oder im *PARK2*-Gen diese Daten?

3.2 Methodenetablierung

3.2.1 Etablierung einer Multiplex-PCR nach Costa et al., 2019 für verschiedene SNPs des *ATXN3*-Gens

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, zur Vereinfachung und Optimierung der Bestimmung mehrerer SNPs eine *Multiplex*-PCR aus dem Paper „A Pipeline to Assess Disease-Associated Haplotypes in Repeat Expansion Disorders: The Example of MJD/SCA3 *Locus*“ (Costa et al., 2019) in unserem Labor zu etablieren. Hierfür wurden verschiedene Schritte der PCR-Optimierung angewendet. Die genaue Schrittabfolge und die jeweiligen Spezifikationen sind in Kapitel 2.2.10 ausführlich beschrieben und hier zum besseren Verständnis noch einmal kurz erläutert.

Zunächst wurde die im *Paper* beschriebene *Multiplex*-PCR in auf zwei *Singleplex*-PCR mit jeweils einem der beschriebenen Primer-Paare heruntergebrochen, um diese schrittweise zu etablieren. Dies führte zu den im folgenden PCR 1 und PCR 2 genannten Ansätzen (die respektive *Primer*-Paar 1 und 2 enthielten), die jeweils parallel mit den gleichen Schritten bearbeitet und angepasst wurden. Zur Übersicht sind die jeweiligen Anpassungen in Tabelle 50 noch einmal zusammengefasst dargestellt.

Für einen ersten Versuch wurden dabei die im *Paper* beschriebenen Reaktionsbedingungen mit den üblicherweise in unserer Arbeitsgruppe verwendeten Reagenzien angewandt. Für die ausgewählten Proben waren die zu untersuchenden SNPs zuvor bereits mittels Sanger-Sequenzierung und HRMA bestimmt worden (siehe Kapitel 2.2.6 und Kapitel 2.2.8). Dadurch war eine Überprüfung des Ergebnisses mittels zuvor etablierter Methoden möglich. Vor einer weiteren Analyse des PCR-Produkts wurde der Reaktionserfolg mittels eines

Kontrollagarosegels überprüft (Abbildung 7a). Es konnte allerdings weder bei PCR 1 noch bei PCR 2 ein PCR-Produkt festgestellt werden. Dies galt für alle Proben.

Tabelle 50: Zusammenfassende Darstellung der in Kapitel 2.2.10 dargestellten Anpassungen der Reaktionsbedingungen für die Etablierung der Multiplex-PCR nach Costa et al., 2019. Spalte zwei bezieht sich dabei auf den entsprechend beschrifteten Teil in Abbildung 7.

Versuchsreihe	Korrespondierende Abbildung	Ansatzspezifikationen
1	Abbildung 7a	Ansatz und Reaktionsbedingungen wie im <i>Paper</i> beschrieben
2	b	Gradienten-PCR
3	c	Touchdown-PCR
4	d	Gradienten-PCR mit <i>Pwo</i> -Polymerase
5 / 6	e	5 (PCR 1): Touchdown-PCR 6 (PCR 2): Verwendung der aus 4 etablierten <i>Annealing</i> -Temperatur von 50 °C Für beide jeweils ein Ansatz mit Q-Solution (wie 4), Betain, und unterschiedlicher MgSo ₄ -Konzentration (3 bzw. 4 mM)

Im Rahmen der Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde dann sowohl eine Gradienten-PCR (Kontrollgel gezeigt in Abbildung 7b) und eine Touchdown-PCR (Kontrollgel gezeigt in Abbildung 7c) durchgeführt. Auch hierbei konnte kein PCR-Produkt dargestellt werden, sodass von einem Misserfolg der PCR ausgegangen wurde.

Als nächster Schritt wurde die üblicherweise verwendete Taq-Polymerase im Reaktionsansatz durch eine *Pwo*-Polymerase ersetzt. Diese besitzt laut technischem Datenblatt des Herstellers wesentlich andere Eigenschaften, unter anderem in Bezug auf die Amplifikation C-G-reicher Sequenzen, die generelle Amplifikationsgeschwindigkeit sowie eine *proofreading*-Aktivität. Zusätzlich erlaubt die Mitlieferung eines Puffers ohne MgSo₄ sowie dessen separate Bereitstellung die Anpassung der MgSo₄-Konzentration im Reaktionsansatz. Nach Angaben des

Datenblatts können Sequenzen bis zu 3 kbp gut amplifiziert werden. Da mit den angegebenen *Primer*-Paaren eine Sequenz von 1500 bis 1550 bp amplifiziert werden sollte, wurde die *Pwo*-Polymerase für passend befunden. Die Reaktionsbedingungen wurden an die Verwendung der anderen Polymerase angepasst, und für beide PCR-Ansätze eine Gradienten-PCR durchgeführt. Für PCR 1 konnte auch in diesem Ansatz kein PCR-Produkt im Kontrollgel (Abbildung 7, Teil d) dargestellt werden. Bei PCR 2 kam es dagegen zu einer schwach erkennbaren Bande bei einer Annealing-Temperatur von 50,1 °C (Abbildung 7, Teil d, mit 1 markiert). Diese konnte mithilfe des Markers auf eine Länge zwischen 1000 und 3000 bp festgelegt werden. Da der von den *Primern* umrahmte, zu amplifizierende DNA-Abschnitt 1508 bp betragen sollte, wurde hier unter Vorbehalt davon ausgegangen, dass es sich um das geplante PCR-Produkt handeln könnte.

Zur weiteren Optimierung und Testung der Reproduzierbarkeit des Ergebnisses wurden im Folgenden vier verschiedene Reaktionsansätze verwendet. Für den ersten wurde, wie auch zuvor, Q-Solution zur Verbesserung der PCR-Ausbeute verwendet. In einem zweiten Ansatz wurde stattdessen Betain eingesetzt, das alternativ als PCR-verstärkend beschrieben wird. In einem dritten und vierten Ansatz wurde auf beide Zusätze verzichtet. Stattdessen wurde durch die manuelle Zugabe von MgSO₄, das in diesem Fall nicht im Puffer enthalten war, die MgSO₄-Konzentration verändert, da eine zu niedrige Mg²⁺-Konzentration laut Datenblatt der *Pwo*-Polymerase eine Ursache für ein fehlendes Produkt sein kann. Diese Vorgehensweise wurde für beide Reaktionsansätze durchgeführt. Für PCR 1 wurde dabei wie auch in Ansatz 3 eine Touchdown-PCR gewählt. Für PCR 2 wurde das PCR-Programm aus Ansatz 1 verwendet. Allerdings wurde die *Annealing*-Temperatur auf die zuvor in der Gradienten-PCR ermittelten 50 °C festgelegt. Beim Analysieren der Kontrollgele (Abbildung 7, Teil e) konnte hier erneut kein PCR-Produkt dargestellt werden. Auch das scheinbare Produkt aus der zuvor durchgeführten Gradienten-PCR von PCR 2 war hier nicht erkennbar, sodass die Reproduktion als fehlgeschlagen betrachtet wurde. Stattdessen war in mehreren Ansätzen eine Bande, die dank des Markers auf deutlich kürzer als 500 bp festgelegt werden konnte, zu erkennen. Dies betraf in stärkerer Form die Ansätze mit 3 mM MgSO₄ (Abbildung 7e, markiert mit *) sowie in schwächerer Form den

Ansatz mit 4 mM MgSO₄ für PCR 1 (Abbildung 7e, markiert mit ^). Aufgrund der Länge ist auszuschließen, dass es sich um das gewünschte PCR-Produkt handelte. Als mögliche Ursache ist aufgrund der sehr kurzen Länge die Bildung von *Primer-Dimer* in Betracht zu ziehen. Eine andere Option wäre eine Verunreinigung des MgSO₄ beziehungsweise des hierfür verwendeten Puffers ohne Mg²⁺, da die Bande ausschließlich in den Ansätzen auftritt, in denen dieses verwendet wurde. Dagegen spricht allerdings, dass die Ansätze mit höherer MgSO₄-Konzentration im Vergleich zu denen mit niedrigerer Konzentration keine oder nur eine gering ausgeprägte Bande dieser Länge aufweisen. Ebenfalls möglich ist, dass durch die erhöhte MgSO₄-Konzentration eine unspezifische Bindung an einen anderen als den gewünschten DNA-Abschnitt hervorgerufen wurde, der hier amplifiziert wurde.

Aufgrund der Tatsache, dass das vermutete PCR-Produkt aus Ansatz 4 nicht replizierbar war, sowie kein weiterer Reaktionserfolg erzielt werden konnte, wurde die Versuchsreihe an dieser Stelle abgebrochen.

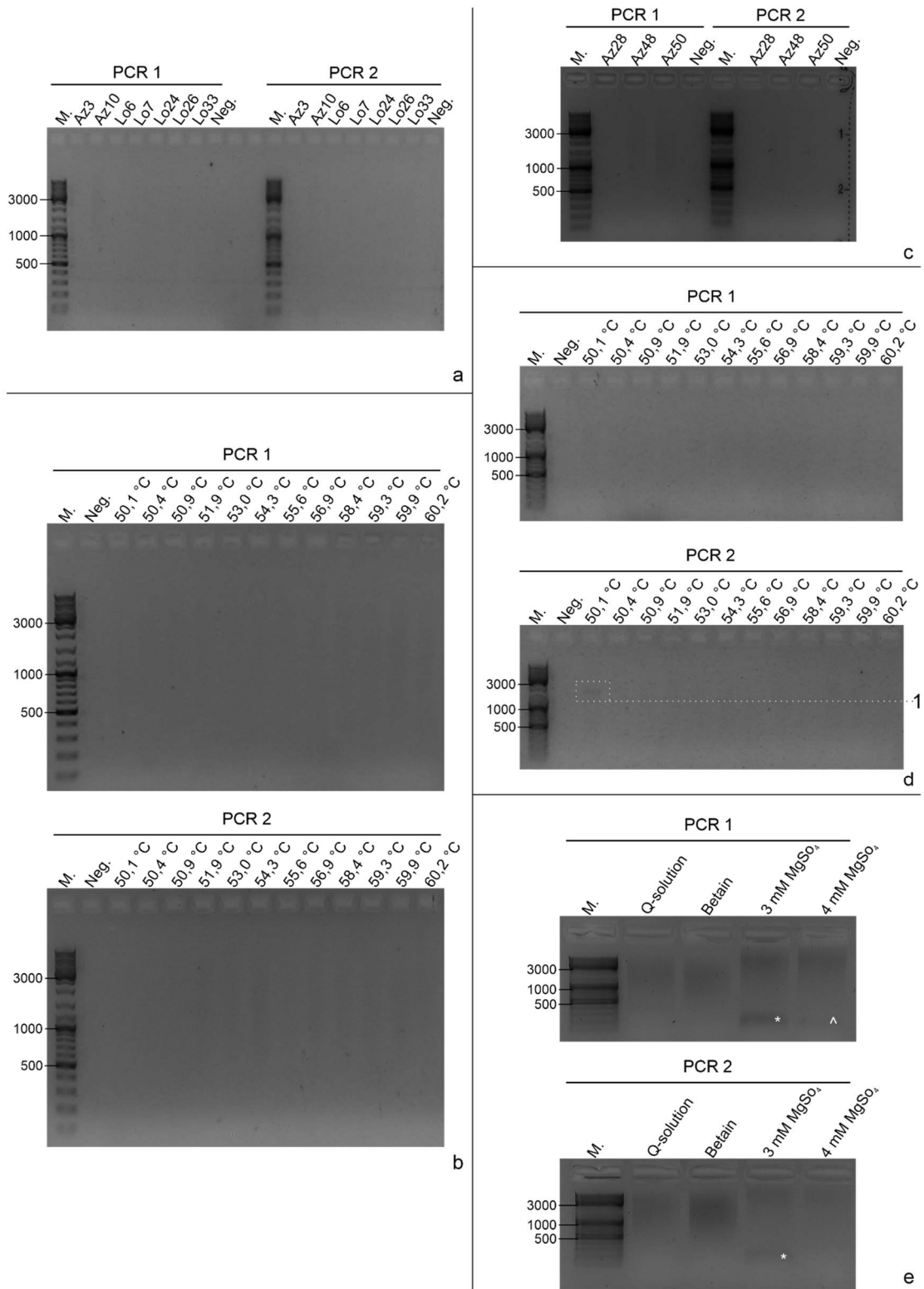


Abbildung 7: Darstellung der Kontrollagarosegele zur Überprüfung des Reaktionserfolgs bei der Etablierung der Multiplex-PCR nach Costa et al., 2019. Die jeweils angewendeten Reaktionsbedingungen und Anpassungen sind zur besseren Übersicht in Tabelle 50 zusammenfassend dargestellt. PCR 1 und PCR 2 stellen die PCR-Ansätze mit Primer-Paar 1 und 2 respektive dar. Angaben der Größe der Markerbanden in Basenpaaren (bp). M. = Marker, Neg. = Negativkontrolle, AzXX / LoXX = Anonymisierte Kürzel zur Probenidentifizierung. a: Ansatz 1: mit den im Paper dargestellten Reaktionsansätzen und Mengen. Es ist kein PCR-Produkt zu erkennen. b: Ansatz 2: Gradienten-PCR mit

einem Temperatur-Gradienten von 50 – 60 °C für die Annealing-Phase der PCR. Es ist kein PCR-Produkt zu erkennen. c: Ansatz 3: Touchdown-PCR. Es ist kein PCR-Produkt zu erkennen. d: Ansatz 4: Gradienten-PCR und Austausch der zuvor verwendeten Taq-Polymerase zu Pwo-Polymerase. Für PCR 1 ist kein PCR-Produkt zu erkennen. Für PCR 2 ist eine schwache Bande von einer Länge zwischen 1000 und 3000 bp bei einer Annealing-Temperatur zu sehen (1). e: Verschiedene Ansätze zur Optimierung des Reaktionsansatzes: Verwendung von Q-Solution (entspricht dem Ansatz in d), Austausch von Q-Solution durch Betain, Einsatz von MgSo₄ in verschiedenen Konzentrationen (3 und 4 mM). Ansatz 5: Durchführen einer Touchdown-PCR für PCR 1. Ansatz 6: Durchführen des Standard-PCR-Protokolls für PCR 2 mit der aus dem vorherigen Ansatz abgeleiteten Annealing-Temperatur von 50 °C. Es war weder bei PCR 1 noch bei PCR 2 ein Reaktionsprodukt zu erkennen. Auch die Bande aus Ansatz 4 war in Ansatz 6 nicht reproduzierbar. Für beide Primer-Paare war eine schwache Bande kürzer als 500 bp im Ansatz mit einer 3 mM MgSo₄-Konzentration zu sehen (*). Diese wiederholt sich in schwächerer Form zumindest bei PCR 1 im Ansatz mit 4 mM MgSo₄ (^). Dargestellt ist das Kontrollagarosegel nach einer Laufzeit von 20 min. Um auszuschließen, dass sich nach längerer Laufzeit noch eine Bande herauskristallisiert, lief das Gel noch weitere 20 min und wurde dann erneut fotografiert (nicht gezeigt). Es kam zu keiner sichtbaren Veränderung.

3.2.2 Bestimmung der Qualität der Proben aus Brasilien

Aufgrund diverser Schwierigkeiten beim Transport der Proben aus Brasilien, die weder von Wissenschaftler*innen unserer Arbeitsgruppe noch durch die Mitarbeiter*innen am Hospital de Clínicas de Porto Alegre beeinflusst werden konnten, war die Qualität der Proben fraglich. So erreichten diese unser Institut im Rahmen von Wochen anstelle von Tagen nach dem Verschicken in einer vollständig zerstörten Styroporbox mit einzelnen, größtenteils geschmolzenen Eiswürfeln (siehe Abbildung 8).



Abbildung 8: Transportbox, in der die Proben aus Brasilien in unserem Labor ankamen. In einer zerbeulten, durchweichten Kartonbox war eine Styroporbox mit herausgebrochenem Boden gepackt. Im Inneren fanden sich neben den aufgetauten Proben einige wenige Eiswürfel. Die Proben hatten eine geschätzte Temperatur von etwa 4 bis 10 °C.

Da die Proben bei Ankunft kühl (geschätzt zwischen 4 und 10 °C), aber nicht gefroren waren und sich auch kein Trockeneis in der Lieferung befand, war davon auszugehen, dass während des Transports keine ausreichende Kühlung stattgefunden hat. Da es sich hier um Proteinproben handelte, die üblicherweise sehr empfindlich gegenüber Umwelteinflüssen sind, stand die Frage einer eingeschränkten Probenqualität im Raum. Gleichzeitig war es genau dieser Umstand, der die Proben so bedeutsam machte: Wie im Folgenden in Kapitel 3.3.2 dargestellt, handelte es sich hierbei um 84 Proben von menschlichen Probanden, die daher zu diesem Zeitpunkt und im Zusammenhang mit den erhobenen Untersuchungsergebnissen nicht reproduzierbar sind. Auch macht die Tatsache, dass es sich bei der SCA3 um eine seltene Erkrankung handelt, die Patientenrekrutierung schwieriger, und an die teilweise bereits in mehrfachen Studien eingeschlossenen (und teilweise durch ihre Krankheit belasteten und eingeschränkten) Probanden sollten nicht zu viele Ansprüche im Zusammenhang mit teils langen Anreisen zu entsprechenden Zentren gelegt werden. Das alles wäre Arbeit, die nötig wäre, um zumindest einen Teil der Proben in ähnlicher Form wiederzubeschaffen, und die deutlich macht, warum jede auf diese Art und Weise gewonnene Kohorte für sich gesehen einzigartig ist.

Daher wurden trotz der ungewissen Qualität Untersuchungen mit den Proben vorgenommen. Dafür wurden diese zunächst wie in Kapitel 2.2.12 bis 2.2.13 beschrieben verarbeitet. Dann wurde ein Western Blot durchgeführt, um zu analysieren, ob, wie vermutet, eine Proteindegradation der Probe stattgefunden hat. Hierbei wurden neben 5 Proben aus Brasilien auch zwei PBMC-Proben aus der ESMI-Kohorte analysiert, um beurteilen zu können, welche eventuell auftretenden Beobachtungen auf die generell durchgeführten Verfahren zurückzuführen sind, und welche spezifisch mit den suboptimalen Transportbedingungen zu tun haben könnten.

Dabei wurde nach Durchführung des Western Blots zunächst ein *SYPRO® Ruby Protein Blot Stain* zur Ladekontrolle durchgeführt (Abbildung 9a). In der Darstellung zeigte sich zum einen eine nicht ganz gleichmäßige Beladung des Blots, insbesondere zwischen den beiden ESMI-Proben, die vermutlich durch

Schwierigkeiten bei der Beladung entstanden waren. Insbesondere die Proben der ESMI-Kohorte gingen durch schon vielfach durchgeführte Analysen durch mehr Auftauzyklen und auch die Konsistenz der Lysate war nicht ganz homogen, sodass das Pipettieren in die Taschen mit Schwierigkeiten behaftet war. Zum anderen war zu sehen, dass in allen Reihen dennoch Protein vorhanden war, sodass mit der Analyse des Western Blots fortgefahren wurde.

Im zweiten Schritt wurde dafür ein anti- α -Spectrin-Antikörper eingesetzt. α -Spectrin ist Bestandteil des Zytoskeletts und in vollständiger Form 280 kDa lang und wird durch Calpain-gesteuerte Nekrose und Caspase-gesteuerte Apoptose in Proteinfragmente der Länge 150 kDa und 145 kDa beziehungsweise 120 kDa und 150 kDa gespalten (J. Li et al., 2010). Daher wurde in diesem Fall das Vorhandensein von Spectrin-Spaltprodukten als Zeichen für eine vorangegangene Proteindegradation untersucht, was ein Zeichen dafür wäre, dass auch Aussagen über andere Proteine aus diesen Proben nicht mehr zuverlässig möglich sein könnten. Im entsprechenden Western Blot (Abbildung 9b) war anhand dieser Informationen für die Proben der ESMI-Kohorte eine Bande zu erkennen, die der Länge (etwas größer als 250 kDa) nach vermutlich vollständigem (full-length, fl, markiert mit schwarzem Pfeil) α -Spectrin entspricht. Diese Bande fehlte in den Proben aus Brasilien vollständig. Zusätzlich fanden sich sowohl in den Proben der ESMI-Kohorte als auch in denen aus Brasilien verschieden stark ausgeprägte Banden unterschiedlicher Länge (um die 150 kDa, zwischen 100 und 150 kDa und etwas größer als 100 kDa), die von der Länge her zu Spaltprodukten des α -Spectrin passen könnten (markiert mit einem weißen Pfeil). Während also in den ESMI-Proben sowohl unprozessiertes als auch degradiertes α -Spectrin vorlag, ist ersteres in den Proben aus Brasilien vollständig abgebaut.

Zur Detektion des Erkrankungsproteins Ataxin-3 wurde zusätzlich noch eine weitere Analyse mit einem Anti-Ataxin-3-Antikörper durchgeführt (Abbildung 9c). In dieser zeigte sich keine spezifische, auf Ataxin-3 zurückzuführende Bande, die je nach Größe des *Repeats* bei etwa 42 bis 60 kDa zu erwarten wäre. Einzelne stärker aus dem Hintergrund herausstechende Banden (mit schwarzen Pfeilen markiert) passen von der Lokalisation her zu einer Redetektion des α -Spectrins, da beide Untersuchungen einen in Maus hergestellten Primär- und damit den

gleichen Sekundärantikörper verwendet haben. Die Tatsache, dass kein Ataxin-3 zu erkennen ist, könnte zum einen daran liegen, dass dieses ebenfalls degradiert ist und daher nicht mehr bestimmt werden kann, zum anderen aber auch dadurch bedingt sein, dass die Methode hierfür für die eingesetzten Proteinmengen nicht sensitiv genug war. Diese generell vorhandene Problematik (die fehlende Nachweismöglichkeit von sehr kleinen Proteinmengen im Western Blot) wurde dadurch verstärkt, dass im Vergleich zu den üblichen 30 - 50 µg hier nur 15 µg Protein eingesetzt wurden. Diese Entscheidung war bedingt durch die bereits beschriebene Herkunft und Einzigartigkeit der Proben und den damit verbundenen Wunsch, nicht zu viel davon zu verbrauchen, ging aber zu Lasten der Sensitivität des erstellten Western Blots.

Daher wurden die Proben im Anschluss noch mit Hilfe des TR-FRET untersucht. Hierbei handelt es sich um eine hochempfindliche Methode, die auch geringe Mengen Protein (ng - µg) nachweisen kann. Dabei werden zwei Antikörper, die relativ nah beieinander an das zu messende Zielprotein binden, mit zwei Fluorophoren mit spezifischen Eigenschaften versehen. Davon überträgt der erste, wenn er mit einem Laser auf einer bestimmten Frequenz angeregt wird, Energie auf den zweiten Fluorophor, sofern er sich nah genug am ersten befindet. Diese Nähe wird durch die Bindung der Antikörper an das Protein festgestellt. Der zweite Fluorophor wiederum erzeugt eine dadurch dann spezifische, langlebige Emission, die gemessen werden kann. Das gemessene Signal in % über dem Hintergrund, auf die Gesamtproteinmenge in einer Probe normalisiert (ΔF_c), ist dabei dann proportional zum Anteil des Zielproteins in dieser Probe. Verwendet wurden hierbei zwei spezifische Antikörperkombinationen. Beide beinhalteten als eine Kombination den Antikörper 1H9, der spezifisch für Ataxin-3 ist. In einer Messreihe wurde dieser mit MW1 kombiniert, das bevorzugt expandierte PolyQ-Regionen bindet, in dieser Kombination aber auch nicht-expandiertes Ataxin-3 nachweisen kann. In einer zweiten kam es zu einer Kombination mit 1C2, das expandiertes Ataxin-3 ab einer PolyQ-Länge von mindestens 37 Glutaminen misst.

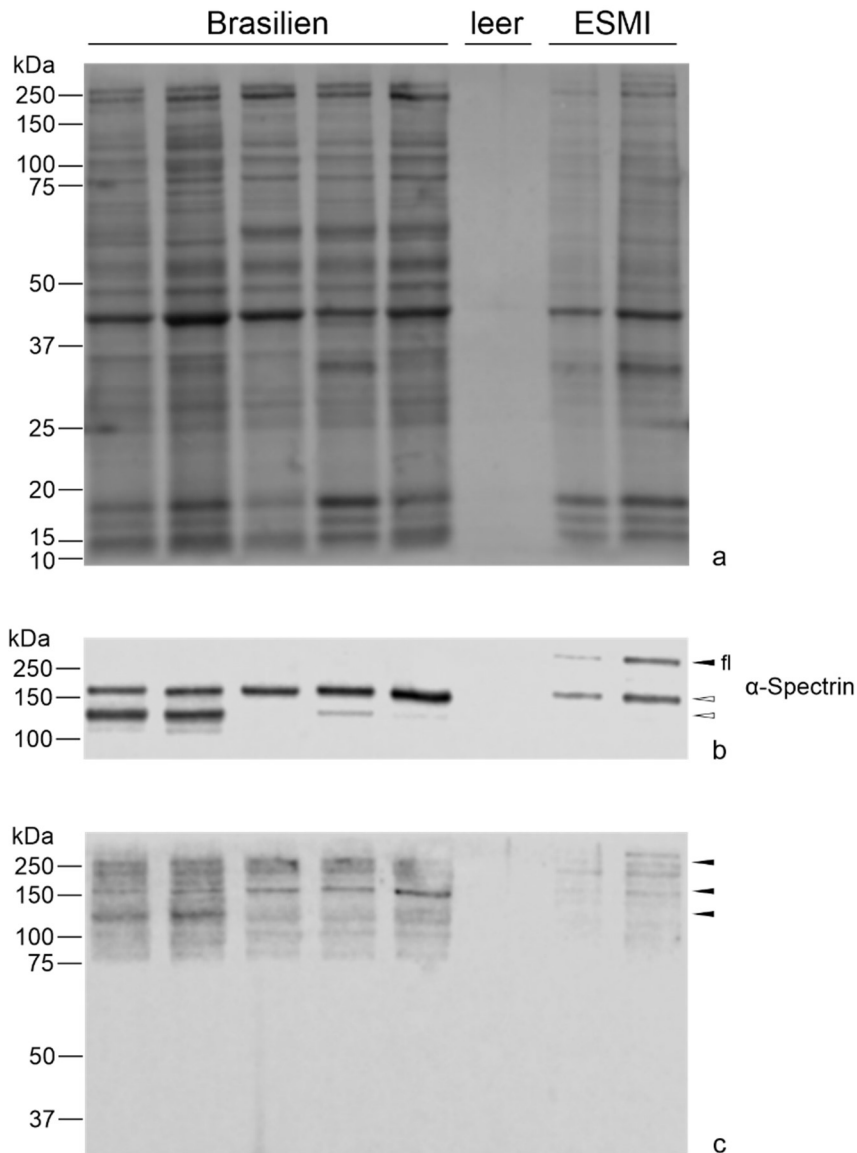


Abbildung 9: Western Blot einiger Proben aus Brasilien und der ESMI-Kohorte im Vergleich. Von jeder Probe wurden 15 µg Gesamtprotein geladen. a: SYPRO® Ruby Protein Blot Staining. Detektion bei 600 nm. Es handelt sich hierbei um eine Ladekontrolle, die auch für kleine Mengen Protein sensitiv ist. Erkennbar sind geringe Unterschiede in der Beladung. Insbesondere die erste der beiden ESMI-Proben weist eine geringere Intensität in der Detektion auf. b: Nach Inkubation mit Anti- α -Spectrin-Antikörper (primär) und Anti-Mouse-Antikörper (sekundär). Detektion bei 800 nm. Für die Brasilien-Proben ist kein unprozessiertes α -Spectrin (full-length = fl, hier markiert mit schwarzem Pfeil) zu erkennen. Es finden sich Spaltprodukte des α -Spectrin (markiert mit weißem Pfeil). c: Nach Inkubation mit anti-Ataxin-3-Antikörper und Anti-Mouse-Antikörper (sekundär). Detektion bei 600 nm. Es ist keine Ataxin-3-spezifische Bande zu erkennen. An einzelnen Stellen erkennt man eine Redetektion des α -Spectrin-Antikörpers (markiert mit schwarzem Pfeil).

Wie in Abbildung 10 zu sehen ist, waren die Messwerte in den aus Brasilien gesendeten Proben dabei generell niedriger als die im Rahmen der unter hochgradig standardisierten Bedingungen gewonnenen (Santana et al., 2023) und sicher transportierten Proben der ESMI-Kohorte. Messwerte im negativen Bereich

wurden für die rechnerischen Analysen und Auswertungen auf null gesetzt, um der Tatsache Rechnung zu tragen, dass im Falle eines negativen Messwerts die spezifische, langlebige Emission, die durch die Anwesenheit des Zielproteins verursacht wird, unter dem Negativ-Hintergrund-Signal liegt. Dadurch kann von der Abwesenheit des Zielproteins ausgegangen werden. Die Menge beträgt hier also null. Insbesondere bei der Antikörperkombination mit 1C2 war das für die Mehrzahl der Proben aus Brasilien der Fall. Hier konnte nur in wenigen Fällen überhaupt ein spezifisches Signal im TR-FRET gemessen werden. Meistens lagen die Messwerte hier im negativen Bereich mit einzelnen im positiven Bereich. Dies galt auch für Proben von Probanden mit milden oder moderaten ataktischen Symptomen, die innerhalb der ESMI-Kohorte generell höhere Messwerte aufwiesen (siehe Abbildung 10). Es ist also davon auszugehen, dass auch Ataxin-3 in den Proben zu einem großen Teil degradiert ist, da es auch in der hochsensitiven TR-FRET-Methode nicht mehr oder nur noch geringfügig nachgewiesen werden konnte.

Tabelle 51 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse zur Ermittlung der Probenqualität. Aufgrund der Zusammenschau wurden die Werte der TR-FRET-Messungen der Brasilienproben für nicht zuverlässig in Hinblick auf die ursprüngliche Fragestellung befunden. Es wurden daher damit keine weiteren statistischen Analysen durchgeführt.

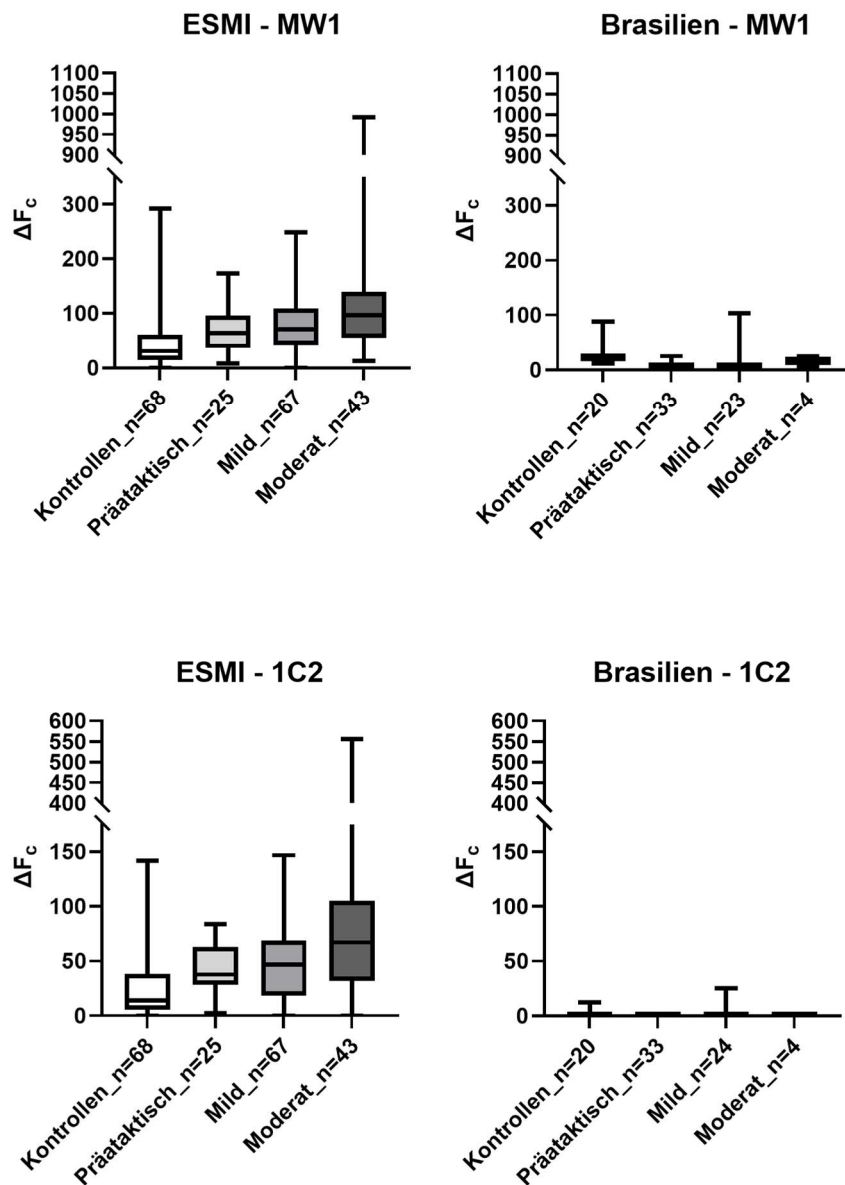


Abbildung 10: TR-FRET-Messwerte der Proben aus der ESMI-Kohorte und aus Brasilien im Vergleich. $\Delta F_c = \Delta F$ (% Signal über Hintergrund), korrigiert nach der Gesamtproteinkonzentration einer Probe, Kontrollen = Probanden ohne expandiertes ATXN3-Gen, präataktisch = Mutationsträger mit SARA < 3, mild = Mutationsträger mit milder ataktischer Symptomatik (SARA 3 - 12,5), moderat = Mutationsträger mit moderater ataktischer Symptomatik (SARA 13 - 24). Da die Brasilien-Kohorte keine Probanden mit schwerer ataktischer Symptomatik (SARA > 24) umfasst, wurden diese auch in der Darstellung der ESMI-Kohorte zum Vergleich entfernt. Da negative Messwerte im TR-FRET als Abwesenheit von Protein zu werten sind, wurden diese für die Darstellung und Analyse auf null gesetzt. Sowohl bei der Antikörperkombination mit MW1 (obere Hälfte) als auch bei der Antikörperkombination mit 1C2 (untere Hälfte) liegen die Messwerte der Proben aus Brasilien deutlich unter denen der ESMI-Kohorte.

Tabelle 51: Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlussfolgerungen zur Bestimmung der Qualität der aus Brasilien gesendeten Proben

Aspekt	Proben der ESMI-Kohorte	Proben aus Brasilien
Transport-/Lagerbedingungen	Standardisierte Lagerung, Transport über einen kurzen Zeitraum auf Trockeneis	Unklare Transportbedingungen, Ankunft „kühl“ (4 - 10 °C) in einer zerstörten Box
α-Spectrin im Western Blot	Sowohl unprozessiertes als auch degradiertes α-Spectrin vorhanden	Ausschließlich degradiertes α-Spectrin vorhanden
TR-FRET-Ergebnisse	Bandbreite der Messwerte, die sich auch über verschiedenen Probenlieferungen immer wieder zeigt	Hoher Anteil an negativen Messergebnissen, insgesamt niedrige Varianz
Schlussfolgerung	Probenqualität akzeptabel und standardisiert; Ergebnisse verwertet	Probenqualität stark eingeschränkt; Ergebnisse nicht verwertet

3.2.3 Etablierung der Fragmentlängenanalyse / Duplex-PCR zur Bestimmung des ATXN3-SNPs Bp 987

Als neue Methode zur Bestimmung des ATXN3-SNPs Bp 987 und damit Alternative zur aufwendigen Sequenzierung nach Sanger (siehe Kapitel 2.2.6) wurde im Rahmen dieser Methode eine Duplex-PCR im Zusammenhang mit einer Fragmentlängenanalyse etabliert. Dabei wird eine PCR mit einem Vorwärts- und zwei verschiedenen Rückwärts-*Primern* durchgeführt. Letztere unterscheiden sich zum einen in einer einzelnen Base, die komplementär zu den jeweiligen Varianten (G beziehungsweise C) des zu bestimmenden SNPs ist. Die beiden *Primer*-Varianten sind jeweils unterschiedlich fluoreszenzmarkiert, sodass sie durch Messung in einem entsprechenden Gerät (hier in einem Sequenzierer) voneinander differenziert werden konnten. Das labortechnische Vorgehen bei dieser Methode ist in Kapitel 2.2.7 ausführlich beschrieben. Der PCR-Ansatz wurde einem bereits zuvor im Labor verwendeten Protokoll entnommen und musste nun

sowohl als zuverlässig bestätigt als auch auf eventuell geänderte Bedingungen angepasst werden.

Zunächst wurde die PCR durchgeführt. Im Reaktionsansatz befand sich neben den Grundbestandteilen der PCR außerdem Formamid zur Verstärkung der Reaktion. Da dieses in seiner Verfügbarkeit im Labor zwischenzeitlich eingeschränkt war, wurde ein zweiter Ansatz in der Etablierung verwendet, in dem Formamid durch SLS-Puffer aus dem *GenomeLab DTCS Quick Start Kit* ersetzt wurde. Dieses besteht laut Angaben des Herstellers zu 90 % aus Formamid und erschien daher der bestmögliche Ersatz.

Das Kontrollgel zu beiden Ansätzen ist in Abbildung 11 zu sehen. Der Ansatz mit Formamid und der, in dem dieses durch SLS ersetzt wurde, ergeben ein vergleichbares Ergebnis, sodass diese als gleichwertig angesehen wurden. Da sich das Problem der Formamid-Verfügbarkeit allerdings bis zur Durchführung der Analysen gelöst hatte, wurde letztlich nur dieses für alle Probenanalysen verwendet.

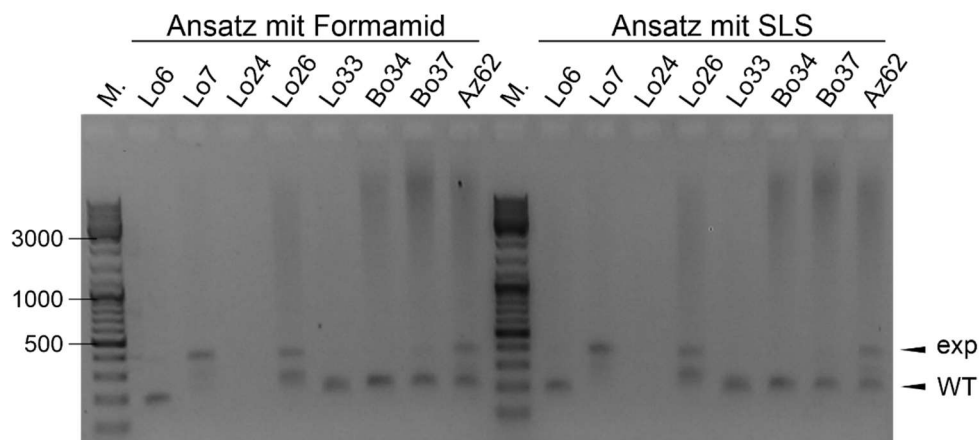


Abbildung 11: Kontrollagarosegel zur Etablierung der Fragmentlängenanalyse / Duplex-PCR zur Bestimmung des ATXN3-SNPS Bp 987. Angaben der Größe der Markerbanden in Basenpaaren (bp). M. = Marker, LoXX / BoXX / AzXX = Anonymisierte Kürzel zur Probenidentifizierung, exp = expandiertes Allel, WT = Wildtyp-Allel. Die Ansätze mit Formamid und mit SLS hatten vergleichbare Ergebnisse gebracht. Es waren deutliche Banden auf Höhe der expandierten Allele für die Proben Lo7, Lo26, Az62 sowie schwache für Lo6 und Bo37. Deutliche Banden eines oder zweier Wildtyp-Allele waren für die Proben Lo6, Lo26, Lo33, Bo34, Bo37 und Az62 zu erkennen. Eine schwache WT-Bande war für die Probe Lo7 zu erkennen. Im Fall der Probe Lo24 war kein PCR-Produkt zu sehen.

Im Anschluss an das Kontrollgel wurde dieses verworfen und das PCR-Produkt im Sequenzierer analysiert. Hierbei wurden die Proben sowohl 1:20 eingesetzt

als auch, aufgrund der geringen Ausprägung einzelner Banden im Agarosegel, unverdünnt. Die Auswertung geschah mit Hilfe der *GenomeLab GeXP* Software (Abbildung 12).

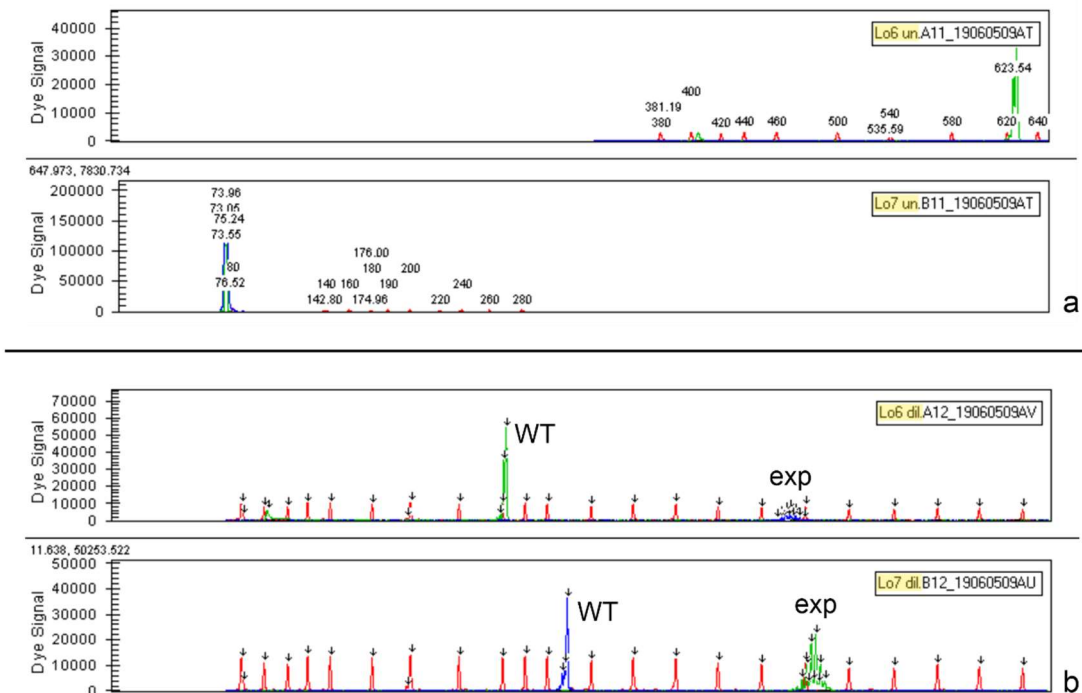


Abbildung 12: Darstellung der Auswertung der Fragmentlängenanalyse / Duplex-PCR in der Analysesoftware des Sequenzierers. Gezeigt sind die Proben Lo6 und Lo7. un = undiluted (unverdünnt), dil = diluted (verdünnt), WT = Wildtyp-Allel, exp = expandiertes Allel. a: Das PCR-Produkt wurde unverdünnt für die Analyse im Sequenzierer eingesetzt. Aufgrund des überhöhten Fluoreszenzsignals konnte keine Auswertung erfolgen. b: Das gleiche PCR-Produkt wurde im Rahmen der gleichen Messreihe zusätzlich 1:20 verdünnt eingesetzt und analysiert. Die roten Peaks stellen den mitlaufenden internen Längenstandard dar. Es zeigt sich jeweils ein blauer oder grüner Peak pro Allel. Die CAG-Wiederholungen wurden für alle Proben bereits zuvor in der Fragmentlängenanalyse (siehe Kapitel 2.2.5) bestimmt, sodass bereits vor der Analyse klar war, ob zwei Wildtyp-Allele (Kontrollproben) oder ein Wildtyp und ein expandiertes Allel (Mutationsträger) erwartet wurden. Ähnlich wie bei der Analyse der Fragmentlängenanalyse zur Bestimmung der CAG-Repeats (siehe Abbildung 3) war die Replikation des expandierten Allels anfällig für Fehler, sodass mehrere kleine Peaks nebeneinander entstanden. Ein grüner Peak steht hierbei für die IRD700-Fluoreszenz und damit die Base G an der Stelle des SNP Bp 987, ein blauer Peak für die Cy5-Fluoreszenz und damit die Base C.

Die Basenzuordnung der SNPs bei Bp 987 ergab sich nun durch die unterschiedlichen Fluoreszenzen an den beiden Primern, welche die Software des Sequenzierers in zwei verschiedenen Farben darstellte. Ein grüner *Peak* repräsentierte die IRD700-Fluoreszenz und stand damit für die Base G, ein blauer *Peak* die Cy5-Fluoreszenz, was die Base C bedeutete.

Da das Ergebnis mit der verdünnten Probe eine Darstellung in der Analyse lieferte, bei der das Fluoreszenz-Signal besser mit dem Längenstandard zu

vergleichen war (siehe Abbildung 12), womit auch die *Peaks* besser zu erkennen beziehungsweise zu differenzieren und einem Allel zuzuordnen waren, wurde für die finalen Analysen die 1:20-Verdünnung gewählt.

Ein interessanter Punkt ergab sich außerdem beim Vergleich der beobachteten Ergebnisse im Kontrollgel (Abbildung 11) mit den Analysen der Bestimmung der Anzahl der CAG-Wiederholungen. Da zur Etablierung Proben verwendet wurden, deren SNP-Ausprägung zuvor mit Hilfe der Sequenzierung nach Sanger bestimmt wurde und bei denen auch der Mutationsstatus in Hinblick auf die SCA3 bekannt war, konnte im Vergleich des Kontrollgels mit den zu erwartenden Banden festgestellt werden, dass Lo6 eine hier nur mit viel Mühe zu erkennende Bande für ein expandiertes Allel haben sollte. Gleiches galt für die Wildtyp-Bande für die Probe Lo7. Wenn man hier die bereits bekannten SNPs daneben legte, so stellte man fest, dass alle nur gering oder gar nicht ausgeprägten Banden die Base C an der zu analysierenden Stelle aufwiesen. Es wurde daher von einem Problem mit dem entsprechenden *Primer* ausgegangen, der bereits länger gelagert wurde. Dieser wurde neu bestellt. Die geringe Ausprägung im Kontrollgel zeigte sich auch in etwas geringer ausgeprägten, aber noch deutlich erkenn- und differenzierbaren *Peaks* in der Fluoreszenzanalyse durch den Sequenzierer (siehe auch Abbildung 12). Im Rahmen der weiteren Analysen der noch unbekannteren Proben wurde dann der neu bestellte Primer verwendet, womit sich sowohl in der Bandenausprägung im Kontrollgel als auch in der *Peak*höhe im Sequenzierer die Unterschiede zwischen den beiden Basen aufhoben (nicht gezeigt).

3.2.4 Betrachtung möglicher Einflussfaktoren auf die ATXN3-Messwerte im TR-FRET

Um einen zuverlässigen Biomarker zu etablieren, sollten sämtliche Parameter, die außerhalb des gewünschten Zusammenhangs auf diesen Einfluss haben, so gut wie möglich identifiziert und möglicherweise eliminiert werden. Die Probanden der ESMI-Kohorte wurden daher für verschiedene Analysen nach unterschiedlichen Gesichtspunkten eingeteilt und statistische Untersuchungen mit den jeweiligen gemessenen Werten für ATXN3 im TR-FRET durchgeführt, um deren

möglichen Einfluss zu bestimmen. Dabei wurden, sofern nicht anders erwähnt, jeweils die gleichen Messwerte für alle Analysen verwendet und nur die Zusammenstellungen je nach Analysefaktor angepasst.

Da das Ziel dieser Arbeit war, die ATXN3-Messwerte als Biomarker für die Krankheitsschwere zu etablieren, wurden die Gruppen in den folgenden statistischen Untersuchungen nicht nur nach dem zu untersuchenden Parameter gebildet, sondern auch jeweils in Kontrollen, präataktische (SARA-Score < 3) und ataktische (SARA-Score \geq 3) Mutationsträger eingeteilt. Außerdem wurde die ataktische Gruppe zusätzlich, wenn genug Proben dieser Gruppe zur Verfügung standen, noch weiter nach Symptomschwere eingeteilt (Einteilung anhand des SARA-Scores: milde ataktische Symptomatik entspricht einem SARA-Score von 3 bis 12,5, moderate ataktische Symptomatik einem SARA-Score von 13 bis 24 und schwere ataktische Symptomatik einem SARA-Score von mehr als 24). Dies war insbesondere wichtig, da es aufgrund des Aufbaus der ESMI-Kohorte und der Tatsache, dass es sich hier um eine seltene Erkrankung handelt, nicht möglich war, die jeweiligen Gruppen in Hinblick auf sämtliche Parameter zu matchen oder gleich groß zu gestalten. Außerdem waren nicht alle Informationen von allen Probanden bekannt, sodass für jede Analyse nur ein Ausschnitt der Kohorte zur Verfügung stand. Die jeweilige Gruppengröße ist daher ebenfalls immer im Rahmen jeder Analyse angegeben.

Untersucht wurden die folgenden Einflussfaktoren: Das Geschlecht, ob ein Proband nüchtern (mindestens 8 Stunden ohne Nahrungsaufnahme) zur Entnahme kam oder nicht, ob die labortechnische Untersuchung vormittags oder nachmittags durchgeführt wurde, ob es einen Unterschied zwischen den von mir pipettierten und den von anderen Doktorand*innen bearbeiteten Proben gab, sowie ein Einfluss der Lagerungszeit zwischen Abnahme und Weiterverarbeitung der Proben.

3.2.4.1 Einfluss durch das biologische Geschlecht

Eine der wichtigsten auszuschließenden Einflussfaktoren für jeden Biomarker (beziehungsweise, sollte es einen Einfluss geben, die Bestimmung, wie groß dieser ist) ist das biologische Geschlecht. Zur Analyse dieses Einflusses wurden die

Messdaten der Probanden der ESMI-Kohorte zusätzlich zur Einteilung in Kontrollen, präataktische und ataktische Mutationsträger, letztere noch gruppiert nach Schwere der Symptomatik, nach dem Geschlecht in männliche und weibliche Probanden unterteilt. Dies geschah sowohl für die Messungen mit der Antikörperkombination mit dem PolyQ-Antikörper MW1, die sowohl Wildtyp- als auch expandiertes Ataxin-3 darstellt, letzteres allerdings bevorzugt, und mit der Antikörperkombination mit dem PolyQ-Antikörper 1C2, die ausschließlich expandiertes Ataxin-3 misst, wie in Kapitel 2.2.14 erläutert. Das Ergebnis dieser Auswertung ist in Abbildung 13 zu sehen.

Dabei war bei der Antikörperkombination mit MW1 kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern zu erkennen, unabhängig davon, welche Gruppe betrachtet wird. Für die Antikörperkombination mit 1C2 war dagegen ein signifikanter ($p = 0,0015$) Unterschied zwischen den Ataxin-3-Messwerten bei männlichen und weiblichen Kontrollprobanden zu beobachten. Für die restlichen Gruppen gab es allerdings auch hier keine statistisch signifikante Differenz. Für die Analysen wurden jeweils die männlichen und weiblichen Probanden der gleichen Gruppierung mit dem Mann-Whitney-Test statistisch verglichen.

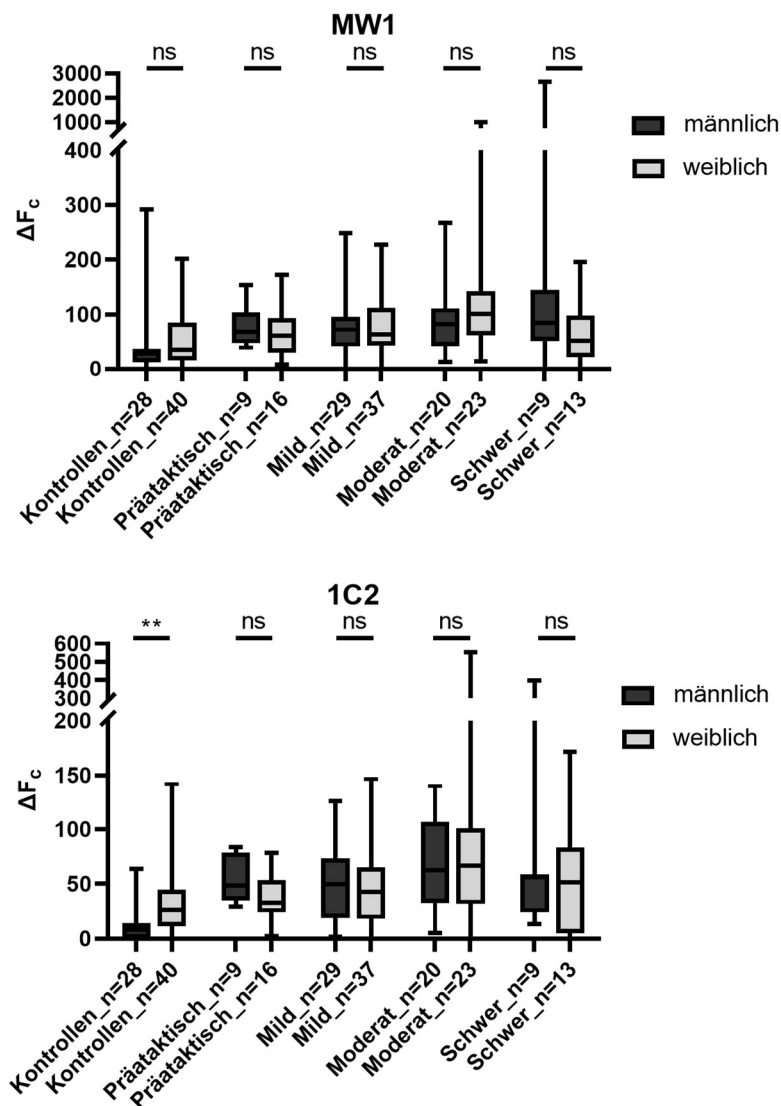


Abbildung 13: Einfluss des biologischen Geschlechts auf den im TR-FRET gemessenen ATXN3-Wert. $\Delta F_c = \Delta F$ (% Signal über Hintergrund), korrigiert nach der Gesamtproteinkonzentration einer Probe, Kontrollen = Probanden ohne expandiertes ATXN3-Gen, präataktisch = Mutationsträger mit SARA < 3, mild = Mutationsträger mit milder ataktischer Symptomatik (SARA 3 - 12,5), moderat = Mutationsträger mit moderater ataktischer Symptomatik (SARA 13 - 24), schwer = Mutationsträger mit schwerer ataktischer Symptomatik (SARA > 24), ns= nicht-signifikant, ** = signifikant mit $p < 0,01$. Der linke von zwei gruppierten Balken stellt jeweils die männlichen Probanden dar, der rechte die weiblichen. Für die Antikörperkombination mit MW1 (obere Abbildung) konnte in den jeweiligen Gruppen kein Unterschied zwischen den Geschlechtern festgestellt werden. Für die Antikörperkombination mit 1C2 (untere Abbildung) galt dies ebenfalls, mit Ausnahme der Kontrollgruppe. Hier wurde bei den weiblichen Probanden ein mit einem P-Wert von 0,0015 signifikant höherer ATXN3-Messwert festgestellt. Signifikanz-Prüfung mit dem Mann-Whitney-Test für nicht-normalverteilte Kohorten.

3.2.4.2 Einfluss durch eine vorherige Nahrungsaufnahme

Neben dem biologischen Geschlecht ist ein weiterer oft beobachteter Einflussfaktor auf Biomarker eine vor der Blutabnahme erfolgte Nahrungsaufnahme. Daher wurde im Zusammenhang mit der Abnahme der Probenröhrchen auch erfragt, wann die letzte Mahlzeit stattgefunden hatte. Dabei wurde ein Proband als nüchtern betrachtet, wenn seine letzte Nahrungsaufnahme mindestens 8 Stunden her war. Alles darunter wurde als nicht-nüchtern eingeordnet. Da diese Information nicht von allen Probanden vorlag und nur diese in die Analyse einfließen, bei denen sie bekannt war, variiert die Anzahl der eingeschlossenen Probanden im Vergleich zu anderen Untersuchungen.

Auch hier wurden die Probanden zunächst in Kontrollgruppe, präataktische und ataktische Mutationsträger (letztere eingeteilt nach Symptomschwere) gruppiert und im Anschluss innerhalb jeder Gruppe die Unterscheidung zwischen nüchternen und nicht-nüchternen Probanden getroffen. Das Ergebnis dieser Auswertung ist in Abbildung 14 graphisch dargestellt. Auch hier wurden sowohl die Antikörperkombination mit MW1 als auch die mit 1C2 untersucht.

Die statistischen Analysen wurden mit dem Mann-Whitney-Test jeweils als Vergleich der nüchternen und nicht-nüchternen Probanden jeder Gruppe durchgeführt. Es zeigte sich für die Antikörperkombination mit MW1 ein geringgradig signifikant ($p = 0,0109$) höherer Ataxin-3-Messwert für die nicht-nüchternen Probanden der Gruppe der Mutationsträger mit moderater Symptomatik im Vergleich zu den nüchternen Probanden der gleichen Gruppe. Für die restlichen mit der Antikörperkombination mit MW1 gemessenen Gruppen bestätigte sich dieser Unterschied in den statistischen Analysen nicht. Für die Antikörperkombination mit 1C2 bestand weder in der Gruppe der Mutationsträger mit moderater Symptomatik noch in den anderen ein signifikanter Unterschied zwischen Probanden, die vor der Blutabnahme gegessen hatten und solchen, die nüchtern geblieben waren.

3.2.4.3 Einfluss durch die Tageszeit, zu der die Messung stattfand

Da es sich bei der TR-FRET-Methodik, dargestellt und erläutert in Kapitel 2.2.14, um ein hochoempfindliches Verfahren unter Verwendung von Fluorophoren und Fluoreszenzmessungen handelt, war eine weitere Frage, ob die Tageszeit, zu der die Proben pipettiert beziehungsweise, 24 Stunden später, gemessen wurden, einen Einfluss auf die Ergebnisse haben könnte. Wie bereits in der Einführung zum Ergebnisteil (Kapitel 3.1) dargestellt, wurden die Messwerte von verschiedenen Doktorand*innen im Verlauf der Zeit erhoben. Die Information, zu welcher Tageszeit dies jeweils geschehen war, lagen beim Verfassen dieser Arbeit nur von den von mir persönlich bearbeiteten Proben vor, sodass diese Analyse sich auf wenige Proben und damit auch Messreihen beschränkt. Die Aussagekraft ist dementsprechend niedrig.

Als vormittags wurde für die folgende Analyse eine Durchführung zwischen 7:00 und 12:00 Uhr bezeichnet, als nachmittags eine Analyse zwischen 12:00 und 18:00. Bei dieser Analyse wurden, wie auch in den vorangegangenen Analysen, die bereits zuvor erhobenen Messwerte für ATXN3 im TR-FRET verwendet. Die Probanden wurden unterteilt in die Kontrollgruppe, Mutationsträger mit und ohne ataktische Symptome, wobei letztere aufgrund der geringen Probenanzahl unabhängig von der Symptomschwere zusammengefasst wurden, und dann jeweils nach vor- und nachmittags stattgefundenen Messungen getrennt. Betrachtet wurden hierbei lediglich die Messwerte aus der Antikörperkombination mit MW1, da sämtliche von mir durchgeführten Messungen mit der Antikörperkombination mit 1C2 nachmittags stattgefunden hatten. Hier war daher kein Vergleich möglich. Das Ergebnis der Analyse ist in Abbildung 15 dargestellt.

Es zeigte sich innerhalb der Kontrollgruppierung ein geringfügig signifikanter ($p = 0,0186$) Unterschied zwischen den vormittags und nachmittags gemessenen Werten. Für die präataktischen und die ataktischen Mutationsträger konnte dieser Unterschied nicht festgestellt werden. Insbesondere für die Gruppe der präataktischen Probanden war die Zahl der analysierten Proben mit 5 und 2 respektive allerdings sehr gering, sodass hier keine zuverlässige Aussage getroffen werden konnte. Für die Analysen wurde der Mann-Whitney-Test für nicht-normalverteilte Kohorten verwendet.

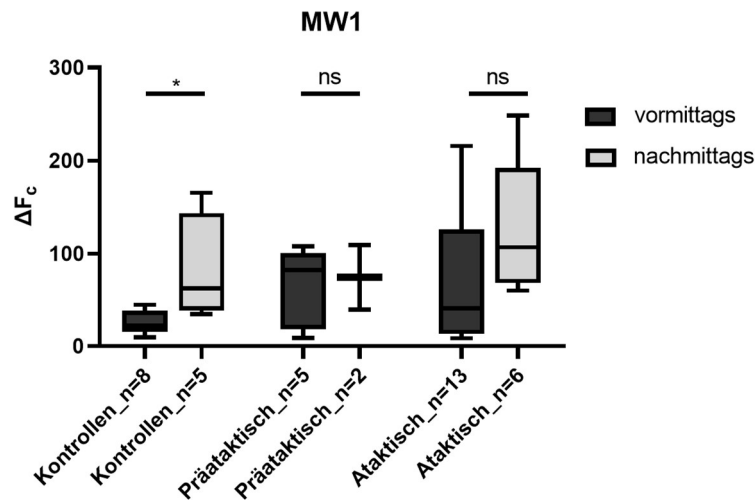


Abbildung 15: Einfluss der Tageszeit, zu der die Messung stattfand, auf den im TR-FRET gemessenen ATXN3-Wert. $\Delta F_c = \Delta F$ (% Signal über Hintergrund), korrigiert nach der Gesamtproteinkonzentration einer Probe, Kontrollen = Probanden ohne expandiertes ATXN3-Gen, präataktisch = Mutationsträger mit SARA < 3, ataktisch = Mutationsträger mit ataktischer Symptomatik (SARA \geq 3), ns= nicht-signifikant, * = signifikant mit $p < 0,05$, vormittags = Messung fand in einem Zeitraum zwischen 7:00 und 12:00 statt, nachmittags = Messung fand in einem Zeitraum zwischen 12:00 und 18:00 statt. Der linke von zwei gruppierten Balken zeigt jeweils die vormittags erhobenen Messwerte und der rechte die nachmittags erhobenen. Innerhalb der Kontrollgruppe waren die nachmittags gemessenen Werte signifikant höher im Vergleich zu den vormittags gemessenen. Dieser Unterschied konnte innerhalb der anderen beiden Gruppierungen nicht nachgewiesen werden. Hier wurden keine signifikanten Differenzen festgestellt. Signifikanz-Prüfung mit dem Mann-Whitney-Test für nicht-normalverteilte Kohorten.

3.2.4.4 Einfluss durch die Person, die die Untersuchung durchführte

Die in dieser Doktorarbeit dargestellten und analysierten Messwerte wurden, wie zuvor in Kapitel 3.1 und auch in Kapitel 0 erläutert, von verschiedenen Doktorand*innen über einen längeren Zeitraum hinweg erhoben. Da es sich bei der Messung mittels TR-FRET um eine hochsensitive Methode handelt, die leicht durch falsche Ausführung oder mangelnde Präzision beeinflusst werden kann, war eine Fragestellung im Rahmen der Etablierung, ob der / die Untersucher*in einen Einfluss auf die Messergebnisse hat.

Dafür wurden die zuvor erhobenen Messwerte zunächst erneut in die Gruppe der Kontrollen, der präataktischen und der ataktischen Probanden eingeteilt, wobei in letzterer alle Probanden mit einem SARA-Score > 3 unabhängig von der Schwere der ataktischen Symptomatik zusammengefasst waren, um eine für

Analysen ausreichend große Kohorte zu generieren. Diese Gruppierungen wurden weiterhin unterteilt nach Untersucher*in, wobei jeweils drei Untergruppen entstanden: In der ersten sind die von den Untersuchenden A + B bearbeiteten Proben zusammengefasst, da diese beiden Personen parallel an diesem Projekt gearbeitet hatten. Die zweite (C) und dritte (D) Gruppierung umfasst jeweils die durch zwei verschiedene weitere Personen erhobenen Messergebnisse.

Es wurden jeweils zwei verschiedene Arten von Analysen durchgeführt: Zum einen wurde untersucht, ob innerhalb der jeweiligen Gruppierungen signifikante Unterschiede zwischen den Untersucher*innen bestanden. Zum anderen wurde statistisch analysiert, ob, bei gleichem / gleicher Untersucher*in ein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe, präataktischen und ataktischen Mutationsträgern bestand. Dies wurde jeweils für die Messwerte der Antikörperkombination mit MW1 und mit 1C2 durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 dargestellt. Dabei zeigten sich teils deutliche Unterschiede. Für die Antikörperkombination mit MW1 konnte eine signifikante ($p = 0,0289$) Differenz abhängig von dem / der Untersucher*in in der Kontrollgruppe festgestellt werden. Dieser Unterschied war bei der Antikörperkombination mit 1C2 sogar hochsignifikant ($p < 0,0001$). Innerhalb der anderen Gruppen konnten bei der Antikörperkombination mit MW1 keine weiteren signifikanten Differenzen festgestellt werden, wohl aber bei der Antikörperkombination mit 1C2. Hier zeigte sich mit $p = 0,0173$ ein ebenfalls signifikanter Unterschied in der Gruppe der ataktischen Mutationsträger.

Sowohl für die Antikörperkombination mit MW1 als auch mit 1C2 konnte in den statistischen Analysen außerdem folgende Beobachtung gemacht werden: Für die Untersuchergruppe A + B zeigte sich ein hochsignifikanter (p jeweils $< 0,0001$) Unterschied zwischen Kontrollen, präataktischen und ataktischen Mutationsträgern. Dieser Unterschied war nicht signifikant, wenn man isoliert die von Person C oder Person D bearbeiteten beziehungsweise untersuchten Proben betrachtete. Auf die Differenzen zwischen den verschiedenen Gruppierungen wird allerdings auch in Kapitel 3.5 (hier kommt noch der Querverweis auf das Kapitel, dass sich mit den ATXN-Werten im Verhältnis zum SARA beschäftigt) noch einmal genauer eingegangen.

Für die Untersuchungen wurde jeweils der Kruskal-Wallis-Test für den Vergleich von mehr als zwei nicht-normalverteilten Kohorten verwendet.

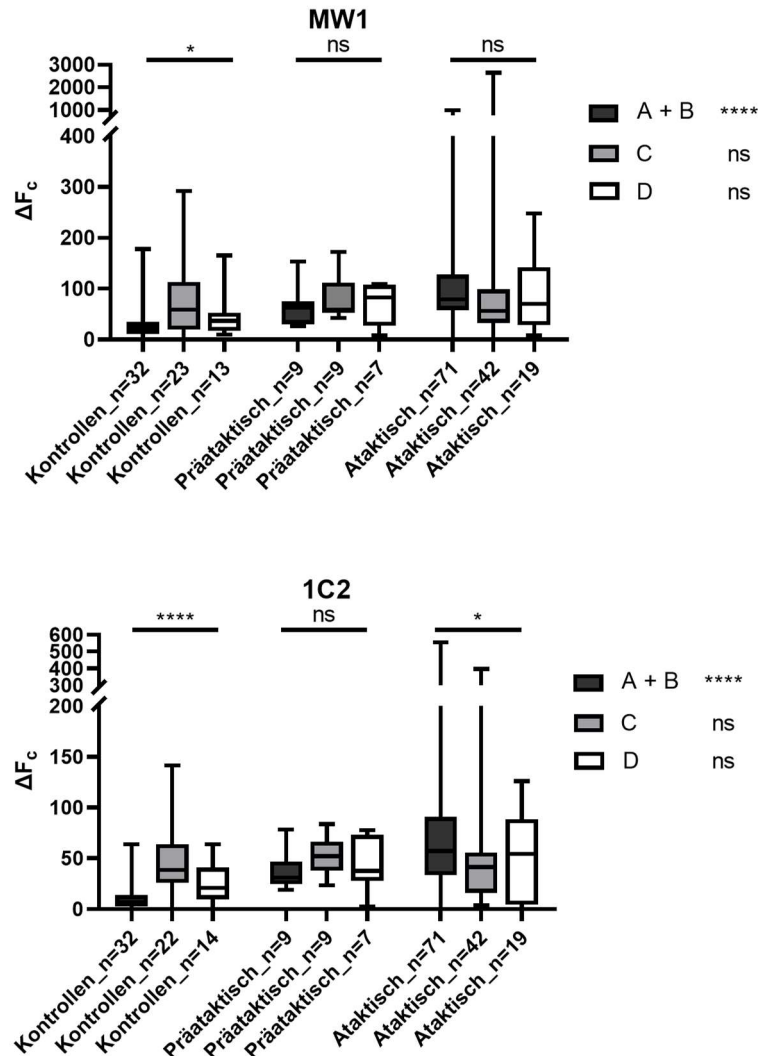


Abbildung 16: Einfluss der Person, die die Probe bearbeitet und die Messung durchgeführt hat, auf den im TR-FRET gemessenen ATXN3-Wert. $\Delta F_c = \Delta F$ (% Signal über Hintergrund), korrigiert nach der Gesamtproteinkonzentration einer Probe, Kontrollen = Probanden ohne expandiertes ATXN3-Gen, präataktisch = Mutationsträger mit SARA < 3, ataktisch = Mutationsträger mit ataktischer Symptomatik (SARA \geq 3), ns= nicht-signifikant, * = signifikant mit $p < 0,05$, **** = signifikant mit $p < 0,0001$. A + B, C und D stehen für verschiedene Untersucher*innen. Neben der Legende ist das Signifikanzniveau für den Vergleich zwischen Kontrollen, präataktischen und ataktischen Mutationsträgern für die jeweils untersuchende Person aufgeführt. Es zeigte sich innerhalb der Kontrollgruppe für die Antikörperkombination mit MW1 (obere Abbildung) ein signifikanter Unterschied abhängig vom Untersuchenden. Innerhalb der anderen beiden Gruppierungen gibt es hier keine signifikanten Unterschiede. Für die Antikörperkombination mit 1C2 (untere Abbildung) konnte ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Untersucher*innen innerhalb der Kontrollgruppe festgestellt werden, sowie ein geringer signifikanter Unterschied innerhalb der Gruppe der ataktischen Mutationsträger. Außerdem zeigte sich sowohl für die Antikörperkombination mit MW1 als auch mit 1C2 für die Untersuchenden A + B ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den jeweiligen Gruppen, der für die Untersuchenden C und D nicht bestätigt werden konnte. Signifikanz-Prüfung mit dem Kruskal-Wallis-Test für mehr als zwei nicht-normalverteilte Kohorten.

3.2.4.5 Einfluss durch Lagerungszeit der Probe

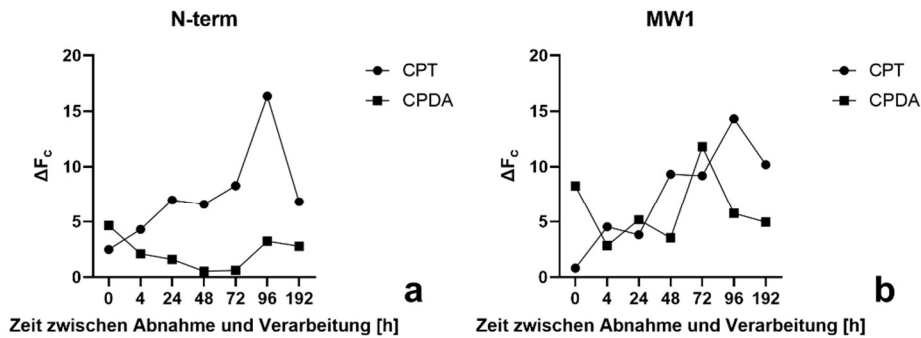
Ein weiterer Einflussfaktor auf die Qualität von Proben und damit die Zuverlässigkeit der erhobenen Messwerte stellt stets im Rahmen der Präanalytik die Lagerung dar. Deswegen wurde im Rahmen dieser Arbeit, wie bereits in Kapitel 2.2.11 dargestellt, eine Messreihe gestartet, bei der die Proben nach der Abnahme zunächst gelagert und dann in festgesetzten Abständen weiterverarbeitet wurden.

Es wurden hierbei insgesamt zwei verschiedene Messreihen untersucht: Zum einen Proben, die wie in Kapitel 2.2.11 erläutert mit *CPT-Tubes* der Firma BD gewonnen wurden. Dieses System wurde auch für die Gewinnung der in dieser Arbeit verwendeten Proben eingesetzt. Zusätzlich wurde eine bereits zuvor gewonnene Messreihe mit CPDA-Röhrchen der Firma Sarstedt gemessen und ausgewertet.

Untersucht wurden die Proben sowohl mit der Antikörperkombination mit MW1 als auch mit der in Kapitel 2.2.14 erläuterten Antikörperkombination mit N-term, die das gesamte Ataxin-3 darstellt. Diese beiden Kombinationen wurden gewählt, da die Proben nicht von einem SCA3-Patienten stammen, sondern von einem gesunden Freiwilligen, der kein expandiertes Ataxin-3 exprimiert.

Insgesamt stellten sich in diesen Untersuchungen generell niedrige Messwerte für Ataxin-3 im TR-FRET im Vergleich zu manchen Messreihen mit Probanden der ESMI-Kohorte dar. Für die Antikörperkombination mit N-term zeigte sich eine entgegengesetzte Dynamik zwischen *CPT-Tubes* und CPDA-Röhrchen, da der Messwert für die *CPT-Tubes* im Laufe der Zeit eher zunahm und der für die CPDA-Röhrchen eher abnehmende Messergebnisse aufwies. Die Dynamik innerhalb der *CPT-Tubes* ließ sich ähnlich auch für die Antikörperkombination mit MW1 darstellen. Auch hier nahmen die Messwerte bei längerer Lagerung eher zu. Für die CPDA-Röhrchen konnte hier keine definierte Richtung nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse wurden teilweise bereits im Rahmen der Veröffentlichung „PolyQ-expanded ataxin-3 protein levels in peripheral blood mononuclear cells correlate with clinical parameters in SCA3: a pilot study“ (Gonsior et al., 2021) veröffentlicht.



Die Datenpunkte 0 bis 72h aus Abbildungsteil a wurden im Rahmen der Publikation Gonsior et. al, 2021 verwendet.

Abbildung 17: Einfluss der Lagerungszeit der Proben zwischen deren Abnahme und Verarbeitung auf den im TR-FRET gemessenen ATXN3-Wert. $\Delta F_c = \Delta F$ (% Signal über Hintergrund), korrigiert nach der Gesamteinkonzentration einer Probe. Dargestellt ist jeweils eine Messreihe aus CPT-Tubes der Firma BD und aus CPDA-Röhrchen der Firma Sarstedt. Die zeitliche Dynamik der Messwerte für die Antikörperkombination mit N-term zeigte sich entgegengesetzt für die CPT-Tubes und die CPDA-Röhrchen. Für die Antikörperkombination mit MW1 zeigte sich für die CPT-Tubes eine vergleichbare Entwicklung der Messwerte über die Zeit wie für die Antikörperkombination mit N-term. Für die CPDA-Röhrchen konnte hier keine eindeutige Entwicklung beobachtet werden.

Tabelle 52: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse des Kapitels Einflussfaktoren auf die ATXN3-Messwerte

Untersucher Einflussfaktor	Einfluss
Biologisches Geschlecht	Nicht signifikant Ausnahme: signifikanter Unterschied bei Kontrollprobanden gemessen mittels 1C2
Vorherige Nahrungsaufnahme	Nicht signifikant Ausnahme: signifikanter Unterschied bei Mutationsträgern mit moderater ataktischer Symptomatik, gemessen mittels MW1
Tageszeit der Messung	Nicht signifikant Ausnahme: Kontrollprobanden (Es wurde nur MW1 analysiert)
Person, die die Messung durchführt	Signifikante Unterschiede

Untersuchter Einflussfaktor	Einfluss
Lagerungszeit der Probe	N-Term: zunehmende Dynamik für CPT- <i>Tubes</i> , abnehmend für CPDA MW1: ähnliche Dynamik für CPT und CPDA

3.3 Kohortenbeschreibung

3.3.1 Beschreibung und Zusammensetzung der ESMI-Kohorte

In dieser Arbeit werden Proben von insgesamt 307 Probanden der ESMI-Kohorte betrachtet, die in verschiedenen Zentren innerhalb von Europa gesammelt wurden. Nicht von allen Probanden standen jeweils alle Biomaterialien zur Verfügung. Teilweise wurden auch nicht alle klinischen oder anamnestischen Daten durch die jeweiligen Zentren übermittelt. Zusätzlich sind einzelne Analysen fehlgeschlagen, auch in Wiederholungsmessungen, oder es lag nicht mehr ausreichend Material für eine weitere Wiederholung vor. Als Summe dieser Faktoren kommt es zwischen verschiedenen Analysen zu einer Veränderung der Kohortengröße. Diesem Umstand ist in den folgenden Abbildungen und Beschreibungen jeweils durch die Angabe der jeweils einbezogenen Studienteilnehmer (n) sowie, wenn vorhanden, Ausschlusskriterien Rechnung getragen. Die Proben eines Probanden wurde von vorneherein aus den Analysen ausgeschlossen, da der Studienteilnehmer zwar Symptome passend zu einer SCA3 ($SARA \geq 3$) zeigte, in der DNA-Analyse aber kein expandiertes *ATXN3*-Allel vorhanden war. Es ist daher zu vermuten, dass ein anderer Grund für die ataktischen Symptome vorlag, der nicht im Zusammenhang mit SCA3 steht. Eine mögliche Erklärung wäre zum Beispiel das Vorliegen einer anderen PolyQ-Erkrankung. Um eine potenzielle Verzerrung der Ergebnisse zu vermeiden, wurden Proben dieser Person nicht in weitere Analysen mit einbezogen.

Es wurden Proben von insgesamt 144 Männern und 161 Frauen untersucht und ausgewertet, dabei war das Geschlecht eines Probanden nicht bekannt (siehe Abbildung 18). Diese wurden in sechs verschiedenen europäischen SCA3-

Zentren gewonnen: In Tübingen, London, Bonn, Nijmegen, Coimbra und auf den Azoren. Im Mittelwert waren die Probanden in dieser Kohorte zum Zeitpunkt der Rekrutierung für die Kohorte (und damit zum Zeitpunkt der Probenentnahme) 48 Jahre (gerundet auf ganze Zahlen) alt. Diese sowie sämtliche folgende Kenndaten der Kohorte sind in Tabelle 53 noch einmal übersichtlich dargestellt.

Für die Analysen wurden die Studienteilnehmer im Wesentlichen in drei Gruppen unterteilt, abhängig vom SCA3-Status: 77 davon waren Kontrollen. Diese waren definiert als Probanden, die kein expandiertes *ATXN3*-Allel aufwiesen. 39 wurden der Gruppe der präataktischen Mutationsträger zugeordnet. Bei diesen konnte ein expandiertes *ATXN3*-Allel nachgewiesen werden, bisher waren diese aber ohne ataktische Symptome. Letzteres wurde definiert durch einen SARA-Score kleiner 3. 190 waren ataktische Mutationsträger. Auch bei diesen konnte ein expandiertes *ATXN3*-Allel nachgewiesen werden; außerdem waren diese ataktisch. Dies zeigte sich in einem SARA-Score von mindestens 3.

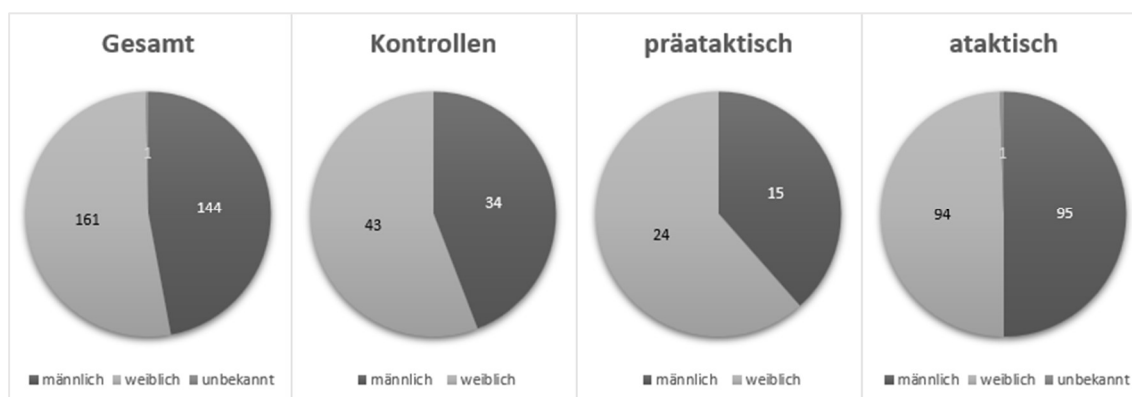


Abbildung 18: Geschlechterverteilung innerhalb der ESMI-Kohorte. präataktisch = präataktische Mutationsträger (SARA < 3), ataktisch = ataktische Mutationsträger (SARA ≥ 3). Von einem Probanden der Gruppe der ataktischen Mutationsträger war das Geschlecht unbekannt. Insgesamt ist die Geschlechterverteilung in allen Untergruppen ähnlich.

2 der Probanden aus der Gruppe der ataktischen Mutationsträger waren außerdem homozygot. Diese wurden in Analysen gegebenenfalls gesondert betrachtet. Von einem dieser beiden lag keine PBMC-Probe vor, weswegen hierbei keine Proteinuntersuchungen möglich waren.

Die Personen der Kontrollgruppe waren im Median 44 Jahre alt. Zwischen den präataktischen und den ataktischen Mutationsträgern bestand ein signifikanter (p

< 0,0001 im Mann-Whitney-Test) Altersunterschied: Die präataktische Gruppe war im Median 34 Jahre alt, die ataktische hingegen 52 Jahre. Diese Differenz entsteht durch den üblichen Erkrankungsbeginn der SCA3, der sehr variabel ist und neben dem Subtyp (Riess et al., 2008) auch von zahlreichen anderen Einflüssen bestimmt wird (de Mattos et al., 2019), aber im Durchschnitt um die 40 Jahre liegt (Bettencourt & Lima, 2011; Mendonça et al., 2018). Auch diese Daten sind in Tabelle 53 noch einmal zusammengefasst.

Neben den demographischen Größen wurden auch SCA3-spezifische Parameter unter den Gruppen verglichen. Hierzu gehört die Anzahl der *CAG-Repeats* im *ATXN3*-Gen, der SARA- und der INAS-Score, das Alter zum Zeitpunkt des Symptombeginns (*Age At Onset* = AAO) und die Erkrankungsdauer (*Disease Duration* = DD, definiert als Jahre, die zwischen Symptombeginn und Probenentnahme vergangen sind). Die Ergebnisse sind in Tabelle 53 dargestellt.

Die Probanden der Kontrollgruppe wiesen im Median 23 *CAG-Repeats* im *ATXN3*-Gen auf. In der Gruppe der präataktischen Mutationsträger betrug der Median ebenfalls 23 *CAG-Repeats* auf dem nicht-expandierten Allel und 69 *CAG-Repeats* auf dem expandierten Allel. Für die Kontrollgruppe und die präataktischen Mutationsträger waren sämtliche Genotypen bekannt. Unter den ataktischen Mutationsträgern lag für 2 Probanden keine DNA-Probe vor. Das nicht-expandierte Allel zeigte ebenfalls im Median 23 *CAG-Repeats* und das expandierte 69 *CAG-Repeats*. Hier zeigten sich zwischen den Gruppen daher keine signifikanten (Kruskal-Wallis-Test mit $p > 0,95$) Unterschiede (siehe auch Tabelle 53).

Der SARA-Score, der Werte von 0 bis 40 annehmen kann, zeigt die Schwere der ataktischen Symptomatik an und war im Median zwischen den beiden nicht von ataktischen Symptomen betroffenen Gruppen – den Kontrollprobanden und den präataktischen Mutationsträgern – mit 0,0 und 1,0 respektive (jeweils gerundet auf eine Nachkommastelle) vergleichbar. Interessanterweise bestand hier dennoch ein signifikanter Unterschied ($p = 0,0002$ im Mann-Whitney-Test) zwischen den beiden Gruppen. In der Gruppe der ataktischen Mutationsträger lag der SARA-Score mit 12,8 im Median signifikant sowohl über dem der Kontrollen ($p < 0,0001$ im Mann-Whitney-Test) als auch über den präataktischen

Mutationsträgern ($p < 0,0001$ im Mann-Whitney-Test). Diese Daten lagen von allen Studienteilnehmern vor.

Ähnlich verhielt es sich beim INAS-Score. Im Gegensatz zum SARA-Score, der sich auf die ataktischen Symptome der SCA3 konzentriert, ist dieser ein Messgerät für das Vorhandensein von Zusatzsymptomen wie Tremor oder Dysphagie. Er kann Werte von 0 bis 16 annehmen. Mit 0,5 im Median (Kontrollprobanden) und 1,0 (präataktische Mutationsträger) bewegten sich die ersten beiden Gruppen erneut in einem ähnlichen Rahmen. Auch hier bestand jedoch ein signifikanter Unterschied ($p = 0,03$ im Mann-Whitney-Test). Bei den ataktischen Mutationsträgern betrug der INAS-Score dagegen im Median 5,4. Dieser war damit signifikant höher als innerhalb der Kontrollgruppe, aber auch als bei den präataktischen Mutationsträgern ($p < 0,0001$ im Mann-Whitney-Test für beide).

Das *Age at Onset* war von 181 der Mutationsträger bekannt. Dies beinhaltete sowohl präataktische als auch ataktische Mutationsträger, da es erst im Verlauf der ESMI-Studie zu einer Vereinheitlichung der Definition der präataktischen Probanden kam. Zuvor wurde an dieser Stelle das subjektive Erstauftreten von Symptomen festgehalten, also wurde das AAO in diesen Fällen nicht durch den SARA-Score definiert. Dafür war der Zeitpunkt des Erkrankungsbeginns von 15 Probanden der ataktischen Gruppe nicht bekannt. Im Durchschnitt betrug das AAO 39 Jahre. Die gleiche Kohorte lag der Berechnung der durchschnittlichen *Disease Duration* zugrunde. Diese betrug im Durchschnitt 12 Jahre.

Zusätzlich konnte von 56 Probanden (11 Kontrollen, 45 Mutationsträger) ein Jahr nach der ersten Untersuchung eine zweite PBMC-Probe entnommen werden. Für 2 dieser Personen lag vom ersten Besuch nur eine EDTA-Blutprobe vor und keine PBMC-Probe. Die Einteilung in präataktische und ataktische Mutationsträger ist hier für jede Analyse einzeln getroffen, da einzelne der präataktischen Probanden im Jahr zwischen ihrem ersten und zweiten Besuch begonnen haben, Symptome zu entwickeln ($SARA \geq 3$). Dadurch konnte es zu einem Wechsel von der präataktischen in die Gruppe der ataktischen Mutationsträger kommen.

Tabelle 53: Darstellung der Kenndaten der ESMI-Kohorte. WT-Allel = Wildtyp-Allel, exp. Allel = expandiertes Allel, Age at Onset = Alter zum Beginn der Erkrankung, Disease duration = Krankheitsdauer. Für die Angabe der durchschnittlichen CAG-Wiederholungen der ataktischen Mutationsträger gilt n=188, da für zwei Proben keine DNA-Probe vorlag, um die exakte Anzahl zu bestimmen. In die Angabe der durchschnittlichen CAG-Wiederholungen der expandierten Allele der ataktischen Mutationsträger wurden außerdem zwei Proben homozygoter Mutationsträger mit einbezogen. Für den INAS-Score betrug bei den Kontrollen n=74, bei den Präataktischen n=39 und bei den Ataktischen n=189. Das Age at Onset konnte bei 181 der ataktischen Mutationsträger ermittelt und in die Durchschnittsberechnung einbezogen werden. Hierbei ist zu beachten, dass erst im Verlauf der ESMI-Studie aus Gründen der Vereinheitlichung und Objektivierung bestimmt wurde, dass Probanden ab einem SARA-Score von 3 als ataktisch gelten. Zuvor wurde der Krankheitsbeginn auf das subjektive Erstbemerken von SCA3-typischen Symptomen festgelegt. Gleiches galt dementsprechend auch für die Disease duration. Angegeben sind jeweils der Median und der IQR.

Gruppe	Kontrollen	präataktisch	ataktisch	gesamt
Kohortengröße	77	39	190	306
männlich : weiblich	34 : 43	15 : 24	95 : 94 (1 unbekannt)	144 : 161
Median (25% Perzentile - 75% Perzentile)				
Alter [Jahre]	44 (38-56)	34 (29-39)	52 (45-59)	48 (38-57)
CAG-Repeats (WT-Allel)	23 (20-24)	23 (17-24)	23 (19-24)	23 (19-24)
CAG-Repeats (exp. Allel)	-	69 (66-71)	69 (66-71)	69 (66-71)
SARA (0-40)	0,0 (0,0-0,5)	1,0 (0,0-1,5)	12,8 (8,5-21,1)	7,5 (0,9-15,6)
INAS (0-16)	0,5 (0,0-1,0)	1,0 (0,0-2,0)	5,0 (3,0-7,0)	3,0 (1,0-6,0)
Age at Onset [Jahre]	-	-	39 (33-46)	39 (33-46)
Disease duration [Jahre]	-	-	11 (6-16)	11 (6-16)

3.3.2 Beschreibung und Zusammensetzung der Kohorte aus Brasilien

Im Vergleich zur ESMI-Kohorte war die am Hospital de Clínicas de Porto Alegre gewonnene Kohorte der Probanden aus Brasilien mit 84 Probanden deutlich kleiner. Da von 2 Probanden keine genetischen Informationen vorlagen und damit nicht festgestellt werden konnte, ob diese zu den Kontrollen oder den Mutationsträgern gehörten, wurden sie von vorneherein aus den Analysen ausgeschlossen und diese mit den 82 weiteren Probanden, zu denen auch jeweils eine PBMC-Probe vorlag, durchgeführt.

Es wurden hierbei Proben von insgesamt 39 Männern und 43 Frauen untersucht (siehe Abbildung 19). Das Alter der Probanden zum Zeitpunkt der Probenentnahme und Datenerhebung betrug im Median 32 Jahre. Inklusive der restlichen demographischen Kenndaten ist dies noch einmal in Tabelle 54 aufgeschlüsselt und übersichtlich dargestellt.

Auch innerhalb dieser Kohorte wurden drei Gruppierungen geschaffen, um die vorhandenen Daten strukturiert auszuwerten. Hierbei konnten 20 Probanden der Kontroll-Gruppe zugeordnet werden, die kein expandiertes SCA3-Allel aufwiesen; 34 waren präataktische Mutationsträger, und 28 ataktische Mutationsträger. Die Grenze wurde bei einem SARA von mindestens 3 gezogen, ab dem die Probanden als ataktisch gezählt wurden.

Innerhalb der Kohorte aus Brasilien waren keine homozygoten Merkmalsträger rekrutiert worden.

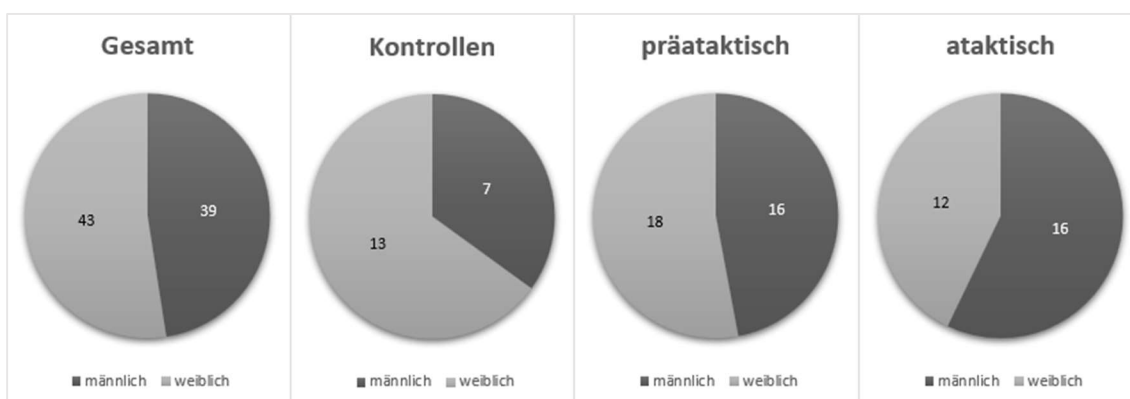


Abbildung 19: Geschlechterverteilung innerhalb der Kohorte aus Brasilien. präataktisch = präataktische Mutationsträger (SARA < 3), ataktisch = ataktische Mutationsträger (SARA ≥ 3). Die Kontroll-Gruppe hatte einen Überhang an weiblichen Probanden. Im Vergleich dazu waren in der Gruppe der ataktischen Mutationsträger mehr männliche Probanden. Insgesamt war die Kohorte im Vergleich zu der des ESMI-Projekts deutlich kleiner.

Wie in Tabelle 54 ebenfalls zu sehen ist, besteht auch innerhalb dieser Kohorte ein signifikanter ($p < 0,0001$ im Mann-Whitney-Test) Unterschied im Altersmedian zwischen der ataktischen Gruppe (39 Jahre) und der präataktischen Gruppe (29 Jahre). Dieser Unterschied ist, wie auch in der ESMI-Kohorte, vermutlich auf den üblicherweise um die 40 Jahre liegenden Erkrankungsbeginn der SCA3 (Betten-court & Lima, 2011; Mendonça et al., 2018) zurückzuführen. Die Kontrollprobanden waren im Median 31 Jahre alt.

Was die SCA3-spezifischen Parameter angeht, ist die Kohorte aus Brasilien ebenfalls ähnlich aufgebaut wie die zuvor beschriebene ESMI-Kohorte. Diese Ergebnisse sind vergleichend in Tabelle 54 dargestellt.

Für sämtliche einbezogenen Probanden lagen die Anzahl der *CAG-Repeats* auf dem nicht-expandierten und dem expandierten Allel (im Fall eines Mutationsträgers) vor, sodass diese vollständig einbezogen werden konnten. Geringe, nicht-signifikante Unterschiede bestanden beim Median der *CAG-Repeats* auf dem / den nicht-expandierten Allelen über die Gruppen hinweg. Dieser lag bei 23 für die Kontrollgruppe, ebenfalls bei 23 für die präataktischen und bei 22 für die ataktischen Mutationsträger. Für das expandierte Allel betrug der Median 76 für die präataktischen und 77 für die ataktischen Probanden (siehe Tabelle 54). Auch dieser Unterschied war nicht signifikant.

Der SARA-Score war im Median vergleichbar zwischen der Kontrollgruppe (0,5) und den präataktischen Mutationsträgern (ebenfalls 0,5). Im Gegensatz zur ESMI-Kohorte bestand hier kein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen ($p > 0,05$ im Mann-Whitney-Test). Mit einem Median von 7,5 war der SARA-Score der ataktischen Gruppe signifikant (jeweils $p < 0,0001$ im Mann-Whitney-Test) höher sowohl als in der Kontrollgruppe als auch im Vergleich mit den präataktischen Mutationsträgern. Diese Differenz war allerdings weniger ausgeprägt als innerhalb der ESMI-Kohorte, da kein Proband aus Brasilien einen SARA-Score von höher als 16 aufwies. Im Vergleich dazu wurde innerhalb der ESMI-Kohorte bei einem Probanden das Maximum von 40 Punkten erreicht.

Was die nicht-ataktischen Symptome der SCA3, dargestellt im INAS-Score, anging, waren die beiden Kohorten miteinander vergleichbar. Allerdings war die Differenz zwischen dem Median der präataktischen (1,5) und der ataktischen (5,0) innerhalb der Brasilien-Kohorte geringer. Dies liegt an den hier durchschnittlich höheren erreichten Werten im INAS-Score in der präataktischen Gruppe, die eine Vielzahl an möglichen Ursachen, unter anderem eine verschiedene Prävalenz von Subtypen der SCA3 oder eine Untersuchervariabilität, als Ursache haben könnte. Die Differenz zwischen den beiden Gruppen war dennoch signifikant ($p < 0,0001$ im Mann-Whitney-Test).

Außer bei einem Probanden war bei sämtlichen ataktischen Mutationsträgern das *Age at Onset* bekannt. Dieses lag im Median bei 32 Jahren. Entsprechend mit dem individuellen Alter verrechnet lag der Median der *Disease Duration* damit bei 5 Jahren. Auch diese Daten sind in Tabelle 54 noch einmal gemeinschaftlich dargestellt.

Tabelle 54: Darstellung der Kenndaten der Kohorte aus Brasilien. WT-Allel = Wildtyp-Allel, exp. Allel = expandiertes Allel, Age at Onset = Alter zum Beginn der Erkrankung, Disease duration = Krankheitsdauer. Hier waren für alle Probanden die CAG-Wiederholungen, der SARA- und der INAS-Score bekannt, sodass n für diese Angaben der Größe der jeweiligen Kohorte entspricht. Age at Onset und Disease Duration waren für 27 der 28 ataktischen Mutationsträger festgehalten. Innerhalb der Brasilien-Kohorte gab es keine homozygoten Merkmalsträger. Angegeben sind jeweils der Median und der IQR.

Gruppe	Kontrollen	präataktisch	ataktisch	gesamt
Kohortengröße	20	34	28	82
männlich : weiblich	7 : 13	16 : 18	16 : 12	39 : 43
Median (25% Perzentile - 75% Perzentile)				
Alter [Jahre]	31 (26-40)	29 (23-35)	39 (32-49)	32 (27-39)
CAG-Repeats (WT-Allel)	23 (22-27)	23 (21-24)	22 (14-24)	23 (20-26)
CAG-Repeats (exp. Allel)	-	76 (72-76)	77 (72-77)	76 (72-77)
SARA (0-40)	0,5 (0,0-1,0)	0,5 (0,0-1,5)	7,5 (6,0-10,8)	1 (0,5-6)
INAS (0-16)	1,0 (0,0-2,0)	1,5 (0,8-4,0)	5,0 (4,0-7,0)	2,5 (1,0-5,0)
Age at Onset [Jahre]	-	-	32 (30-44)	32 (30-44)
Disease duration [Jahre]	-	-	5 (3-7)	5 (3-7)

3.4 Auswertung der demographischen und klinischen Daten

3.4.1 Auswertung für die ESMI-Kohorte

Wie bereits in Kapitel 3.3.1 erläutert, waren nicht für alle in die Studie eingeschlossenen Probanden eine PBMC-Probe oder sämtliche klinischen Daten vorhanden, sodass die Menge der eingeschlossenen Probanden von Analyse zu

Analyse variiert. Aus diesem Grund ist die Zahl der eingeschlossenen Probanden in sämtlichen Abbildungen separat kenntlich gemacht (n). In die Auswertungen der demographischen und klinischen Daten wurden außerdem, da diese sich auf die Merkmale klinisch erkrankter Probanden beziehen, lediglich die ataktischen Mutationsträger ($SARA \geq 3$) einbezogen.

Die Ergebnisse sind graphisch in Abbildung 20 dargestellt. Bei der Betrachtung der Beziehung zwischen der Anzahl der nachgewiesenen CAG-Wiederholungen im *ATXN3*-Gen auf dem expandierten Allel und dem *Age at Onset* zeigte sich die bereits in Kapitel 1.1 mehrfach vorbeschriebene inverse Korrelation zwischen diesen beiden Größen auch in der in dieser Arbeit untersuchten Kohorte. Für die Feststellung dieses Zusammenhangs wurde hier zunächst mittels des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung geprüft. Diese war gegeben, sodass die inverse Korrelation sowohl mit dem Pearson-Test (für normalverteilte Kohorten) als auch mit dem Spearman-Test (auch für nicht-normalverteilte Kohorten geeignet) geprüft und bestätigt werden konnte. Diese war in diesem Fall mit beiden Untersuchungen hochsignifikant ($p < 0,0001$).

Für alle weiteren Untersuchungen ergab der Shapiro-Wilk-Test keine Normalverteilung der verwendeten Daten, sodass für die Untersuchung der Signifikanz der Zusammenhänge im Weiteren der Spearman-Test verwendet wurde.

Untersucht wurden neben dem AAO in Bezug auf die Anzahl der CAG-Wiederholungen auf dem expandierten Allel auch mögliche Zusammenhänge zwischen Letzterer und klinischen Parametern. Hier kam zum einen der SARA-Score für die Quantifizierung der ataktischen Symptome der SCA3 ins Spiel, sowie der INAS-Score, mit dem die nicht-ataktischen Symptome analysiert werden können. Zwischen der Anzahl der CAG-Wiederholungen und dem SARA-Score ergab sich eine signifikante, wenn auch geringer als zum AAO ausgeprägte positive Korrelation ($p < 0,01$). Das gleiche galt auch für den INAS-Score; hier ergab sich eine ähnlich ausgeprägte positive Korrelation zwischen der Anzahl der CAG-Wiederholungen und dem INAS-Score, die im Spearman-Test signifikant war ($p < 0,01$).

Außerdem wurde der Einfluss der Erkrankungsdauer (*DD*) auf die klinische Schwere, hier ebenfalls dargestellt durch den SARA- und den INAS-Score,

untersucht. Sowohl in Bezug auf den SARA- als auch auf den INAS-Score ergab sich eine hochsignifikante positive Korrelation ($p < 0,0001$) im Spearman-Test.

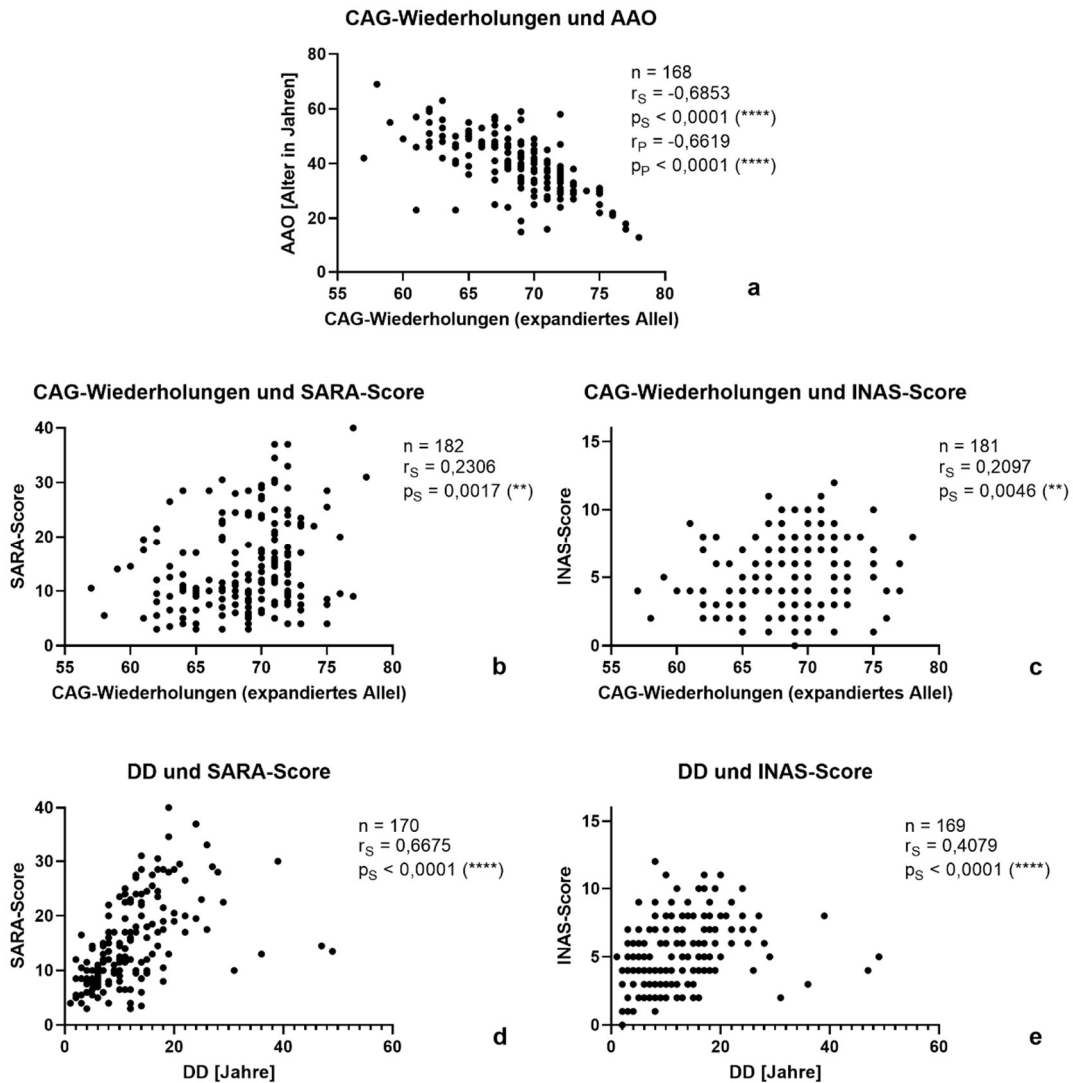


Abbildung 20: Untersuchung der Zusammenhänge verschiedener demographischer, klinischer und genetischer Daten innerhalb der ESMI-Kohorte. n = Anzahl der in die jeweilige Analyse eingeschlossenen Probanden, AAO = Age At Onset, DD = Disease Duration, $r_S = r$ (Korrelationskoeffizient) nach dem Spearman-Test, $p_S = p$ (Signifikanzniveau) nach dem Spearman-Test, $r_P = r$ nach dem Pearson-Test, $p_P = p$ nach dem Pearson-Test, ** = signifikant mit $p < 0,01$, **** = signifikant mit $p < 0,0001$. a: Es besteht eine hochsignifikante ($p < 0,0001$) inverse Korrelation zwischen der Anzahl an CAG-Wiederholungen auf dem expandierten Allel und dem AAO; nachgewiesen sowohl im Spearman- als auch im Pearson-Test. Aufgrund des positiven Shapiro-Wilk-Tests und damit der Bestätigung der Normalverteilung der Daten wurden in diesem Fall beide Tests durchgeführt. b und c: Es besteht eine signifikante ($p < 0,01$) Korrelation zwischen der Anzahl der CAG-Wiederholungen auf dem expandierten Allel und klinischen Parametern der Krankheitsschwere wie dem SARA-Score für ataktische Symptome der SCA3 (b) und dem INAS-Score für nicht-ataktische Symptome (c). d und e: Es besteht eine hochsignifikante ($p < 0,0001$) Korrelation zwischen der Dauer der Erkrankung (DD) und klinischen Parametern der Krankheitsschwere wie dem SARA-Score für ataktische Symptome der SCA3 (d) und dem INAS-Score für nicht-ataktische Symptome (e).

3.4.2 Auswertung für die Brasilien-Kohorte

Die Auswertung der Daten der Kohorte aus Brasilien wurde analog zur in Kapitel 3.4.1 dargestellten Vorgehensweise durchgeführt. Da das *Age at Onset* in einem Fall nicht bekannt war, variiert auch hier die Anzahl der eingeschlossenen Probanden je nach Analyse und wurde daher jeweils explizit angegeben (n). Die Ergebnisse sind graphisch in Abbildung 21 dargestellt.

Auch hier wurde zunächst die bereits bekannte inverse Korrelation zwischen der Anzahl der CAG-Wiederholungen und dem *Age At Onset* in der vorliegenden Kohorte überprüft. Da die Daten sich im Shapiro-Wilk-Test als normalverteilt herausstellten, wurde diese Analyse sowohl mit dem Pearson-Test für normalverteilte Daten als auch mit dem Spearman-Test, der eine Korrelation normalverteilter oder nicht-normalverteilter Daten prüfen kann, durchgeführt. Hier ergab sich in beiden Tests eine deutliche ($r < -0,8$) hochsignifikante ($p < 0,0001$) inverse Korrelation zwischen den beiden Größen.

Für die weiteren Analysen ergab der Shapiro-Wilk-Test keine Normalverteilung, sodass mittels Spearman-Test auf eine mögliche Korrelation geprüft wurde.

Bei der Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen der Anzahl der CAG-Wiederholungen und klinischen Scores wie dem SARA-Score für ataktische Symptome der SCA3 und dem INAS-Score für begleitende nicht-ataktische Symptome ergab sich keine signifikante Korrelation. Das gleiche galt für die Untersuchung der Dauer der Erkrankung (*DD*) in Bezug auf den SARA- und den INAS-Score. Auch hier ergab sich keine signifikante Korrelation, wodurch sich insbesondere im Falle der letzten zwei Analysen ein deutlicher Kontrast zur zuvor untersuchten ESMI-Kohorte zeigt.

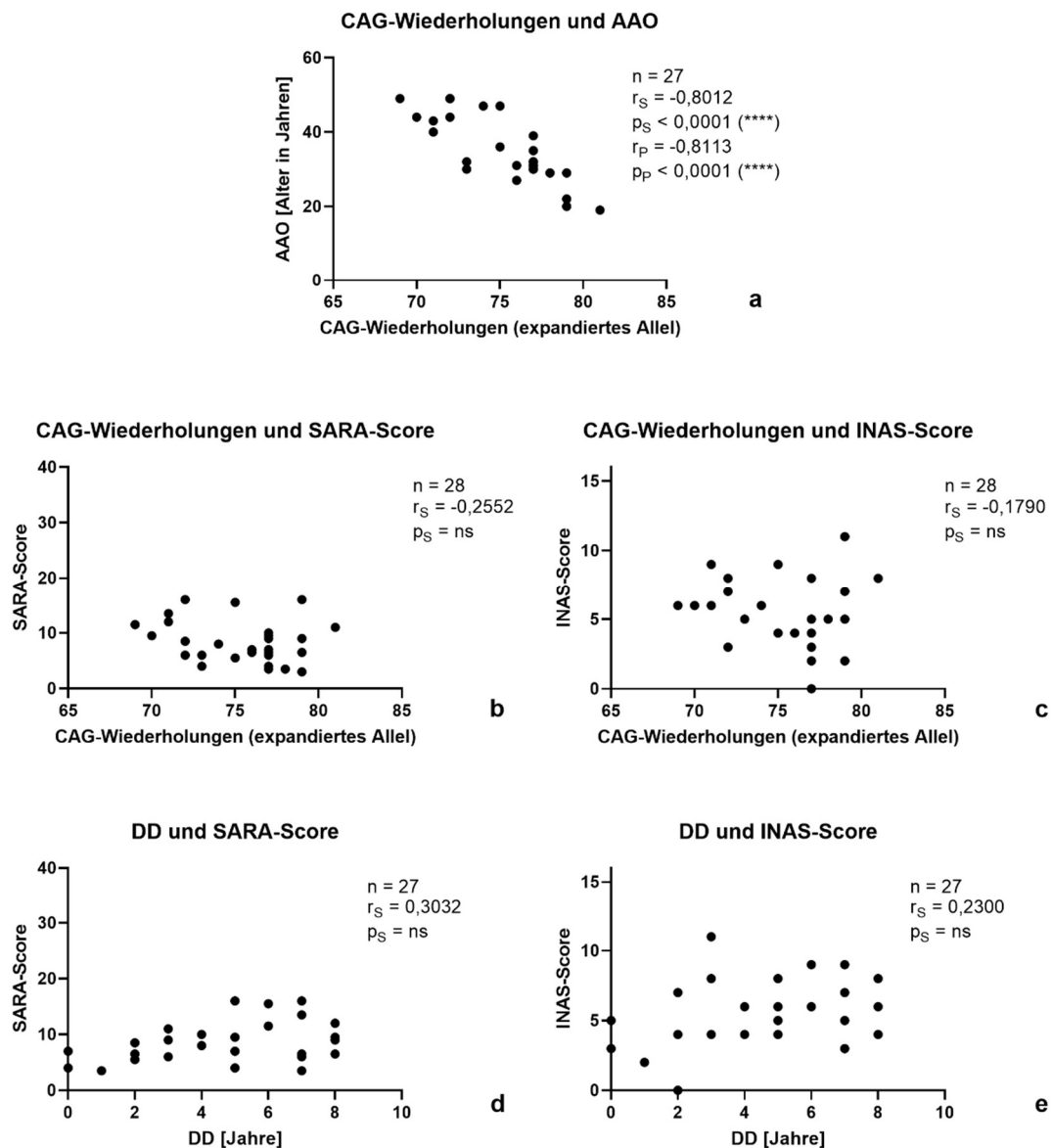


Abbildung 21: Untersuchung der Zusammenhänge verschiedener demographischer, klinischer und genetischer Daten innerhalb der Kohorte aus Brasilien. n = Anzahl der in die jeweilige Analyse eingeschlossenen Probanden, AAO = Age At Onset, DD = Disease Duration, $r_S = r$ (Korrelationskoeffizient) nach dem Spearman-Test, $p_S = p$ (Signifikanzniveau) nach dem Spearman-Test, $r_P = r$ nach dem Pearson-Test, $p_P = p$ nach dem Pearson-Test, ns = nicht-signifikant, **** = signifikant mit $p < 0,0001$. a: Es besteht eine hochsignifikante ($p < 0,0001$) inverse Korrelation zwischen der Anzahl an CAG-Wiederholungen auf dem expandierten Allel und dem AAO; nachgewiesen sowohl im Spearman- als auch im Pearson-Test. Aufgrund des positiven Shapiro-Wilk-Tests und damit der Bestätigung der Normalverteilung der Daten wurden in diesem Fall beide Tests durchgeführt. b und c: Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen der Anzahl der CAG-Wiederholungen auf dem expandierten Allel und klinischen Parametern der Krankheitsschwere wie dem SARA-Score für ataktische Symptome der SCA3 (b) und dem INAS-Score für nicht-ataktische Symptome (c) festgestellt werden. d und e: Es konnte keine signifikante Korrelation zwischen der Dauer der Erkrankung (DD) und klinischen Parametern der Krankheitsschwere wie dem SARA-Score für ataktische Symptome der SCA3 (d) und dem INAS-Score für nicht-ataktische Symptome (e) festgestellt werden.

Tabelle 55: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse des Kapitels Auswertung der demographischen und klinischen Daten. Beschrieben sind jeweils beide untersuchte Größen und der statistische Zusammenhang der untersuchten Korrelationen.

Zusammenhang	ESMI-Kohorte	Brasilien-Kohorte
CAG-Wdh und AAO	Umgekehrt proportional	Umgekehrt proportional
CAG-Wdh und SARA	Signifikant proportional	Nicht signifikant
CAG-Wdh und INAS	Signifikant proportional	Nicht signifikant
DD und SARA	Signifikant proportional	Nicht signifikant
DD und INAS	Signifikant proportional	Nicht signifikant

3.5 Auswertung der mittels TR-FRET gemessenen Ataxin-3-Konzentrationen in PBMCs

Um die Eignung von Ataxin-3 als möglichen Biomarker zu untersuchen, wurden zum einen Möglichkeiten der Bestimmung des Ataxin-3-Levels mittels TR-FRET untersucht (für das Prozedere und Vorgehen bei der Messung mittels TR-FRET siehe Kapitel 2.2.14) sowie mögliche Zusammenhänge zwischen den gemessenen Daten und klinischen und demographischen Daten wie der erreichten Punktzahl nach dem SARA-Score, dem *Age At Onset* und der Krankheitsdauer.

Aufgrund der Tatsache, dass die PBMC-Proben aus der Kohorte aus Brasilien als nicht zuverlässig verwertbar eingestuft wurden (siehe Kapitel 3.2.2), wurden diese Analysen nur mit den Proben der ESMI-Kohorte durchgeführt. Durch das wiederholte Fehlschlagen einzelner Analysen und das vereinzelt Fehlen klinischer oder demographischer Daten unterscheidet sich auch hier die Anzahl der eingeschlossenen Proben je nach Analyse und ist daher in den entsprechenden Abbildungen stets durch die Angabe der analysierten Datensätze (n) kenntlich gemacht.

Untersucht wurde dabei die mittels TR-FRET bestimmte Ataxin-3-Konzentration mittels zweier verschiedener in Kapitel 2.2.14 dargestellter Antikörperkombinationen. Zum einen wurde die Antikörperkombination mit MW1 verwendet, die an PolyQ-Ketten größer 15Q bindet, und zum anderen die beschriebene

Antikörperkombination mit 1C2, mit der Ataxin-3 größer 37Q dargestellt wird. Die Ergebnisse sind graphisch in Abbildung 22 und Abbildung 23 respektive dargestellt.

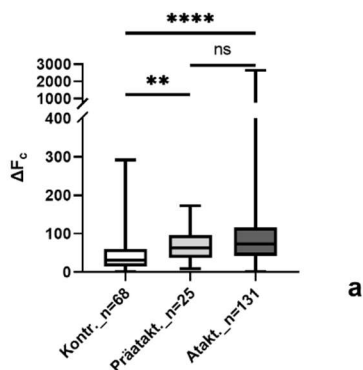
Es wurden für beide Antikörperkombinationen die gleichen Analysen, bezugnehmend auf die gleichen demographischen und klinischen Variablen durchgeführt, wobei hier zunächst auf die Messergebnisse der Antikörperkombination mit MW1 eingegangen wird.

Hierfür wurden die Probanden in einer ersten Analyse in eine Kontrollgruppe (Probanden ohne expandiertes *ATXN3*-Allel), präataktische ($SARA < 3$) und ataktische ($SARA \geq 3$) Mutationsträger eingeteilt und die mit dem TR-FRET gemessene Ataxin-3-Konzentration dieser drei Gruppen miteinander verglichen. Hier zeigte sich zum einen im Kruskal-Wallis Test für mehr als zwei nicht-normalverteilte Kohorten eine Signifikanz ($p < 0,0001$); zum Anderen wurden mittels des Mann-Whitney-Test auch die Gruppen einzeln miteinander verglichen. Es konnte ein signifikanter ($p < 0,01$) Unterschied zwischen Kontrollen und präataktischen Mutationsträgern gefunden werden, sowie ein hochsignifikanter Unterschied zwischen Kontrollen und ataktischen Mutationsträgern ($p < 0,0001$). Zwischen den Untergruppen der Mutationsträger bestand kein signifikanter Unterschied. Darüber hinaus überlappten sich die Messbereiche in allen Fällen, so dass aufgrund eines Messwertes keine eindeutige Gruppenzuordnung möglich war.

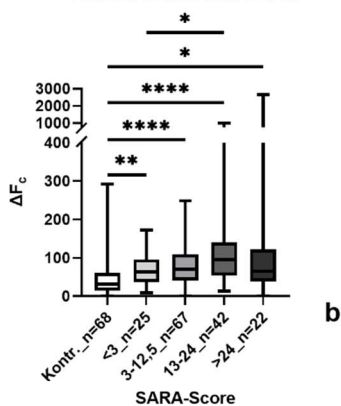
Für weitere Analysen des Zusammenhangs zwischen SARA-Score und den gemessenen Ataxin-3-Werten wurden die ataktischen Mutationsträger nach Schwere der Symptomatik eingeteilt. Auch hier zeigte sich ein hochsignifikanter ($p < 0,0001$) Unterschied zwischen den Datengruppen im Kruskal-Wallis-Test. Das Vergleichen der einzelnen Probengruppen miteinander mittels Mann-Whitney-Test ergab gemischte Ergebnisse. Am Deutlichsten und Signifikantesten war der Unterschied zwischen den Messwerten der Kontrollgruppe und denen innerhalb der Mutationsträger mit leichter ($SARA = 3$ bis $12,5$) und mittelschwerer ($SARA = 13$ bis 24) ataktischer Symptomatik. Es zeigte sich darüber hinaus keine signifikante Korrelation zwischen SARA-Score und mittels TR-FRET gemessener Ataxin-3-Konzentration in den PBMCs.

Für die Analysen der gemessenen Ataxin-3-Konzentrationen im Verhältnis zum *Age At Onset* ergab sich kein signifikanter Zusammenhang, weder im Vergleich verschiedener Datengruppen im Kruskal-Wallis-Test, noch bei Analyse einer möglichen Korrelation. Das Gleiche galt für die Ataxin-3-Konzentration in Bezug auf die *Disease Duration*.

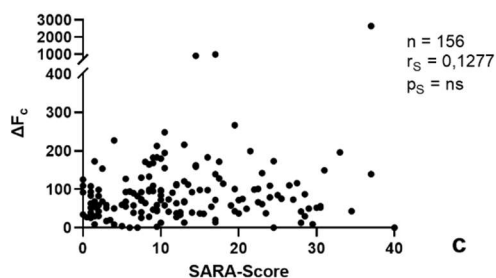
ATXN3-Werte nach Gruppenzugehörigkeit



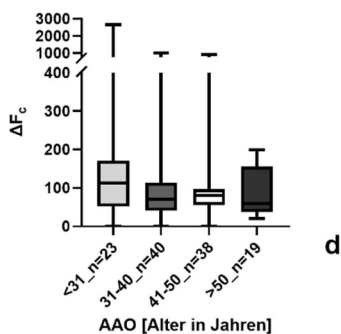
ATXN3-Werte und SARA



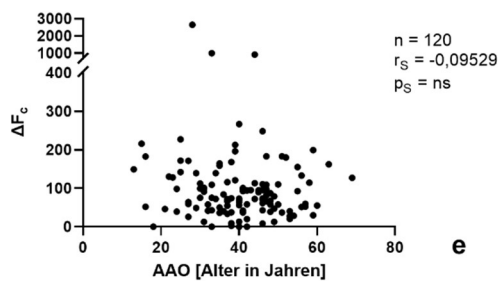
ATXN3-Werte und SARA



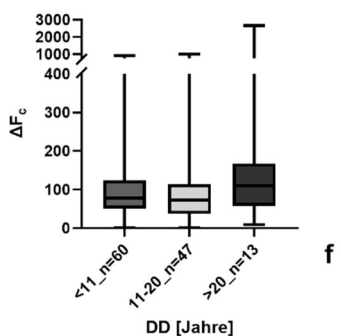
ATXN3-Werte und AAO



ATXN3-Werte und AAO



ATXN3-Werte und DD



ATXN3-Werte und DD

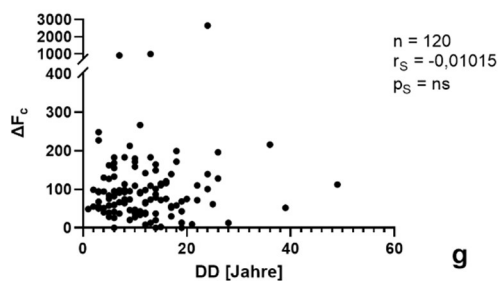


Abbildung 22: TR-FRET-Messwerte, bestimmt mittels der Antikörperkombination mit MW1 (bindet PolyQ-Ketten > 15Q; siehe Kapitel 1.6) im Verhältnis zu SARA, AAO und DD. $\Delta F_c = \Delta F$ (% Signal über Hintergrund), korrigiert auf die Gesamtproteinkonzentration einer Probe, n = Anzahl der in die

*jeweilige Analyse eingeschlossenen Probanden bzw. Probanden pro Gruppe, Kontr. = Probanden ohne expandiertes ATXN3-Gen, Präatakt. = Mutationsträger mit SARA < 3, Atakt. = Mutationsträger mit ataktischer Symptomatik (SARA ≥ 3), AAO = Age At Onset, DD = Disease Duration, $r_s = r$ (Korrelationskoeffizient) nach dem Spearman-Test, $p_s = p$ (Signifikanzniveau) nach dem Spearman-Test, ns= nicht-signifikant, * = signifikant mit $p < 0,05$, ** = signifikant mit $p < 0,01$, **** = signifikant mit $p < 0,0001$. a: Mittels Kruskal-Wallis-Test wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen Messwerten und Gruppenzugehörigkeit festgestellt ($p < 0,0001$). Die jeweiligen Untergruppen wurden jeweils einzeln mit dem Mann-Whitney-Test verglichen. b: Mittels Kruskal-Wallis-Test wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen Messwerten und SARA-Gruppierung festgestellt ($p < 0,0001$). Die jeweiligen Untergruppen wurden jeweils einzeln mit dem Mann-Whitney-Test verglichen. Ist kein Signifikanzniveau für einen direkten Vergleich angegeben, so ergab sich kein signifikanter Unterschied. c: Es zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen SARA-Score und Ataxin-3-Messwerten im TR-FRET. Da der Shapiro-Wilk-Test keine Normalverteilung zeigte, wurde die Analyse mittels Spearman-Test durchgeführt. d: Das Age At Onset wurde nach Dekade eingeteilt und die Ataxin-3-Werte darunter verglichen. Es zeigte sich im Kruskal-Wallis-Test kein signifikanter Unterschied zwischen den Datengruppen. e: Es zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen AAO und Ataxin-3-Messwerten im TR-FRET. Da der Shapiro-Wilk-Test keine Normalverteilung zeigte, wurde die Analyse mittels Spearman-Test durchgeführt. f: Die Disease Duration wurde in 10er-Schritten eingeteilt und die Ataxin-3-Werte darunter verglichen. Es zeigte sich im Kruskal-Wallis-Test kein signifikanter Unterschied zwischen den Datengruppen. g: Es zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen DD und Ataxin-3-Messwerten im TR-FRET. Da der Shapiro-Wilk-Test keine Normalverteilung zeigte, wurde die Analyse mittels Spearman-Test durchgeführt.*

Es ergaben sich insgesamt ähnliche Ergebnisse für die in Kapitel 2.2.14 beschriebene Antikörperkombination mit 1C2. Auch hier wurden die Daten der Probanden zunächst in Kontrollen, präataktische und ataktische Mutationsträger eingeteilt und die Messwerte dieser drei Gruppen miteinander verglichen. Äquivalent zur Antikörperkombination mit MW1 zeigte der Kruskal-Wallis-Test eine Signifikanz bei Analyse ($p < 0,0001$). Beim Vergleich der einzelnen Gruppen miteinander zeigte sich ein signifikanter ($p < 0,001$) Unterschied zwischen Kontrollen und präataktischen Mutationsträgern sowie ein hochsignifikanter ($p < 0,0001$) Unterschied zwischen Kontrollen und ataktischen Mutationsträgern, letzteres damit analog zur Antikörperkombination mit MW1. Kein signifikanter Unterschied bestand zwischen den präataktischen und ataktischen Mutationsträgern. Insgesamt ergaben sich auch bei diesen Messungen deutliche Überlappungen der Messwerte der verschiedenen Gruppen.

Bei erneuter Einteilung der ataktischen Mutationsträger nach Schwere der Symptomatik ergab sich auch hier im Kruskal-Wallis-Test ein hochsignifikantes ($p < 0,0001$) Ergebnis. Beim Vergleich der Untergruppen miteinander durch den Mann-Whitney-Test ergab sich der signifikanteste Unterschied auch bei der Antikörperkombination mit 1C2 zwischen den Kontrollen und Mutationsträgern mit leichter und mittelschwerer ataktischer Symptomatik ($p < 0,0001$ in beiden

Fällen). Bei Analyse einer möglichen Korrelation der Daten miteinander (erfolgt mittels Spearman-Test, nachdem im Shapiro-Wilk-Test die Normalverteilung der Daten ausgeschlossen wurde) zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen SARA-Score und gemessener Ataxin-3-Konzentration.

Analog zur Analyse der Antikörperkombination mit MW1 ergab sich auch bei der Antikörperkombination mit 1C2 kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Ataxin-3-Konzentration und dem *Age At Onset* (kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen im Kruskal-Wallis-Test sowie keine Korrelation im Spearman-Test) sowie der Ataxin-3-Konzentration und der *Disease Duration* (kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen im Kruskal-Wallis-Test sowie keine Korrelation im Spearman-Test).

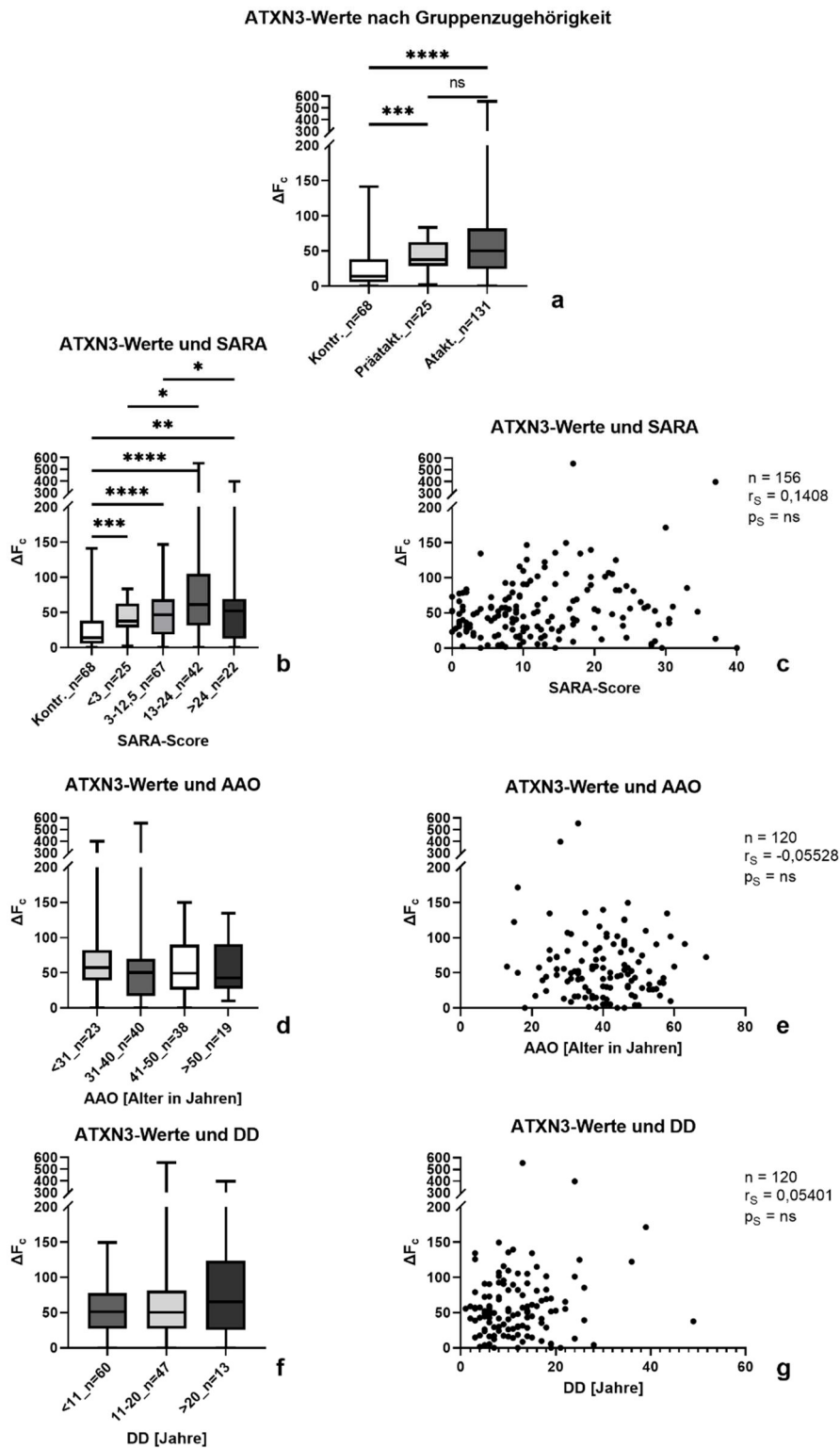


Abbildung 23: TR-FRET-Messwerte, bestimmt mittels der Antikörperkombination mit 1C2 (bindet PolyQ-Ketten > 37Q; siehe Kapitel 1.6) im Verhältnis zu SARA, AAO und DD. $\Delta F_c = \Delta F$ (% Signal über Hintergrund), korrigiert nach der Gesamtproteinkonzentration einer Probe, n = Anzahl der in die jeweilige Analyse eingeschlossenen Probanden bzw. Probanden pro Gruppe, Kontr. = Probanden ohne expandiertes ATXN3-Gen, Präatakt. = Mutationsträger mit SARA < 3, Atakt. = Mutationsträger mit ataktischer Symptomatik (SARA \geq 3), AAO = Age At Onset, DD = Disease Duration, r_s = r

(Korrelationskoeffizient) nach dem Spearman-Test, $p_s = p$ (Signifikanzniveau) nach dem Spearman-Test, ns= nicht-signifikant, * = signifikant mit $p < 0,05$, ** = signifikant mit $p < 0,01$, *** = signifikant mit $p < 0,001$, **** = signifikant mit $p < 0,0001$. a: Mittels Kruskal-Wallis-Test wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen Messwerten und Gruppenzugehörigkeit festgestellt ($p < 0,0001$). Die jeweiligen Untergruppen wurden jeweils einzeln mit dem Mann-Whitney-Test verglichen. b: Mittels Kruskal-Wallis-Test wurde ein signifikanter Zusammenhang zwischen Messwerten und SARA-Gruppierung festgestellt ($p < 0,0001$). Die jeweiligen Untergruppen wurden jeweils einzeln mit dem Mann-Whitney-Test verglichen. Ist kein Signifikanzniveau für einen direkten Vergleich angegeben, so ergab sich kein signifikanter Unterschied. c: Es zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen SARA-Score und Ataxin-3-Messwerten im TR-FRET. Da der Shapiro-Wilk-Test keine Normalverteilung zeigte, wurde die Analyse mittels Spearman-Test durchgeführt. d: Das Age At Onset wurde nach Dekade eingeteilt und die Ataxin-3-Werte darunter verglichen. Es zeigte sich im Kruskal-Wallis-Test kein signifikanter Unterschied zwischen den Datengruppen. e: Es zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen AAO und Ataxin-3-Messwerten im TR-FRET. Da der Shapiro-Wilk-Test keine Normalverteilung zeigte, wurde die Analyse mittels Spearman-Test durchgeführt. f: Die Disease Duration wurde in 10er-Schritten eingeteilt und die Ataxin-3-Werte darunter verglichen. Es zeigte sich im Kruskal-Wallis-Test kein signifikanter Unterschied zwischen den Datengruppen. g: Es zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen DD und Ataxin-3-Messwerten im TR-FRET. Da der Shapiro-Wilk-Test keine Normalverteilung zeigte, wurde die Analyse mittels Spearman-Test durchgeführt.

Tabelle 56: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse des Kapitels Auswertung der mittels TR-FRET gemessenen Ataxin-3-Konzentrationen in PBMCs. Beschrieben sind jeweils beide untersuchte Größen und der statistische Zusammenhang der untersuchten Korrelationen.

Zusammenhang	MW1	1C2
ATXN3-Werte nach Gruppenzugehörigkeit	Signifikante Unterschiede der Mutationssträgergruppen zu den Kontrollen	Signifikante Unterschiede der Mutationssträgergruppen zu den Kontrollen
ATXN3-Werte und SARA	Signifikante Unterschiede der Mutationssträgergruppen zu den Kontrollen Korrelation: nicht signifikant	Signifikante Unterschiede der Mutationssträgergruppen zu den Kontrollen Korrelation: nicht signifikant
ATXN3-Werte und AAO	Keine signifikanten Unterschiede	Keine signifikanten Unterschiede
ATXN3-Werte und DD	Keine signifikanten Unterschiede	Keine signifikanten Unterschiede

3.6 Auswertung der Follow-up-Proben

Für insgesamt 56 Probanden der ESMI-Kohorte stand neben den ursprünglichen Proben, die beim ersten Besuch abgenommen wurden, eine PBMC-Probe, die ein Jahr später abgenommen wurde (*Follow-up-Probe*), zur Verfügung. Dies erlaubte eine Beobachtung der Ataxin-3-Konzentration in PBMCs über die Zeit und ein In-Relation-Setzen der Veränderung dieser zur Veränderung des SARA-Scores. Hierdurch konnte die Entwicklung des potenziellen Biomarkers im Vergleich zur Entwicklung klinischer Scores betrachtet werden.

Von den 56 Proben gehörten 10 zu Kontrollprobanden, sodass diese von der folgenden Auswertung ausgeschlossen wurden, da hier keine Veränderung des SARA-Scores zu erwarten war. Für weitere 5 Proben stand aus dem ersten Besuch keine PBMC-Probe zur Analyse zur Verfügung, sodass hier keine Verlaufsanalyse möglich war. Das Gleiche galt für den SARA-Score eines Probanden, der aus dem ersten Besuch nicht bekannt war. Die *Follow-Up-Probe* eines weiteren Probanden wurde nicht korrekt gelagert und daher aus der Auswertung ausgeschlossen. Es wurden daher die Proben von 39 Probanden in die Analysen einbezogen.

Für sämtliche eingeschlossenen Proben und Probanden wurde die Differenz der SARA-Scores aus Besuch eins und zwei berechnet, sowie die Differenz der gemessenen Ataxin-3-Konzentrationen mittels TR-FRET. Hierfür wurden die mittels der Antikörperkombination mit MW1 und mit 1C2 bestimmten Werte jeweils getrennt analysiert. Anschließend wurden die Differenzen mittels Korrelationsanalyse miteinander ins Verhältnis gesetzt.

Hierbei zeigte sich zunächst mittels Shapiro-Wilk-Test, dass keine Normalverteilung der Daten vorlag, sodass die folgende Analyse mit dem Spearman-Test für nicht-normalverteilte Kohorten durchgeführt wurde. Weder für die Antikörperkombination mit MW1 noch mit 1C2 ergab sich eine Korrelation der Differenzen. Die Ergebnisse waren nicht-signifikant mit p jeweils $> 0,5$. Sie sind in Abbildung 24 dargestellt.

Veränderungen ATXN3-Werte (MW1) und SARA Veränderungen ATXN3-Werte (1C2) und SARA

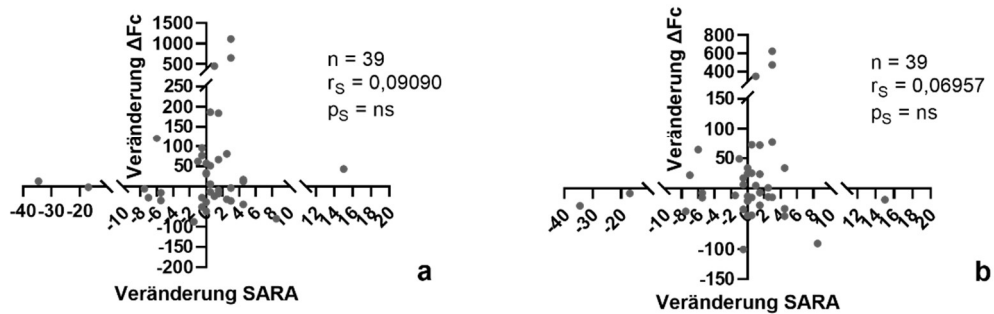


Abbildung 24: Veränderung der ATXN3-Werte in Proben, gewonnen beim zweiten Besuch der Probanden nach einem Jahr, seit dem ersten Besuch, in Verhältnis zur Veränderung des SARA-Scores. $\Delta F_c = \Delta F$ (% Signal über Hintergrund), korrigiert nach der Gesamtproteinkonzentration einer Probe, n = Anzahl der in die jeweilige Analyse eingeschlossenen Probanden bzw. Probanden pro Gruppe, $r_s = r$ (Korrelationskoeffizient) nach dem Spearman-Test, $p_s = p$ (Signifikanzniveau) nach dem Spearman-Test, ns= nicht-signifikant. a: Es zeigte sich keine signifikante ($p = 0,58$) Korrelation zwischen der Veränderung der ATXN3-Messwerte, bestimmt mittels der Antikörperkombination mit MW1 und der Veränderung der bestimmten SARA-Scores der jeweiligen Probanden. Da der Shapiro-Wilk-Test keine Normalverteilung zeigte, wurde die Analyse mittels Spearman-Test durchgeführt. b: Es zeigte sich keine signifikante ($p = 0,67$) Korrelation zwischen der Veränderung der ATXN3-Messwerte, bestimmt mittels der Antikörperkombination mit 1C2 und der Veränderung der bestimmten SARA-Scores der jeweiligen Probanden. Da der Shapiro-Wilk-Test keine Normalverteilung zeigte, wurde die Analyse mittels Spearman-Test durchgeführt.

Es fällt bei den Analysen allerdings nicht nur auf, dass die Ergebnisse nicht signifikant korrelieren. Zusätzlich kann man feststellen, dass der SARA-Score nicht bei allen Probanden angestiegen ist, obwohl es sich bei der SCA3 um eine progressive neurodegenerative Erkrankung handelt. Stattdessen befindet sich die Veränderung des SARA-Scores für einen nicht unbeachtlichen Teil der Patienten im negativen Bereich.

Tabelle 57: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse des Kapitels Auswertung der Follow-Up-Proben. Beschrieben sind jeweils beide untersuchte Größen und der statistische Zusammenhang der untersuchten Korrelationen.

Zusammenhang	MW1	1C2
Veränderung ATXN3-Werte zu Veränderung SARA	Keine signifikante Korrelation	Keine signifikante Korrelation

3.7 Auswertung der Untersuchungen der SNP-Analysen

Für die ESMI-Kohorte stand neben PBMC-Proben auch eine EDTA-Vollblutprobe der meisten Probanden zur Verfügung. Dies erlaubte nach Extraktion der DNA aus der Probe die weitere Analyse des genetischen Materials, zum Beispiel der Ausprägung zuvor ausgewählter *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs). Hierbei wurden insgesamt fünf SNPs in ihrer Ausprägungsverteilung innerhalb der ESMI-Kohorte untersucht. Drei hiervon liegen im *ATXN3*-Gen und zwei im *PARK2*-Gen.

Für die rein genetischen Häufigkeitsanalysen wurden hierbei Kontrollen und Mutationsträger jeweils getrennt voneinander betrachtet, allerdings keine weitere Unterscheidung in der Ausprägung der Krankheitsschwere getroffen.

Darüber hinaus wurde die Ausprägung der verschiedenen SNPs in Bezug gesetzt zu den erhobenen anamnestischen Daten, klinischen Parametern und laborchemischen Messwerten wie der Ataxin-3-Konzentration in PBMCs. Untersucht wurde eine mögliche Korrelation der verschiedenen SNPs mit dem AAO, dem SARA-Score, dem INAS-Score, und den sowohl mittels der Antikörperkombination mit MW1 als auch mit 1C2 bestimmten Ataxin-3-Konzentrationen.

Wie auch in vorangegangenen Auswertungen standen nicht für alle Probanden alle Daten und alle Arten von Proben zur Verfügung. Darüber hinaus schlugen einzelne der Polymorphismenbestimmungen fehl, sodass die jeweilige SNP-Ausprägung nicht für alle Probanden vorlag und damit die Anzahl der eingeschlossenen Daten zwischen den Analysen variiert. Sie wird daher jeweils für die einzelnen Untergruppen angegeben. Für die Untersuchung einer möglichen Korrelation zwischen der SNP-Ausprägung und dem AAO wurden lediglich die ataktischen Mutationsträger betrachtet. Für den SARA- sowie INAS-Score wurde zwischen Kontrollen und Mutationsträgern unterschieden und diese getrennt analysiert. Die gemessenen Ataxin-3-Konzentrationen wurden nach Kontrollen, präataktischen und ataktischen Mutationsträgern aufgeteilt und in den jeweiligen Untergruppen analysiert. In den meisten Fällen wurde zunächst mittels des Kruskal-Wallis-Test für mehr als zwei nicht-normalverteilte Kohorten auf statistisch signifikante Unterschiede der untersuchten Daten zwischen den jeweiligen SNP-Ausprägungen geprüft. Für den Fall, dass dieser Test signifikant auffällig

war, wurden die einzelnen Untergruppen mittels Mann-Whitney-Test miteinander verglichen und auf Signifikanz geprüft. Dies wurde in gleicher Art und Weise für alle der untersuchten SNPs durchgeführt.

3.7.1 *ATXN3*-SNP Bp 669

An Basenpaar 669 in Exon 8 des *ATXN3*-Gens (rs1048755) liegt bei etwa 75 % der Bevölkerung die Base G vor. In diesem Fall kodiert das hier vorliegende Triplet Valin. Kommt es zum Austausch mit der Base A kommt es zu einer *Mis-sense*-Variante und dem Austausch durch Methionin.

Innerhalb der ESMI-Kohorte zeigte sich unter den Kontrollen ein Überwiegen der G-Variante, während unter Mutationsträgern insbesondere im Vergleich die A-Variante deutlich häufiger auftrat. Dies ist graphisch in Abbildung 25 dargestellt.

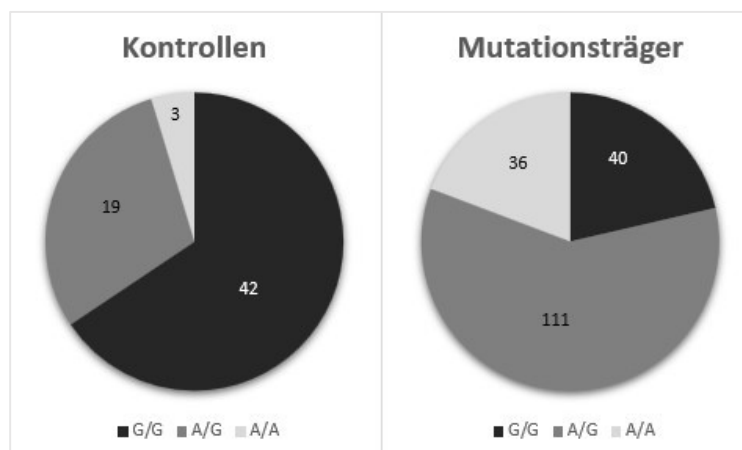


Abbildung 25: Vergleich des Vorkommens der verschiedenen Ausprägungen des *ATXN3*-SNPs Bp 669 zwischen Kontrollen und Mutationsträgern. Bei Kontrollen kommt die Base G, entweder in zweifacher Ausprägung oder in Kombination mit der Base A am häufigsten vor, während bei Mutationsträgern die Kombination A/G oder A/A im Vergleich häufiger vertreten ist. Die Zahlen geben die Anzahl der Probanden mit der jeweiligen Ausprägung an.

In Abbildung 26 werden die bestimmten SNP-Ausprägungen in Bezug zu weiteren Größen gesetzt und graphisch dargestellt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Varianten in Hinblick auf das *Age at Onset* (Abbildung 26a). Auch der SARA- sowie der INAS-Score waren jeweils vergleichbar und wiesen, bestimmt mittels Kruskal-Wallis-Test, keine signifikanten Unterschiede auf (Abbildung 26b-c). Für die mittels TR-FRET gemessenen Ataxin-3-Konzentrationen gab es, bestimmt mit der Antikörperkombination mit

MW1, keine von der SNP-Ausprägung abhängigen Unterschiede (Abbildung 26d). Bei der Antikörperkombination mit 1C2 gab der Kruskal-Wallis-Test für die ataktischen Mutationsträger einen signifikanten Unterschied ($p = 0,02$) aus, so dass die einzelnen Untergruppen mittels Mann-Whitney-Test direkt miteinander verglichen wurden. Dies offenbarte einen signifikanten ($p = 0,009$) Unterschied zwischen den Probanden mit der Allelkombination A/G und denen mit der Kombination A/A (Abbildung 26e).

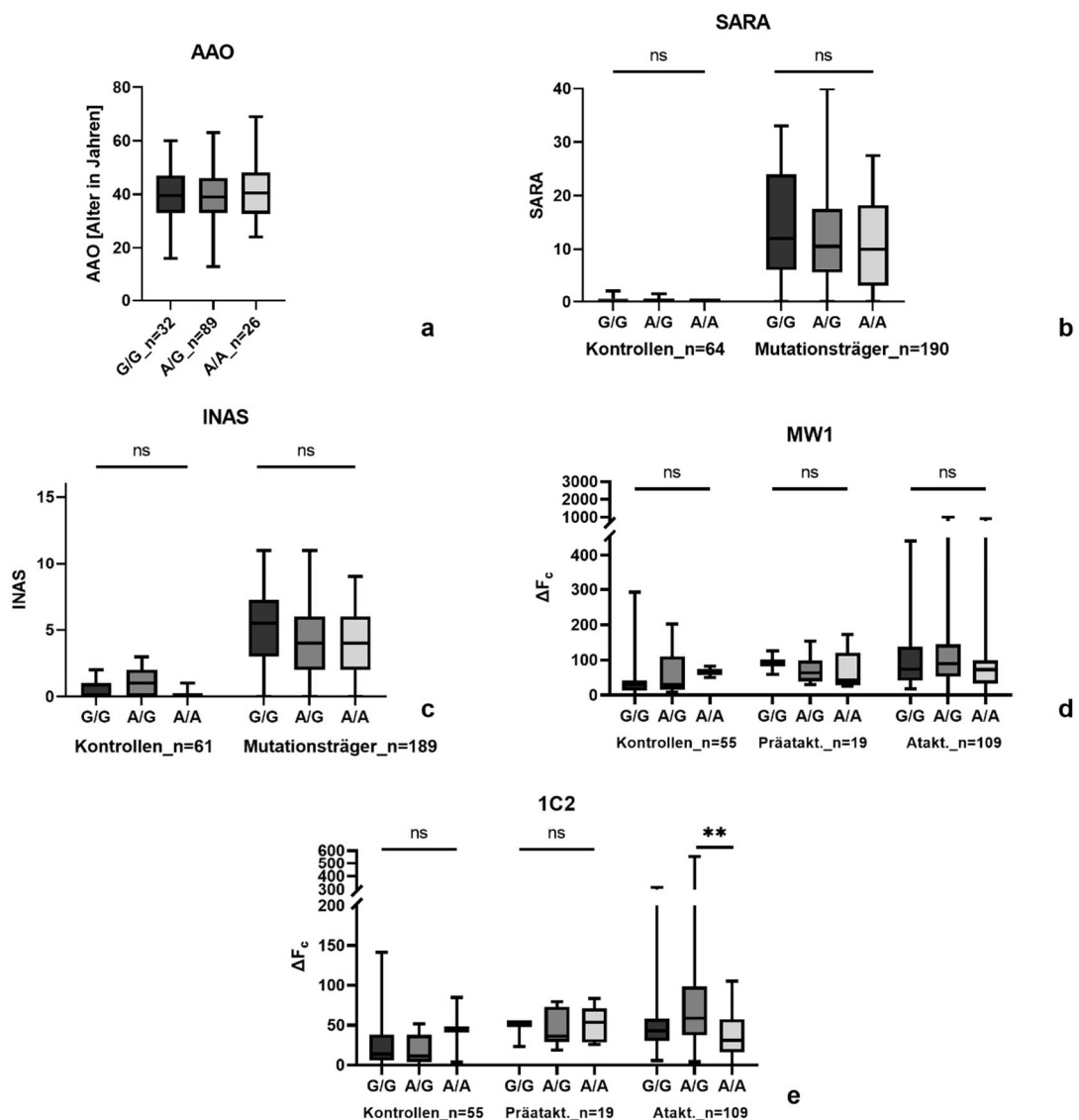


Abbildung 26: Analyse von anamnestischen Daten (AAO), klinischen Parametern (SARA- und INAS-Score) und laborchemisch bestimmten Größen (TR-FRET-Messwerte, bestimmt mittels der Antikörperkombination mit MW1 sowie mit 1C2) in Bezug auf die verschiedenen Ausprägungen des ATXN3-SNPS Bp 669. $\Delta F_c = \Delta F$ (% Signal über Hintergrund), korrigiert nach der Gesamtproteinkonzentration

einer Probe, n = Anzahl der in die jeweilige Analyse eingeschlossenen Probanden bzw. Probanden pro Gruppe, Präatakt. = Mutationsträger mit $SARA < 3$, Atakt. = Mutationsträger mit ataktischer Symptomatik ($SARA \geq 3$), AAO = Age At Onset, ns= nicht-signifikant, ** = signifikant mit $p < 0,01$, G/G / A/G / A/A = jeweilige Ausprägung des ATXN3-SNPs Bp 669. a: AAO, verglichen zwischen den Probanden, gruppiert nach SNP-Ausprägung. Es zeigen sich mittels Kruskal-Wallis-Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Einbezogen wurden in diese Analyse nur ataktische Mutationsträger, deren Ausprägung des Bp 669 bestimmt werden konnte und deren AAO bekannt war. b: SARA-Score, verglichen zwischen den Probanden, aufgeteilt nach Kontrollen und Mutationsträgern und gruppiert nach SNP-Ausprägung. Es zeigten sich mittels Kruskal-Wallis-Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. c: INAS-Score, verglichen zwischen den Probanden, aufgeteilt nach Kontrollen und Mutationsträgern und gruppiert nach SNP-Ausprägung. Es zeigten sich mittels Kruskal-Wallis-Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. d: TR-FRET-Messwerte, bestimmt mittels der Antikörperkombination mit MW1, verglichen zwischen den Probanden, aufgeteilt nach Kontrollen, präataktischen und ataktischen Mutationsträgern und gruppiert nach SNP-Ausprägung. Es zeigten sich mittels Kruskal-Wallis-Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. e: TR-FRET-Messwerte, bestimmt mittels der Antikörperkombination mit 1C2, verglichen zwischen den Probanden, aufgeteilt nach Kontrollen, präataktischen und ataktischen Mutationsträgern und gruppiert nach SNP-Ausprägung. Es zeigten sich mittels Kruskal-Wallis-Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den Untergruppen der Kontrollen und der präataktischen Mutationsträger, und ein signifikanter ($p = 0,02$) Unterschied für die Untergruppe der ataktischen Mutationsträger. Mittels Mann-Whitney-Test konnte ein signifikanter ($p = 0,009$) Unterschied in ΔF_c zwischen den Probanden mit der Allelkombination A/G ($n = 61$) und mit der Allelkombination A/A ($n = 22$) festgestellt werden.

3.7.2 ATXN3-SNP Bp 987

An Basenpaar 987 in Exon 10 des ATXN3-Gens (rs12895357) liegt innerhalb der Bevölkerung mit etwa 89%iger Wahrscheinlichkeit die Base G vor. Hierdurch kodiert das Triplet für Glycin. Beim Austausch durch C wird dieses durch Arginin ausgetauscht (*Missense-Variante*).

Die Art der Analyse des ATXN3-SNPs (siehe Kapitel 2.2.6 und Kapitel 2.2.7) erlaubte bei Mutationsträgern durch die Nähe zum expandierten CAG-Trakt die getrennte Analyse der SNP-Ausprägung auf dem nicht-expandierten Wildtyp-Allel und dem expandierten Allel.

Es zeigte sich, dass an der Stelle von Basenpaar 987 bei Kontrollprobanden häufiger ein G vorliegt. Dies traf auch auf das Wildtyp-Allel von Mutationsträgern zu. Im Vergleich dazu (und auch im Vergleich zur Gesamtbevölkerung) war das expandierte Allel von Mutationsträgern überdurchschnittlich häufig mit dem Auftreten von C verknüpft. Dies ist graphisch in Abbildung 27 dargestellt.

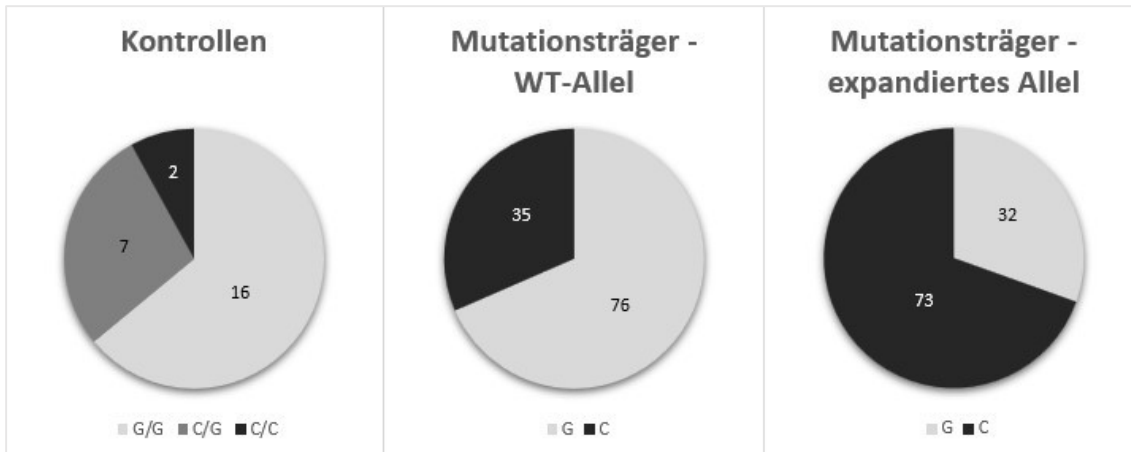


Abbildung 27: Vergleich des Vorkommens der verschiedenen Ausprägungen des ATXN3-SNPs Bp 987 zwischen Kontrollen und Mutationsträgern. WT = Wildtyp. Für die Mutationsträger konnte durch die getrennte Analyse des Wildtyp- und des expandierten Allels eine Zuordnung der SNP-Ausprägung zum jeweiligen Allel erfolgen. Es zeigt sich ein gehäuftes Vorkommen der Base G (entweder in doppelter Ausprägung oder in Kombination mit der Base C) unter Kontrollen und auf dem Wildtyp-Allel von Mutationsträgern, während auf dem expandierten Allel die Base C häufiger vorkommt. Die Zahlen geben die Anzahl der Probanden mit der jeweiligen Ausprägung an.

Die SNP-Ausprägungen wurden in Hinblick auf mögliche Korrelationen mit den bereits beschriebenen weiteren Daten in Zusammenhang gesetzt (Abbildung 28). Da eine Zuordnung der jeweiligen Ausprägung zum Wildtyp- oder expandierten Allel möglich war, wurde für die Ausprägung C/G bei den Mutationsträgern unterschieden zwischen Probanden, bei denen C auf dem Wildtyp-Allel lag (C_{WT}/G_{exp}) und solche, bei denen C auf dem expandierten Allel lag (G_{WT}/C_{exp}). Für die Kontrollprobanden konnte diese Entscheidung dementsprechend nicht getroffen werden.

Ähnlich zum SNP Bp 669 zeigte sich kein Unterschied zwischen den verschiedenen Varianten in Hinblick auf das AAO, den SARA- oder den INAS-Score (Abbildung 28a-c). Auch die TR-FRET-Messwerte zeigten keine signifikanten Unterschiede, weder bestimmt mit der Antikörperkombination mit MW1 noch mit 1C2 (Abbildung 28d-e).

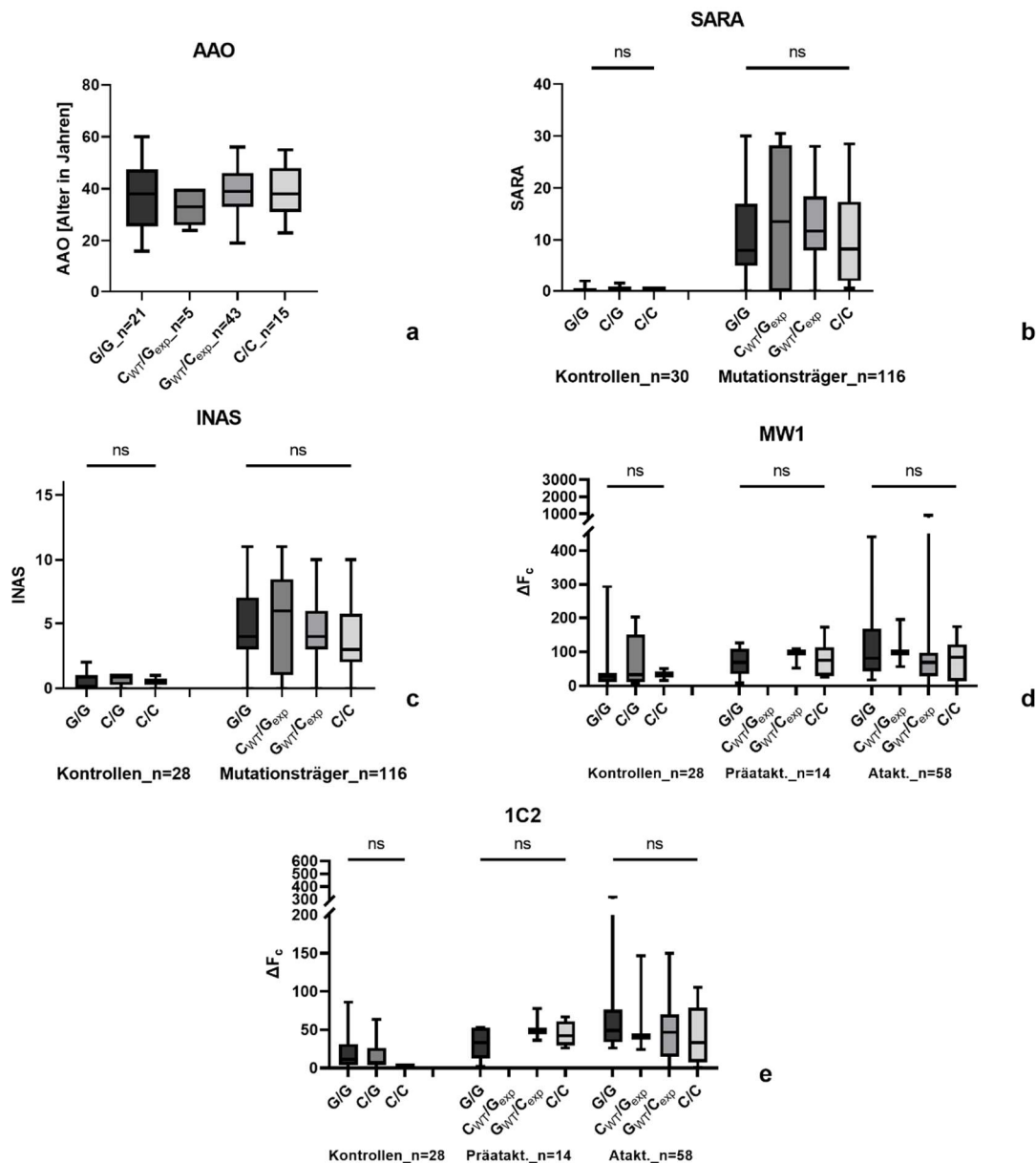


Abbildung 28: Analyse von anamnestischen Daten (AAO), klinischen Parametern (SARA- und INAS-Score) und laborchemisch bestimmten Größen (TR-FRET-Messwerte, bestimmt mittels der Antikörperkombination mit MW1 sowie mit 1C2) in Bezug auf die verschiedenen Ausprägungen des ATXN3-SNPs Bp 987. $\Delta F_c = \Delta F$ (% Signal über Hintergrund), korrigiert nach der Gesamtproteinkonzentration einer Probe, n = Anzahl der in die jeweilige Analyse eingeschlossenen Probanden bzw. Probanden pro Gruppe, Präatakt. = Mutationsträger mit SARA < 3, Atakt. = Mutationsträger mit ataktischer Symptomatik (SARA \geq 3), WT = Ausprägung auf dem Wildtyp-Allel, exp = Ausprägung auf dem expandierten Allel, AAO = Age At Onset, ns= nicht-signifikant, G/G / C/G / C_{WT}/G_{exp} / G_{WT}/C_{exp} / C/C = jeweilige Ausprägung des ATXN3-SNPs Bp 987. a: AAO, verglichen zwischen den Probanden, gruppiert nach SNP-Ausprägung. Es zeigen sich mittels Kruskal-Wallis-Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Einbezogen wurden in diese Analyse nur ataktische Mutationsträger, deren Ausprägung des Bp 987 auf beiden Allelen bestimmt werden konnte und deren AAO bekannt war. b: SARA-Score, verglichen zwischen den Probanden, aufgeteilt nach Kontrollen und Mutationsträgern und gruppiert nach SNP-Ausprägung. Es zeigten sich mittels Kruskal-Wallis-Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. c: INAS-Score, verglichen zwischen den Probanden, aufgeteilt nach Kontrollen und Mutationsträgern und gruppiert nach SNP-Ausprägung. Es zeigten sich mittels Kruskal-Wallis-Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. d: TR-FRET-

Messwerte, bestimmt mittels der Antikörperkombination mit MW1, verglichen zwischen den Probanden, aufgeteilt nach Kontrollen, präataktischen und ataktischen Mutationsträgern und gruppiert nach SNP-Ausprägung. Es zeigten sich mittels Kruskal-Wallis-Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. e: TR-FRET-Messwerte, bestimmt mittels der Antikörperkombination mit 1C2, verglichen zwischen den Probanden, aufgeteilt nach Kontrollen, präataktischen und ataktischen Mutationsträgern und gruppiert nach SNP-Ausprägung. Es zeigten sich mittels Kruskal-Wallis-Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

3.7.3 ATXN3-SNP Bp 1118

An Basenpaar 1118 in Exon 10 des ATXN3-Gens (rs7158733) liegt in etwa 81 % der allgemein beschriebenen Genanalysen die Base C vor, womit das entsprechende Triplet für Tyrosin kodiert. Liegt stattdessen die Base A vor, so kommt es zur Kodierung eines Stopp-Codons im Sinne einer *Nonsense*-Variante.

Die entsprechende Häufigkeit der beiden Ausprägungen in der ESMI-Kohorte ist graphisch in Abbildung 29 dargestellt. Auch hier erlaubte die Art der Analyse des SNPs (siehe Kapitel 2.2.8) die getrennte Analyse des Wildtyp- und des expandierten Allels bei Mutationsträgern, sodass eine Zuordnung der jeweiligen Ausprägung möglich war.

Es zeigt sich analog zur häufigeren Variante G des SNP Bp 987 hier ein häufigeres Vorkommen von C innerhalb der Gruppe der Kontrollprobanden und auf dem Wildtyp-Allel von Mutationsträgern. Im Gegensatz kommt auf dem expandierten Allel von Letzteren die Base A deutlich häufiger vor.

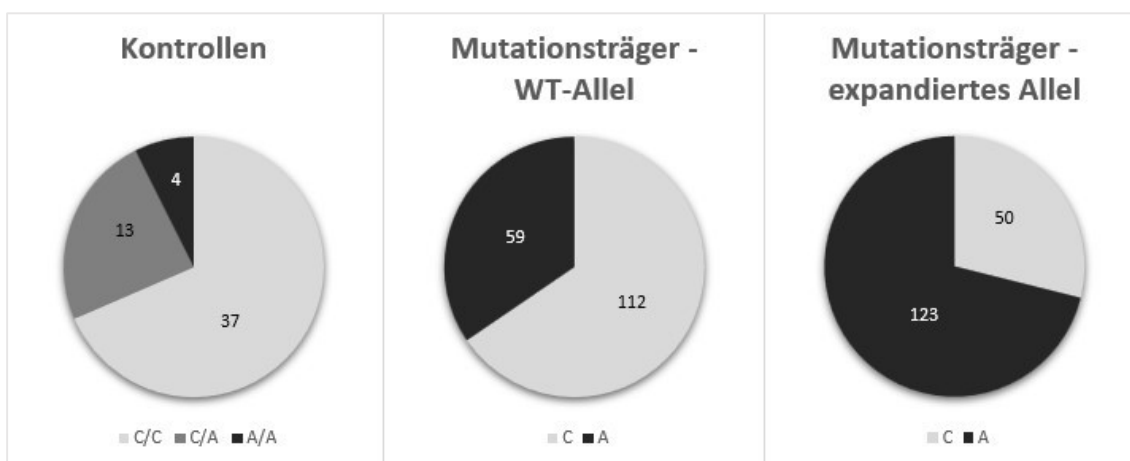


Abbildung 29: Vergleich des Vorkommens der verschiedenen Ausprägungen des ATXN3-SNPs Bp 1118 zwischen Kontrollen und Mutationsträgern. WT = Wildtyp. Für die Mutationsträger konnte durch die getrennte Analyse des Wildtyp- und des expandierten Allels eine Zuordnung der SNP-Ausprägung zum jeweiligen Allel erfolgen. Es zeigt sich ein gehäuftes Vorkommen der Base C (entweder in doppelter Ausprägung oder in Kombination mit der Base A) unter Kontrollen und auf dem Wildtyp-Allel von Mutationsträgern, während auf dem expandierten Allel die Base C häufiger vorkommt. Die Zahlen geben die Anzahl der Probanden mit der jeweiligen Ausprägung an.

Auch dieser SNP wurde in Bezug gesetzt zu dem AAO der ataktischen Mutationsträger, dem SARA- sowie dem INAS-Score und den TR-FRET-Messwerten. Vergleichbar mit dem SNP Bp 987 wurde für die Analysen bei der Ausprägung A/C unterschieden, ob A auf dem Wildtyp-Allel lag (A_{WT}/C_{exp}) oder auf dem expandierten Allel (C_{WT}/A_{exp}).

Auffällig war in diesem Fall ein signifikant niedrigeres AAO für die Probanden mit A_{WT}/C_{exp} im Vergleich zu solchen mit C_{WT}/A_{exp} ($p = 0,01$) und A/A ($p = 0,008$), bestimmt mit dem Mann-Whitney-Test, nachdem der Kruskal-Wallis-Test signifikante Unterschiede ($p = 0,04$) zwischen den Gruppen ergeben hatte (Abbildung 30a).

In Hinblick auf SARA- und INAS-Score sowie die TR-FRET-Messwerte zeigten sich dagegen keine signifikanten Unterschiede, wobei hier insbesondere für die Gruppe der präataktischen Mutationsträger die deutlich kleinere Gruppengröße zu beachten ist. Darüber hinaus lagen keine TR-FRET-Messwerte für präataktische Mutationsträger mit der Kombination A_{WT}/C_{exp} vor (Abbildung 30b-e).

Die Ergebnisse sind in Abbildung 30 graphisch dargestellt.

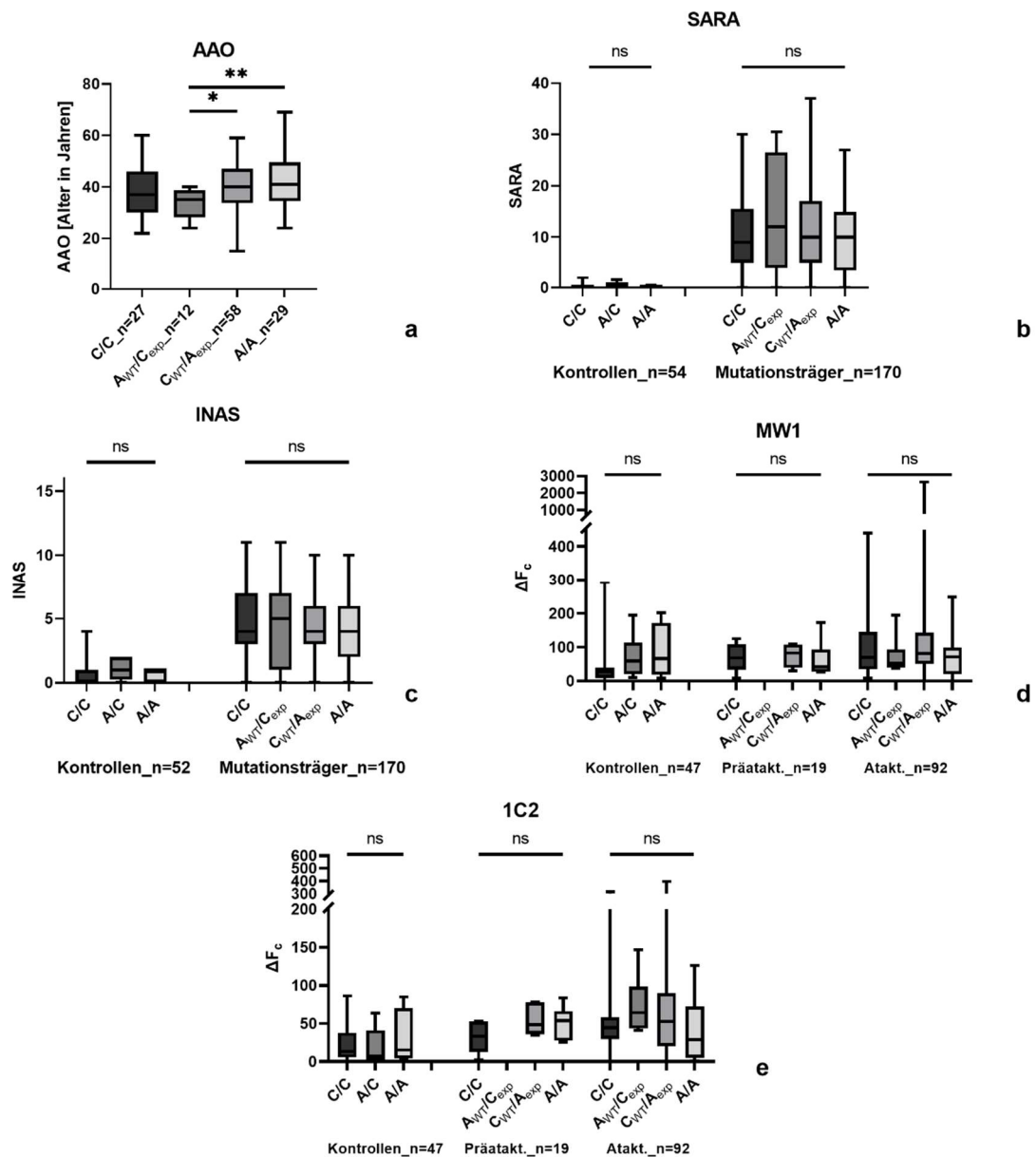


Abbildung 30: Analyse von anamnestischen Daten (AAO), klinischen Parametern (SARA- und INAS-Score) und laborchemisch bestimmten Größen (TR-FRET-Messwerte, bestimmt mittels der Antikörperkombination mit MW1 sowie mit 1C2) in Bezug auf die verschiedenen Ausprägungen des ATXN3-SNPS Bp 1118. $\Delta F_c = \Delta F$ (% Signal über Hintergrund), korrigiert nach der Gesamtproteinkonzentration einer Probe, n = Anzahl der in die jeweilige Analyse eingeschlossenen Probanden bzw. Probanden pro Gruppe, Präatakt. = Mutationsträger mit SARA < 3, Atakt. = Mutationsträger mit ataktischer Symptomatik (SARA \geq 3), WT = Ausprägung auf dem Wildtyp-Allel, exp = Ausprägung auf dem expandierten Allel, AAO = Age At Onset, ns= nicht-signifikant, * = signifikant mit $p < 0,05$, ** = signifikant mit $p < 0,01$, C/C / A/C / A_WT/C_exp / C_WT/A_exp / A/A = jeweilige Ausprägung des ATXN3-SNPS Bp 1118. a: AAO, verglichen zwischen den Probanden, gruppiert nach SNP-Ausprägung. Mittels Kruskal-Wallis-Test zeigen sich signifikante Unterschiede ($p = 0,04$) zwischen den verschiedenen Gruppen, sodass diese jeweils mit dem Mann-Whitney-Test miteinander verglichen wurden. Die hierbei berechneten Signifikanzniveaus sind graphisch dargestellt. b: SARA-Score, verglichen zwischen den Probanden, aufgeteilt nach Kontrollen und Mutationsträgern und gruppiert nach SNP-Ausprägung. Es zeigten sich mittels Kruskal-Wallis-Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. c: INAS-Score, verglichen zwischen den Probanden, aufgeteilt nach Kontrollen und Mutationsträgern und gruppiert nach SNP-Ausprägung. Es zeigten sich mittels Kruskal-Wallis-Test keine signifikanten

Unterschiede zwischen den Gruppen. d: TR-FRET-Messwerte, bestimmt mittels der Antikörperkombination mit MW1, verglichen zwischen den Probanden, aufgeteilt nach Kontrollen, präataktischen und ataktischen Mutationsträgern und gruppiert nach SNP-Ausprägung. Es zeigten sich mittels Kruskal-Wallis-Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. e: TR-FRET-Messwerte, bestimmt mittels der Antikörperkombination mit 1C2, verglichen zwischen den Probanden, aufgeteilt nach Kontrollen, präataktischen und ataktischen Mutationsträgern und gruppiert nach SNP-Ausprägung. Es zeigten sich mittels Kruskal-Wallis-Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

3.7.4 **PARK2-SNP Exon 4**

Es wurden zusätzlich zu den SNPs im *ATXN3*-Gen auch zwei SNPs im *PARK2*-Gen untersucht. Hierbei handelte es sich unter anderem um das Basenpaar 601 in Exon 4 (rs1801474), bei dem es sich in über 90 % der Fälle um ein G handelt. Die dadurch kodierte Aminosäure Serin ändert sich zu Asparagin, wenn stattdessen ein A vorliegt (*Missense*-Variante).

Dies war sowohl bei Kontrollen als auch bei Mutationsträgern innerhalb der ESMI-Kohorte nur selten der Fall. Es zeigte sich kein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Gruppierungen, wie auch in Abbildung 31 zu sehen ist.

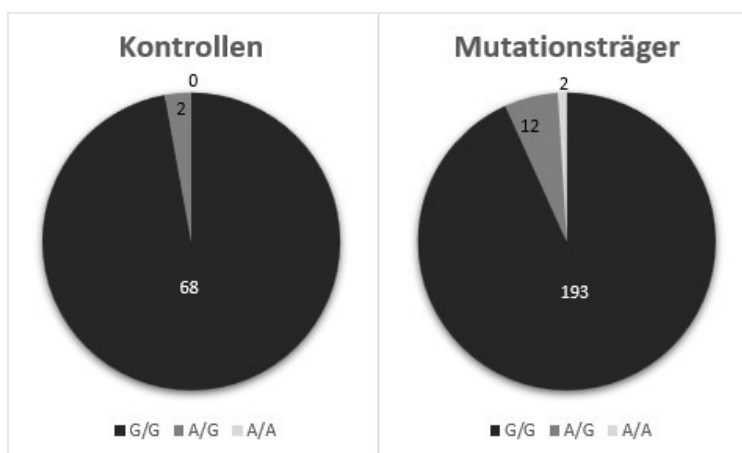


Abbildung 31: Vergleich des Vorkommens der verschiedenen Ausprägungen des *PARK2*-SNPs Exon 4 zwischen Kontrollen und Mutationsträgern. Es zeigt sich sowohl bei Kontrollen als auch bei Mutationsträgern ein deutliches Überwiegen der Kombination G/G. Die Base A wurde an dieser Stelle nur selten nachgewiesen. Die Zahlen geben die Anzahl der Probanden mit der jeweiligen Ausprägung an.

Die beschriebenen weiteren Analysen wurden auch für diesen SNP durchgeführt, dargestellt in Abbildung 32. Insgesamt ist die Qualität der Analysen hier durch die deutlich ungleiche Verteilung der verschiedenen Ausprägungen (siehe auch Abbildung 31) allerdings eingeschränkt. Es ergaben sich keine signifikanten

Unterschiede in Bezug auf das AAO unter den verschiedenen Gruppierungen (Abbildung 32a). Für die Betrachtung des SARA-Scores wurden die eingeschlossenen Datensätze aufgeteilt nach Probanden und Mutationsträgern. Da es unter den Kontrollprobanden keinen mit der Ausprägung A/A gab, konnte diese Untergruppe nicht mit in die Analysen einbezogen werden. Die Gruppen G/G sowie A/G wurden daher für die Kontrollen mittels Mann-Whitney-Test verglichen, wobei sich kein signifikanter Unterschied zeigte. Im Vergleich dazu gab es bei den Mutationsträgern signifikante Unterschiede ($p = 0,03$ im Kruskal-Wallis-Test), so dass die einzelnen Untergruppen miteinander verglichen wurden. Die Probanden mit G/G sowie mit A/A wiesen jeweils einen signifikant niedrigeren SARA-Score auf als die Probanden mit A/G ($p = 0,048$ bzw. respektive $p = 0,02$ im Mann-Whitney-Test, Abbildung 32b). Für den INAS-Score zeigten sich im Gegensatz dazu keine signifikanten Unterschiede. Da auch hier kein Proband die Ausprägung A/A zeigte, wurden die Analysen nach dem gleichen Schema durchgeführt (Abbildung 32c).

Für die TR-FRET-Messwerte lagen sowohl für die Antikörperkombination mit MW1 als auch mit 1C2 keine Messwerte für Kontrollprobanden sowie ataktische Mutationsträger mit der Kombination A/A und präataktische Mutationsträger mit der Kombination A/G vor. Daher wurden jeweils die beiden vorhandenen Untergruppen mittels Mann-Whitney-Test verglichen, wobei sich für die Kontrollprobanden sowie für die ataktischen Mutationsträger für beiden Antikörperkombinationen keine signifikanten Unterschiede zeigten. Da bei den präataktischen Mutationsträgern auch für die Probanden mit der Kombination A/A lediglich ein Wert vorlag, fand für diese Gruppe keine statistische Analyse statt (Abbildung 32d-e).

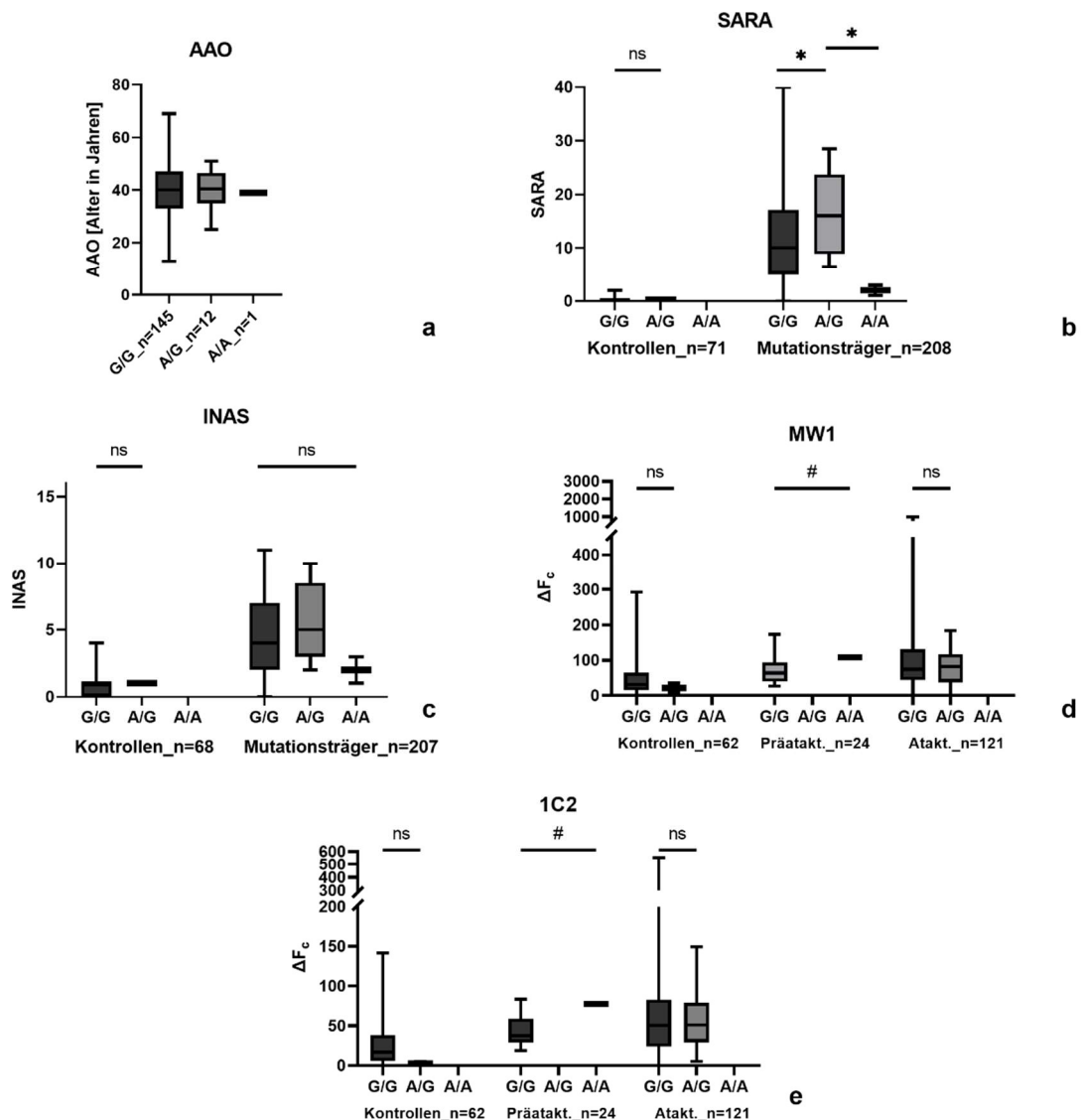


Abbildung 32: Analyse von anamnestischen Daten (AAO), klinischen Parametern (SARA- und INAS-Score) und laborchemisch bestimmten Größen (TR-FRET-Messwerte, bestimmt mittels der Antikörperkombination mit MW1 sowie mit 1C2) in Bezug auf die verschiedenen Ausprägungen des PARK2-SNP Exon 4. $\Delta F_c = \Delta F$ (% Signal über Hintergrund), korrigiert nach der Gesamtproteinkonzentration einer Probe, n = Anzahl der in die jeweilige Analyse eingeschlossenen Probanden bzw. Probanden pro Gruppe, Präatakt = Mutationsträger mit SARA < 3, Atakt = Mutationsträger mit ataktischer Symptomatik (SARA \geq 3), AAO = Age At Onset, ns= nicht-signifikant, * = signifikant mit $p < 0,05$, # = nicht analysiert, G/G / A/G / A/A = jeweilige Ausprägung des PARK2-SNPs Exon 4. a: AAO, verglichen zwischen den Probanden, gruppiert nach SNP-Ausprägung. Es zeigten sich mittels Kruskal-Wallis-Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. b: SARA-Score, verglichen zwischen den Probanden, aufgeteilt nach Kontrollen und Mutationsträgern und gruppiert nach SNP-Ausprägung. Der Vergleich für die beiden Untergruppen der Kontrollen wurde mittels Mann-Whitney-Test durchgeführt; hier zeigte kein Proband die Ausprägung A/A. Der SARA-Score der Gruppe der Mutationsträger mit A/G war signifikant höher verglichen mit G/G sowie A/A (*). c: INAS-Score, verglichen zwischen den Probanden, aufgeteilt nach Kontrollen und Mutationsträgern und gruppiert nach SNP-Ausprägung. Der Vergleich für die beiden Untergruppen der Kontrollen wurde mittels Mann-Whitney-Test durchgeführt; hier zeigte kein Proband die Ausprägung A/A. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. d: TR-FRET-Messwerte, bestimmt mittels der Antikörperkombination mit MW1, verglichen zwischen den Probanden, aufgeteilt nach Kontrollen, präataktischen und ataktischen Mutationsträgern und gruppiert nach SNP-Ausprägung. Der Vergleich für die beiden

Untergruppen der Kontrollen wurde mittels Mann-Whitney-Test durchgeführt; hier zeigte kein Proband die Ausprägung A/A. Für die Gruppe der präataktischen Mutationsträger wurde keine Analyse durchgeführt; hier zeigte kein Proband die Ausprägung A/G und lediglich einer die Ausprägung A/A. Der Vergleich für die beiden Untergruppen der ataktischen Mutationsträger wurde mittels Mann-Whitney-Test durchgeführt; hier zeigte kein Proband die Ausprägung A/A. Sofern bestimmt zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. e: TR-FRET-Messwerte, bestimmt mittels der Antikörperkombination mit 1C2, verglichen zwischen den Probanden, aufgeteilt nach Kontrollen, präataktischen und ataktischen Mutationsträgern und gruppiert nach SNP-Ausprägung. Analysen und Gruppengröße analog zu d. Sofern bestimmt zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

3.7.5 PARK2-SNP Exon 10

Der zweite untersuchte SNP im *PARK2*-Gen liegt bei Basenpaar 1239 in Exon 10 (rs1801582). Hier zeigt sich innerhalb bekannter Analysen in über 80 % der Fälle ein G. Das dadurch kodierte Valin wird im Sinne einer *Missense*-Variante durch Leucin ausgetauscht, wenn G durch C ersetzt wird. Dies war, wie in Abbildung 33 zu sehen ist, unter Kontrollprobanden und Mutationsträgern etwa gleich häufig der Fall.

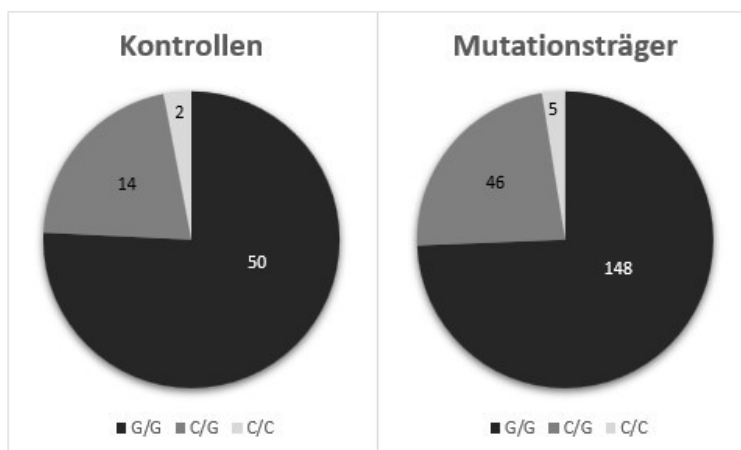


Abbildung 33: Vergleich des Vorkommens der verschiedenen Ausprägungen des *PARK2*-Exon 10 zwischen Kontrollen und Mutationsträgern. Es zeigt sich sowohl bei Kontrollen als auch bei Mutationsträgern ein Überwiegen der Kombination G/G. Die Zahlen geben die Anzahl der Probanden mit der jeweiligen Ausprägung an.

Es wurden ebenfalls, wie in Abbildung 34 gezeigt, mögliche Zusammenhänge mit anamnestischen, klinischen und laborchemischen Daten untersucht. Ähnlich wie für den SNP Exon 4 ist die Analyse auch hier durch stark unterschiedliche Gruppengrößen aufgrund des unterschiedlichen Vorkommens der jeweiligen Kombinationen beeinflusst (siehe auch Abbildung 33). Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Untergruppen mit jeweils unterschiedlicher SNP-

Ausprägung in Hinblick auf das AAO (Abbildung 34a), die klinischen Scores SARA und INAS (Abbildung 34b-c) sowie die im TR-FRET gemessenen Werte (Abbildung 34d-e).

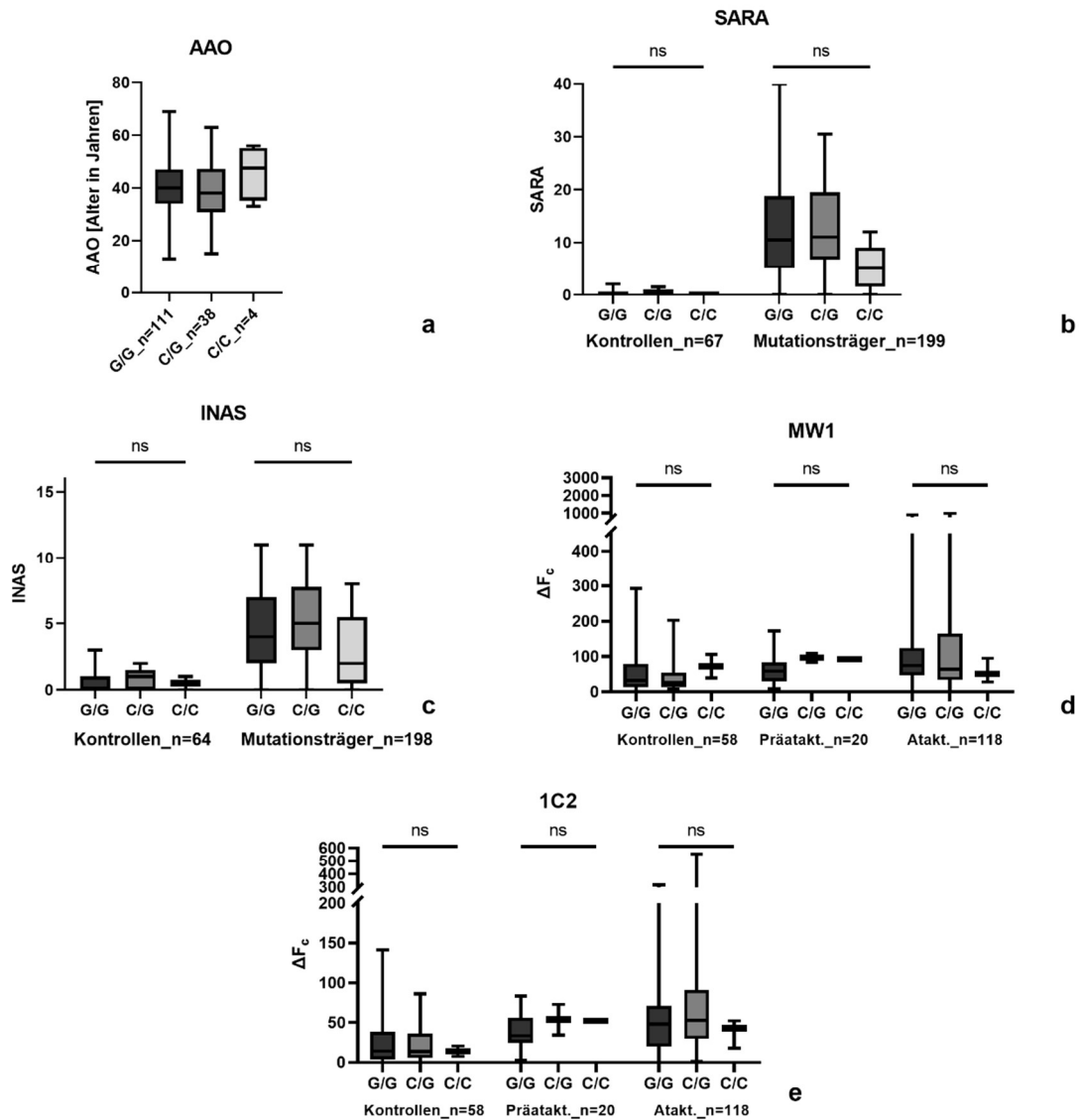


Abbildung 34: Analyse von anamnestischen Daten (AAO), klinischen Parametern (SARA- und INAS-Score) und laborchemisch bestimmten Größen (TR-FRET-Messwerte, bestimmt mittels der Antikörperkombination mit MW1 sowie mit 1C2) in Bezug auf die verschiedenen Ausprägungen des PARK2-SNPs Exon 10. $\Delta F_c = \Delta F$ (% Signal über Hintergrund), korrigiert nach der Gesamtproteinkonzentration einer Probe, n = Anzahl der in die jeweilige Analyse eingeschlossenen Probanden bzw. Probanden pro Gruppe, Präatakt. = Mutationsträger mit SARA < 3, Atakt. = Mutationsträger mit ataktischer Symptomatik (SARA \geq 3), AAO = Age At Onset, ns= nicht-signifikant, # = nicht analysiert, G/G / C/G / C/C = jeweilige Ausprägung des PARK2-SNPs Exon 10. a: AAO, verglichen zwischen den Probanden, gruppiert nach SNP-Ausprägung. Es zeigten sich mittels Kruskal-Wallis-Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. b: SARA-Score, verglichen zwischen den Probanden, aufgeteilt nach Kontrollen und Mutationsträgern und gruppiert nach SNP-Ausprägung. Es zeigten sich mittels Kruskal-Wallis-Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. c: INAS-Score,

verglichen zwischen den Probanden, aufgeteilt nach Kontrollen und Mutationsträgern und gruppiert nach SNP-Ausprägung. Es zeigten sich mittels Kruskal-Wallis-Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. d: TR-FRET-Messwerte, bestimmt mittels der Antikörperkombination mit MW1, verglichen zwischen den Probanden, aufgeteilt nach Kontrollen, präataktischen und ataktischen Mutationsträgern und gruppiert nach SNP-Ausprägung. Es zeigten sich mittels Kruskal-Wallis-Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. e: TR-FRET-Messwerte, bestimmt mittels der Antikörperkombination mit 1C2, verglichen zwischen den Probanden, aufgeteilt nach Kontrollen, präataktischen und ataktischen Mutationsträgern und gruppiert nach SNP-Ausprägung. Es zeigten sich mittels Kruskal-Wallis-Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Tabelle 58: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse des Kapitels Auswertung der Untersuchungen der SNP-Analysen. Beschrieben sind jeweils gesammelt die festgestellten Unterschiede in den untersuchten Daten für die jeweiligen SNPs. Untersucht wurden jeweils Unterschiede zwischen den SNP-Ausprägungen in Hinblick auf AAO, SARA, INAS, TR-FRET-Messung mittels der Antikörperkombination mit MW1 sowie 1C2. AAO = Age At Onset.

SNP	Ergebnis der Analyse
ATXN3-SNP Bp 669	Signifikanter Unterschied in den mittels der Kombination mit 1C2 gemessenen Ataxin-3-Konzentrationen (ΔF_c) zwischen ataktischen Mutationsträgern mit der Allelkombination A/G und A/A. Darüber hinaus keine signifikanten Unterschiede.
ATXN3-SNP Bp 987	Keine signifikanten Unterschiede.
ATXN3-SNP Bp 1118	Signifikant niedrigeres AAO bei Probanden mit der Allelkombination A_{WT}/C_{exp} im Vergleich mit C_{WT}/A_{exp} sowie A/A. Darüber hinaus keine signifikanten Unterschiede.
PARK2-SNP Exon 4	Signifikant höhere Werte im SARA-Score bei Mutationsträgern mit der Allelkombination A/G im Vergleich mit G/G sowie A/A. Darüber hinaus keine signifikanten Unterschiede. Teils keine Analyse möglich aufgrund geringer Größe der analysierten Gruppen.
PARK2-SNP Exon 10	Keine signifikanten Unterschiede.

4 Diskussion

Die Spinocerebelläre Ataxie Typ 3 ist eine neurodegenerative, autosomal dominant vererbte Erkrankung. Sie wird verursacht durch eine Expansion des CAG-*Repeats* auf dem langen Arm von Chromosom 14 (Kawaguchi et al., 1994). Die Erkrankung geht einher mit einer Varianz an Symptomen, unter anderem einer Ataxie, Dystonie, Dysarthrie, Spastiken, Dysphagie, auditiven und okulomotorischen Störungen sowie weiteren variablen Auffälligkeiten (Matos et al., 2011), bedingt durch den Verlust der neuronalen Integrität in verschiedenen Hirnregionen, insbesondere im Cerebellum und verschiedenen Arealen des Hirnstamms (Bettencourt & Lima, 2011).

Die Erkrankung beginnt üblicherweise in der dritten bis fünften Lebensdekade (McLoughlin et al., 2020) und bewirkt durch ihr Fortschreiten eine Limitation der Lebenserwartung sowie eine Einschränkung der Lebensqualität (Seidel et al., 2012). Es handelt sich mit einer Prävalenz von 0,3 bis 2,0 pro 100.000 Menschen (Bettencourt & Lima, 2011) um eine seltene genetische Erkrankung. Wie für viele andere seltene genetische Erkrankungen steht für die SCA3 zum aktuellen Zeitpunkt keine kurative Behandlung zur Verfügung. Zuletzt kam es zu zwei klinischen Studien, in denen eine Therapie mit *Antisense*-Oligonukleotiden gestartet wurde (clinicaltrial.gov, NCT05160558, NCT05822908). Eine davon wurde nach dem Start 2022 ein Jahr später, 2023, beendet, als der Sponsor dem Projekt die Unterstützung entzog (NCT05160558 (Biogen, 2023, S. 1)), eine zweite ist aktuell noch im Gang (NCT05822908 (Vico Therapeutics B. V., 2023)).

Für die Entwicklung, Erforschung und Zulassung von Therapien wird eine zuverlässige Möglichkeit zur Überwachung des Erkrankungsverlaufs und der -progression benötigt. Hierfür wurden in bisherigen Studien klinische Scores wie beispielsweise der SARA-Score oder NESSCA verwendet.

Im Zuge der Entwicklung von SARA^{home} wurde eine deutliche Schwankung des SARA-Scores im Tagesverlauf festgestellt (Grobe-Einsler et al., 2021), ohne, dass dahinter eine Systematik zu erkennen oder die Gründe dafür offensichtlich waren. Dies deckt Limitationen und Einschränkungen in der Zuverlässigkeit dieser Scores auf, auch bei zuvor beschriebener hoher Interrater-Reliabilität und hoher Test-Retest-Zuverlässigkeit (Bürk & Sival, 2018).

Für eine ausreichende Analysestärke und Aussagekraft werden bei der Verwendung einer Reduktion klinischer Scores als Zielgrößen daher hohe Patientenzahlen benötigt, um eine valide Aussage zu treffen. So ergab eine Untersuchung durch Saute et al., 2015, dass für Studien Patientenzahlen von mindestens 158 (NESSCA) beziehungsweise 328 (SARA) pro Arm benötigt werden, um einen Therapieeffekt mit ausreichender Sicherheit festzustellen. Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei der SCA3 um eine seltene Erkrankung handelt, ist es sehr schwierig, solche Patientenzahlen innerhalb eines kontrollierten Kollektivs mit ähnlichen Lebensumständen und -bedingungen zu erreichen. Daher ist es für die weitere therapeutische Forschung unabdingbar, sensitive Biomarker zu identifizieren und zu validieren.

Als ein möglicher Biomarker für den Krankheitsverlauf von SCA3 wurde hier in der Vergangenheit bereits die mittels TR-FRET gemessene Ataxin-3-Konzentration in PBMCs diskutiert (Gonsior et al., 2021). Nebenbei könnten hiermit möglicherweise insbesondere Therapien, die die Reduktion der Bildung des mutierten, expandierten Ataxin-3-Proteins als Ziel haben, in ihrem Erfolg überwacht werden.

Ähnliche Messmethoden und Strategien wurden bereits für Chorea Huntington entwickelt. Hierbei handelt es sich um eine weitere PolyQ-Erkrankung, bei der es aufgrund einer in einem anderen Gen und damit Protein gelegenen PolyQ-Expansion ebenfalls zu einer Vielzahl neurologischer Symptome kommt (The Huntington's Disease Collaborative Research Group, 1993).

Für die Validierung eines Biomarkers ist es essenziell, nicht mit dem Krankheitsprogress korrelierende Einflussfaktoren benennen und quantifizieren zu können. Hierfür sind zum einen Einflussfaktoren auf den gemessenen Marker relevant, zum anderen sollten in der Präanalytik und Analytik entstehende Veränderungen erkannt und eliminiert werden, um eine Standardisierung zu erreichen.

In Hinblick auf die Präanalytik gibt es zahlreiche patientenseitige Größen, die bekanntermaßen einen Einfluss auf diverse, häufig verwendete laborchemische

Parameter haben, weswegen auch ein Einfluss auf Ataxin-3 untersuchenswert erscheint, um mögliche Fehlerquellen auszuschließen.

So steht zum Beispiel der Zeitpunkt der letzten Nahrungsaufnahme eines Patienten immer wieder im Verdacht, einen Einfluss auf diverse gemessene Parameter zu haben. Dieser Zusammenhang ist zum Beispiel essenziell in der Diagnose eines Diabetes mellitus, wozu der nüchtern gemessene Blutglucosewert herangezogen wird (Harreiter & Roden, 2023). Lange Zeit wurde auch das Lipidprofil, bestimmt zur Evaluation des kardiovaskulären Risikos eines Patienten, stets nüchtern gemessen, da ein Einfluss durch den Hunger-Status oder fettthaltige Mahlzeiten vermutet wurde (Cohn et al., 1988). Diese Meinung wurde allerdings mittlerweile revidiert und entsprechende Messungen werden nicht mehr zwingend aus Blutentnahmen von nüchternen Patienten durchgeführt (Langsted et al., 2008; Langsted & Nordestgaard, 2019; Schaefer et al., 2001). Eine entsprechende Analyse und Betrachtung ist für eine standardisierte Messung daher wichtig. Auch im Rahmen von PolyQ-Erkrankungen ist ein Einfluss durch Nüchternheit bereits beschrieben worden: Ataxin-2 ist das Protein, das, wenn der darin enthaltene PolyQ-Trakt expandiert ist, die Spinocerebelläre Ataxie Typ 2 auslöst, die teils mit ähnlichen Symptomen wie die SCA3 einher geht (Lastres-Becker et al., 2008). Hier konnte ein Einfluss von Stressfaktoren, wie beispielsweise das Hungern, gezeigt werden (Carmo-Silva et al., 2017; Ostrowski et al., 2017). Da die Rolle von Ataxin-3 im physiologischen Stoffwechsel noch nicht vollständig verstanden ist (siehe auch Kapitel 1.2), kann ein Einfluss durch den Hungerstoffwechsel bisher nicht ausgeschlossen werden. So hat Hunger oder längeres Fasten einen nachgewiesenen Einfluss auf die Insulin- und Glucagon-Konzentration im Blut, was wiederum zelluläre Pfade im Zusammenhang mit dem Proteinmetabolismus, -auf- und -abbau beeinflusst (Al-Massadi et al., 2019; Bagger, 2017). Darüber hinaus kann längeres Fasten oder eine Restriktion der Kalorienzufuhr *Pathways* im Rahmen der Autophagie beeinflussen. Dies wurde auch für Zellen des zentralen Nervensystems bereits gezeigt (Alirezai et al., 2010). Hierdurch könnte zum einen der Abbau von Ataxin-3 beeinflusst werden, aber auch der Bedarf, da Ataxin-3 eine Rolle im Proteasom-*Pathway* und damit der Proteinregulation selbst spielt (Matos et al., 2011). Ein Einfluss von Insulin und Glucagon

auf bestimmte Ubiquitinierungsmuster wurde bereits beschrieben (Vemana & Dukhande, 2023), was einen möglichen Einfluss auf Ataxin-3 als deubiquitinierendes Enzym (Klockgether et al., 2019) ebenfalls in den Fokus rückt.

Im Rahmen der ESMI-Kohorte wurden die Proben bevorzugt nüchtern (letzte Nahrungsaufnahme länger als 8 Stunden her) abgenommen und der Zeitpunkt der letzten Nahrungsaufnahme dokumentiert (Santana et al., 2023). Es konnte im Rahmen dieser Dissertation kein eindeutiger, auf alle Gruppen anzuwendender Zusammenhang zwischen dem Zeitpunkt der letzten Nahrungsaufnahme und der in PBMCs gemessenen Ataxin-3-Konzentration gezeigt werden. Eine Ausnahme stellte ein signifikanter Unterschied in der Gruppe der Mutationsträger mit moderater ataktischer Symptomatik dar. Weitere Messungen und eine Analyse im Rahmen einer größeren Kohorte sind hier angeraten, da aufgrund der beschriebenen Degradation der Proben aus Brasilien ein Vergleich zwischen einer europäischen und brasilianischen Kohorte in dieser Dissertation nicht möglich war.

Ein weiterer möglicher Einflussfaktor auf diverse Körperfunktionen ist das biologische Geschlecht eines Patienten. Dieser präsentiert sich mit fortschreitender Forschung als komplexer und umfangreicher als man vermuten könnte. So spielen viele der im weiblichen Menstruationszyklus bereits lange bekannten und untersuchten Hormone wie FSH, LH und Östrogen auch eine Rolle in der Entwicklung und Funktion männlicher Geschlechtsorgane (Cooke et al., 2017). Dies unterstreicht, dass viele der physiologischen Funktionen, Interaktionen und Einflussfaktoren geschlechtsspezifischer Hormone und Mechanismen noch nicht vollständig verstanden sind und ein signifikanter Einfluss an unerwarteten Stellen der Fall sein kann. So wird zum Beispiel für die Verwendung von D-Dimeren zum Ausschluss von thromboembolischen Ereignissen beschrieben, dass das Ergebnis aussagekräftiger ist, wenn geschlechtsspezifische *Cut-Off*-Werte verwendet werden (Palareti et al., 2020). Im Rahmen der genetischen Erkrankungen ist ein Beispiel, bei dem ein geschlechtsspezifischer Einfluss offensichtlich erscheint, das Fragiles-X-Syndrom. Hierbei handelt es sich ebenfalls um eine durch die Expansion eines Triplets ausgelöste Erkrankung, die gonosomal vererbt wird. Hierdurch ergibt sich eine für Männer und Frauen unterschiedliche Inzidenz und

Ausprägung der Symptome (Reches, 2019). Im Gegensatz dazu ist SCA3 eine autosomal dominant vererbte Erkrankung, für die bisher keine intergeschlechtlichen Unterschiede beschrieben wurden. Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde kein eindeutiger Hinweis auf einen signifikanten Einfluss des biologischen Geschlechts auf die gemessene Ataxin-3-Konzentration gefunden. Lediglich für die mittels der Antikörperkombination mit 1C2 gemessenen Werte ergab sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Kontrollprobanden. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass es sich bei den gemessenen Werten aus der Antikörperkombination mit 1C2 bei Kontrollprobanden eher um ein unspezifisches oder Hintergrundsignal handeln sollte, da 1C2, wie in Kapitel 1.6 dargestellt, eine spezifische Bindung mit expandierten PolyQ-Strecken eingeht (Trottier et al., 1995). Dies sollte gegebenenfalls weiter untersucht und bestätigt werden.

Auch die Tageszeit, zu der eine Probe entnommen wurde, kann auf die Höhe mancher Parameter einen Einfluss haben, wenn diese im Körper einem circadianen Rhythmus unterliegen. So ist dies zum Beispiel für Cortisol bisher gut untersucht: Dieses unterliegt einem 24-Stunden-Rhythmus, beeinflusst durch Schlafrythmus und -menge eines Menschen (O'Byrne et al., 2021) mit Einfluss auf die Hirnfunktion, das autonome Nervensystem und das kardiovaskuläre System (Mohd Azmi et al., 2021). Als Teil der Stressantwort des Körpers ist es außerdem mitverantwortlich für die physiologische Anpassung an eine Änderung von Umgebungsfaktoren oder Lebensumständen (Russell & Lightman, 2019). Dies zeigt zum einen, dass eine physiologische Anpassung des Körpers an die Tageszeit besteht, die auch die Konzentration von Ataxin-3 in verschiedenen Zellen des Körpers beeinflussen könnte. Zum anderen ist nicht auszuschließen, dass auch Cortisol selbst hier eine Rolle spielt. Die Etablierung von SARA^{home} zeigte tagesformabhängige Schwankungen der in diesem Zusammenhang untersuchten Version des SARA-Scores (Grobe-Einsler et al., 2021). Dies könnte auch Hinweis auf Unterschiede in der Krankheitsaktivität je nach Tageszeit sein. Dem entgegen steht die Tatsache, dass es sich bei der SCA3 um eine chronisch progrediente Erkrankung handelt (Riess et al., 2008). Ein Zusammenhang zwischen zirkadianem Rhythmus und in diesem Zusammenhang auch Schlafdauer

und -rhythmus wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, auch, weil hierfür die benötigten anamnestischen Daten fehlten. Generell gab es die Empfehlung innerhalb der ESMI-Kohorte, Proben zwischen 8 und 12 Uhr morgens abzunehmen (Santana et al., 2023). Insgesamt gesehen ist die Tageszeit allerdings ein Faktor, der in der weiteren Etablierung in Erwägung gezogen werden sollte.

Ein Einflussfaktor, der bisher für viele Parameter nur unzureichend untersucht ist, ist der Einfluss durch die Ethnie eines Patienten. Naheliegender ist dieser Einfluss insbesondere für dermatologische Erkrankungen und deren diagnostische und therapeutische Besonderheiten (Taylor, 2002). Aber auch in weniger offensichtlichen Bereichen hat die Ethnie einen Einfluss. So wird zum Beispiel in der Berechnung der geschätzten glomerulären Filtrationsrate ein Anpassungsfaktor je nach Ethnie verwendet, wobei dies aktuell wieder zur Diskussion gestellt wird (Yap et al., 2021). Ob die Ethnie eines Patienten einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf oder die hier diskutierte Ataxin-3-Konzentration in PBMCs hat, ist daher ebenfalls zu untersuchen, zum Beispiel durch den Vergleich der beiden im Rahmen dieser Arbeit bereits abgebildeten Kohorten in Hinblick auf weitere anamnestische und klinische Daten.

Auch das Alter eines Patienten ist ein bekannter Einflussfaktor für verschiedene Laborparameter. So sind zum Beispiel für den Ausschluss einer Lungenembolie mittlerweile altersadaptierte Grenzwerte für die Messung der D-Dimere etabliert, welche die Rate an falsch-positiven Tests gesenkt haben (Iwuji et al., 2021). Eine Schwierigkeit der Analyse in Hinblick auf die Ataxin-3-Konzentration ist hierbei, dass ein höheres Alter bei Mutationsträgern meist automatisch mit einer längeren *Disease Duration* und, in den meisten Fällen, auch mit einem höheren SARA-Score einhergeht. Dennoch sollte dieser Faktor in weiteren Analysen bedacht und untersucht werden.

Darüber hinaus gibt es zahlreiche lebensstilabhängige Faktoren, die nicht nur einen Einfluss auf mögliche Folgeerkrankungen oder Komorbiditäten haben (die ihrerseits Einfluss ausüben können), sondern teils auch kurzfristig direkt als Einflussfaktor für Laborwerte definiert wurden, weswegen in diesen Fällen ein ausreichender Abstand zu Blutentnahmen empfohlen wird. So wurde zum Beispiel ein Effekt durch Nikotin auf freie Fettsäuren untersucht (Kershbaum et al., 1961),

exzessiver Sport erhöht die Konzentration der Kreatinkinase (Kemmler et al., 2015), und eine erhöhte Blutalkoholkonzentration ist im Zusammenhang mit der Veränderung weiterer laborchemischer Parameter wie Hämoglobin, Hämatokrit, der Anzahl weißer Blutkörperchen oder Kreatinin beschrieben worden (Kelley et al., 2021). Um diese Faktoren und einen möglichen Einfluss auf die Ataxin-3-Konzentration zu untersuchen sind gezielte Erhebungen der entsprechenden anamnestischen Parameter und eine Korrelation mit den gemessenen Werten notwendig. Darüber hinaus könnte in diesem Zusammenhang auch ein Einfluss dieser Faktoren, zum Beispiel eines langfristigen Alkohol- oder Nikotinkonsums, auf den Krankheitsverlauf untersucht werden, um in dieser Hinsicht eine gezielte Beratung für Mutationsträger anbieten zu können. An dieser Stelle wurden bisher keine signifikanten Zusammenhänge entdeckt (Hengel et al., 2022).

Auch ein eindeutiger Zusammenhang zwischen den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten SNPs und den gemessenen Ataxin-3-Konzentrationen konnte hier nicht eindeutig festgestellt werden, sodass eine genetische Untersuchung für die korrekte Einordnung der Messwerte aktuell nicht notwendig erscheint (siehe Kapitel 3.7). Bei einzelnen festgestellten signifikanten Korrelationen ist weitere Forschung allerdings notwendig.

Andere präanalytische Einflussfaktoren sind nicht patientenseitig zu beeinflussen, sondern bedürfen einer hochgradigen Standardisierung der Abnahme- und Transportbedingungen.

Dies beginnt mit der eigentlichen Blutabnahme. Hierfür wurde für ESMI ein hochstandardisiertes Protokoll entwickelt, das die Abnahme- und Verarbeitungsbedingungen festlegt. Es beschreibt hierfür sämtliche Schritte von der Punktion bis zur Asservierung der Proben im Detail und hält zum Beispiel notwendige Zentrifugationsschritte und Einfriertemperaturen fest (Santana et al., 2023). Dadurch wurde für die Entnahmen der Proben innerhalb der ESMI-Kohorte eine hohe Standardisierung erreicht, die auch auf zukünftige Probenentnahmen für ähnliche Zwecke angewendet werden kann und sollte, um ein möglichst hohes Maß an Vergleichbarkeit über alle an der Probensammlung beteiligten Zentren zu erreichen. Dazu trägt auch die Tatsache bei, dass die Messung der Ataxin-3-Konzentration in

PBMCs erfolgte. Dies erlaubt, im Vergleich zur Messung der Konzentration in Medien wie Liquor oder Nervengewebe, eine gering-invasive Gewinnung der Proben im Rahmen einer einfachen venösen Blutentnahme, die im Allgemeinen mit einem geringen Risiko verbunden ist und ebenfalls gut standardisiert werden kann (Ialongo & Bernardini, 2016).

Für die Gewinnung der PBMC-Proben aus dem abgenommenen Blut wurden im in Kapitel 2.2.11 dargestellten Protokoll *Cell preparation Tubes* (CPT) verwendet. Diese beinhalten ein Trennmedium, welches erlaubt, rote Blutzellen von den zu untersuchenden Zellen effektiv zu trennen (Puleo et al., 2017). Dies wurde speziell für PBMCs bereits mehrfach getestet und für effektiv befunden (Chen et al., 2020; Grievink et al., 2016; Linggi et al., 2023). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Vergleich zwischen Proben, die über eine gewisse Dauer in verschiedenen Probenentnahmeröhrchen gelagert wurden, durchgeführt. Hierbei zeigten sich zwischen den laut Protokoll für die Patientenproben verwendeten *CPT-Tubes*, sowie den ebenfalls getesteten CPDA-Röhrchen, welche in einem früheren EU Konsortium verwendet worden waren (NeurOMICS), teils vergleichbare, teils entgegengesetzte Dynamiken durch eine längere Lagerungszeit vor Weiterverarbeitung der Probe (siehe Kapitel 3.2.4.5). Generell ist für die in ESMI verwendeten *CPT-Tubes* eine Weiterverarbeitung der PBMC-Proben innerhalb von 48 Stunden nach Abnahme empfohlen (Linggi et al., 2023). Da die Weiterverarbeitung der Proben mit notwendigen Zentrifugationsschritten zur Trennung der verschiedenen Blutkomponenten einhergeht, sollte vor Abnahme das Vorhandensein der nötigen Zentrifugengeräte sichergestellt sein (Puleo et al., 2017; Santana et al., 2023). Da eine vergangene Studie in *CPT-Tubes* die insgesamt höchsten Messwerte zeigte (Gonsior et al., 2021), wurde im Weiteren dieses System verwendet. Bei der Gewinnung von PBMC-Proben mit dieser Methode kann es bei aller Vorsicht und Genauigkeit in der Arbeitsweise dennoch zu einer Verunreinigung der Proben durch zum Beispiel Erythrozyten kommen. Hämoglobin, welches in Erythrozyten vorhanden ist, ist einer von mehreren bekannten möglichen Absorbern von Fluoreszenzsignalen (Du Le et al., 2015), sodass eine solche Verunreinigung möglicherweise einen Einfluss auf die gemessenen Werte haben könnte. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Anwesenheit von Erythrozyten in den erhaltenen

Proben stets dokumentiert; diese war allerdings stets minimal und es wurde ohne statistische Analyse kein eindeutiger Zusammenhang mit besonders hohen oder niedrigen TR-FRET-Messwerten festgestellt. Insgesamt empfiehlt es sich dennoch, dies weitergehend zu untersuchen.

Im Anschluss an die Abnahme und Weiterverarbeitung ist laut Protokoll für die PBMC-Proben das Einfrieren bei -80 °C vorgesehen, wie es für Proben, die im Rahmen der Analyse von Proteinen verwendet werden sollen, an vielen Stellen üblich ist. Hierdurch soll die Stabilität über einen längeren Zeitraum hinweg gewährleistet werden. Teil davon ist auch, eine kohärente Kühlkette auf diesen Temperaturen während Transporten sicherzustellen, und diese zum Beispiel mit ausreichend Trockeneis zu versorgen, wodurch eine Temperatur von $-78,5\text{ °C}$, in manchen Fällen durch Sublimierung auch darunter liegend, erreicht werden kann (Mei et al., 2020). Dass eine unsachgemäße Behandlung der Proben während des Transports einen entscheidenden Einfluss auf die Material- und damit die Analysequalität haben kann, ist im Rahmen dieser Arbeit mit den aus Brasilien kommenden Proben dargestellt worden (siehe Kapitel 3.2.2). Neben der eigentlichen Lagerungstemperatur können allerdings auch wiederholte Frier-Auftau-Zyklen eine Probenbelastung darstellen und damit die Stabilität der zu untersuchenden Proteine beeinflussen (Deutscher, 2009; Simpson, 2010). Es empfiehlt sich daher, auch in den teils komplexen Pipettierprozessen der TR-FRET-Analysen, stets eine Abwägung zwischen erneutem Einfrieren und der kurzfristigen Aufbewahrung bei höheren Temperaturen zu treffen, gegebenenfalls mehrere Aliquots einer Probe herzustellen, und jeden notwendigen Auftau- oder Einfriervorgang möglichst schonend und schnell zu gestalten (Deutscher, 2009). Darüber hinaus sollte die Anzahl der Vorgänge dokumentiert werden, um dies in die Bewertung der Probenqualität einbeziehen zu können.

Dennoch sollten auch darüber hinaus weitere Maßnahmen ergriffen werden, um zu gewährleisten, dass die Proben intakt und analysiefähig bleiben. Dazu gehört unter anderem eine ausreichend hohe Konzentration an Protein in einer aufbewahrten Probe; hierfür wird generell eine Proteinkonzentration von mindestens 1 mg/ml empfohlen. Dadurch sollen unter anderem probenverändernde Einflüsse,

zum Beispiel durch Kontamination oder die Absorption von Oberflächen in Aufbewahrungsgefäßen, minimiert werden (Deutscher, 2009; Simpson, 2010). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Menge an benötigtem Lysepuffer für ein Zellpellet von dessen subjektiv empfundener Größe abhängig gemacht, wodurch in den meisten Fällen eine Proteinkonzentration von etwa 1 bis 10 mg/ml in den finalen Homogenaten erreicht wurde. Im Anschluss an die Messungen wurden entsprechende Proteinverdünnungen für die TR-FRET-Messung hergestellt und für die weiteren Untersuchungen bei -80 °C aufbewahrt. Diese waren aufgrund der technischen Besonderheiten des TR-FRETs in ihrer Konzentration unter den empfohlenen 1 mg/ml; aufgrund der Gefahr für die Probenqualität durch wiederholtes Auftauen und Einfrieren wurde dieses Vorgehen dennoch bevorzugt.

Neben den generellen *Best Practice*-Regeln im Umgang mit Proteinproben sind außerdem die Besonderheiten im Zusammenhang mit Ataxin-3 zu beachten. Es wurden unter anderem mehrere Isoformen des Proteins beschrieben, die durch alternatives Splicing sowie ein mögliches Stopp-Codon (siehe auch Kapitel 1.7.1) entstehen. Diese sind jeweils mit unterschiedlichen physiologischen und auch pathophysiologischen Eigenschaften ausgestattet (Weishäupl et al., 2019). Außerdem liegen im Rahmen der SCA3 sowohl Wildtyp- als auch expandierte Formen des Proteins vor; im Falle einer heterozygoten Mutation auch gleichzeitig. Im Rahmen dieser Arbeit zeigten sich bei den aus Brasilien stammenden, deutlich degradierten Proben insgesamt niedrigere Messwerte im TR-FRET bei Bestimmung mittels der Antikörperkombination mit 1C2 im Vergleich zu der mit MW1. Dies könnte verschiedene Ursachen haben. So erfasst MW1 ein größeres Spektrum an verschiedenen Glutaminlängen des Ataxin-3, welches auch, aber nicht nur die mutierte, expandierte Form beinhaltet (Ko et al., 2001), sodass sich hier generell höhere Werte ergeben könnten. Dies zeigt sich auch in den regulär gemessenen Proben der ESMI-Kohorte (siehe Kapitel 3.5). Allerdings gehen die Messwerte der Antikörperkombination mit 1C2 in den degradierten Proben fast vollständig gegen null, waren also so gut wie nicht mehr nachweisbar, was im Vergleich zu zwar geringen, aber gemessenen Werten der Kombination mit MW1 dennoch auffällig war. Hierdurch entsteht der Verdacht, dass expandiertes Ataxin-3 möglicherweise empfindlicher gegenüber den hier stattfindenden

Degradationsprozessen ist als das korrespondierende Wildtyp-Protein. Hier wurde allerdings in der Vergangenheit das Gegenteil gezeigt: In bisherigen Untersuchungen führte die PolyQ-Expansion zu einer Verlängerung der Halbwertszeit von Ataxin-3 (Weishäupl et al., 2019). Alternativ ist zu diskutieren, ob die unsachgemäße Behandlung der Proben während des Transports zu Veränderungen geführt hat, die das expandierte Ataxin-3 aus anderen Gründen nicht mehr zugänglich für die Messung mittels 1C2 macht. So ist der TR-FRET-Immunoassay in der hier durchgeführten Form zum Beispiel primär in der Lage, gelöstes Protein zu erkennen (Paganetti et al., 2009), sodass eine mögliche Ursache hierfür zum Beispiel eine Aggregatbildung sein könnte. Dies sollte weiterführend untersucht werden.

Insgesamt ist daher bei teils ungewissen Einflussfaktoren eine hohe Standardisierung der Transport- und Prozessierungsbedingungen unabdingbar.

Im Anschluss an eine standardisierte Probenentnahme unter Bedingungen, die möglichst viele der nicht-krankheitsspezifischen Einflussfaktoren eliminieren, steht die eigentliche Probenanalyse und Messung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Konzentration von Ataxin-3 in PBMCs mittels TR-FRET gemessen. Hierbei handelt es sich, wie in Kapitel 1.6 beschrieben, um eine mittlerweile gut etablierte, sensitive und einfache Methode mit dadurch hohem Durchsatz und einfacher Reproduzierbarkeit (Bidinosti et al., 2012). Dennoch sind Analysen von gewissen Fallstricken über die bereits beschriebenen bei der Vorbereitung hinaus begleitet.

Generell handelt es sich bei der Messung von Proteinkonzentrationen mittels TR-FRET in PolyQ-Erkrankungen um eine bereits etablierte Methodik. Besonders gut untersucht und bereits länger verwendet ist diese zum Beispiel im Zusammenhang mit Chorea Huntington (Paganetti et al., 2009). Auch hier wurde bereits das der Krankheit zugrundeliegende Protein, in diesem Fall Huntingtin, in PBMCs gemessen (Moscovitch-Lopatin et al., 2013). Hierdurch kann davon ausgegangen werden, dass die zelluläre Umgebung in PBMCs, zum Beispiel der dort vorhandene pH-Wert, sowie die ebenfalls dort ausgeprägten Proteine oder weitere Biomoleküle, die eventuell ein Signal beeinflussen könnten, mit der Messung

eines Zielproteins mittels TR-FRET kompatibel sind. Eine Übertragung der Methodik auf SCA3 lag daher nahe und ist bereits erfolgt und etabliert (Gonsior et al., 2021; Nguyen et al., 2013). Durch die bereits etablierte Methodik ergeben sich allerdings auch Hinweise auf mögliche Schwierigkeiten bei der Analyse sowie verschiedene Einflussfaktoren auf diese, die es zu beachten gilt.

Um möglichst aussagekräftige Messwerte in einer multizentrischen Studie zu erhalten, ist es für die Methodik des TR-FRET essentiell, passende Konzentrationen zwischen den einzelnen Antikörpern und den zu untersuchenden Proben zu wählen. Dies ist essentiell, da es bei zu hoch gewählten Konzentrationen der Antikörper durch ungebundene Moleküle zu einem erhöhten, unspezifischen Hintergrundsignal kommen kann, das die Messwerte verfälscht (Paganetti et al., 2009). Bei zu niedrig gewählten Antikörperkonzentrationen im Vergleich zur zu messenden Proteinmenge kann es ebenfalls zu fehlerhaften Messungen durch den sogenannten Hook-Effekt kommen (Ross et al., 2020). Wenn sich die an die Antikörper gebundenen Donor- und Akzeptorfluorophoren auf verschiedene Proteine verteilen, kommt es nicht zu einer Energieübertragung und damit auch nicht zu einem messbaren Signal. Insgesamt entstehen hierdurch daher falsch niedrige Messwerte. Dies könnte, wenn dieser Effekt nicht bedacht und damit nicht berücksichtigt wird, möglicherweise sogar den Einsatz weiterhin erhöhter Proteinkonzentrationen bewirken, wodurch ein sich selbst verstärkender Fehler entstehen könnte. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen wurden innerhalb der Arbeitsgruppe von Dr. med. Kathrin Gonsior und Dr. med. dent. Gabriele Anna Kaucher etabliert (Gonsior et al., 2021) und weitergegeben, sollten allerdings regelmäßig durch die Verwendung von Positivkontrollen gegenkontrolliert werden. Eine Verdünnungsreihe jeder Probe anzusetzen um die gemessenen Werte intern gegenzuprüfen war aufgrund der limitierten Probenmenge im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Dies sollte allerdings gegebenenfalls selektiv wiederholt werden, um insbesondere bei neu erhaltenen Antikörperaliquots eine zuverlässige Reproduzierbarkeit sicherzustellen. Insbesondere könnte dies eine Rolle spielen, wenn in einer Probe deutlich höhere spezifische Messwerte erwartet werden, zum Beispiel als Differenz zwischen Kontrollprobanden und Mutationsträgern.

Auch bei ausreichender Validierung der Messwerte gibt es darüber hinaus weitere mögliche Einflussfaktoren auf die TR-FRET-Messwerte, die im Folgenden betrachtet werden und im Rahmen dieser Arbeit so gut wie möglich eliminiert wurden.

So wurde eine von der Länge der PolyQ-Region abhängige Temperaturempfindlichkeit der TR-FRET-Messwerte für Huntingtin beschrieben (Cui et al., 2014). Hierbei zeigten sich die Messwerte bei einer Inkubationstemperatur von 4 °C höher als bei Raumtemperatur. Die Tatsache, dass es sich sowohl bei HD als auch bei SCA3 um PolyQ-Erkrankungen handelt, lässt einen ähnlichen Effekt für die Bestimmung von Ataxin-3 zumindest vermuten, auch wenn die Übertragbarkeit aufgrund der unterschiedlichen Proteinstruktur nicht selbstverständlich gegeben ist. Dies wurde im Rahmen der Dissertation von Dr. med. dent. Anna Gabriele Kaucher getestet. Hier zeigten sich höhere Messwerte bei einer Inkubation bei 4 °C im Vergleich zu Raumtemperatur und darüber hinaus stabilere Ergebnisse. Der Inkubationsschritt im Rahmen der Vorbereitung der Messung (siehe Kapitel 2.2.14) wurde daher im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls bei 4 °C durchgeführt.

In der Literatur gibt es bisher uneindeutige Antworten auf die Fragestellung, ob im Rahmen des TR-FRET-Immunoassays ein sogenannter Kanteneffekt vorliegt, ob also Proben, die am Rand der Platte liegen, grundsätzlich höhere oder niedrigere Messwerte aufweisen. Es wird sowohl beschrieben, dass weder ein Kanteneffekt, noch eine Varianz der Ergebnisse durch das Vertauschen von Wells festgestellt werden konnte (Bidinosti et al., 2012), als auch, widersprüchlich dazu, dass kleine, aber signifikante Kanteneffekte gefunden wurden (Paganetti et al., 2009). Untersuchungen von Dr. med. dent. Anna Gabriele Kaucher im Rahmen ihrer Doktorarbeit suggerieren, dass Plattenverteilungseffekte vor allem durch lange andauernde Pipettiervorgänge bei Raumtemperatur und damit unterschiedliche Inkubationszeiten entstehen. Es wurde daher für die hier durchgeführten Messungen stets die gesamte Platte für Messungen verwendet, und stattdessen ein Fokus auf möglichst kurze Pipettierzeiten gelegt und auf Eis pipettiert, um eine vorsichtige Kühlung während des Vorgangs zu gewährleisten.

An der Verarbeitung und Analyse der Proben der ESMI-Kohorte arbeiteten insgesamt 4 Doktorand*innen mit. Jede Probe wurde dabei einmalig als Duplikat gemessen; diese Messungen wurden allerdings zwischen den verschiedenen Doktorand*innen verteilt, sodass am Ende für jede Probe genau ein Messwert vorlag.

Bei Betrachtung der Ergebnisse zeigte sich eine so bisher nicht festgestellte Auffälligkeit: Wenn die Ergebnisse nach Untersucher*in gruppiert und analysiert wurden, waren die daraus gezogenen Schlüsse teils unterschiedlich. So ergab sich für manche Untersucher*innen ein signifikanter Unterschied zwischen den Messwerten von Kontrollprobanden, präataktischen und ataktischen Mutationsträgern, der sich, analysierte man lediglich die von anderen Untersucher*innen gemessenen Proben, nicht zeigte. Darüber hinaus stellten sich die Messwerte der Kontrollprobanden zwischen den verschiedenen Untersucher*innen teils signifikant unterschiedlich dar. Mögliche Ursachen für diese Unterschiede sind die Kohortenstärke, die Zusammensetzung der Kohorte oder der/die Untersuchende.

In Hinblick auf die Kohortenstärke gab es Unterschiede in der Anzahl der jeweils gemessenen Proben. So zeigten sich die dargestellten Gruppen teilweise halb beziehungsweise doppelt so groß, sodass bei teils kleinen Kohortengrößen die Aussagekraft der Analyse mit Vorsicht zu genießen ist. Ein Einfluss der Zusammensetzung der Kohorte in Hinblick auf das biologische Geschlecht erscheint zunächst unwahrscheinlich, da die Analysen im Rahmen dieser Arbeit keinen Hinweis auf eine geschlechtsspezifisch veränderte Konzentration der Ataxin-3-Messwerte ergaben, allerdings kann sie dennoch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Ein Einfluss durch zum Beispiel einen systematisch höheren SARA-Score erscheint insbesondere im Rahmen der Kontrollgruppe unwahrscheinlich, sollte allerdings für die Messungen innerhalb der ataktischen Mutationsträger in Erwägung gezogen werden.

Um einen Einfluss durch den/die Untersucher*in möglichst gering zu halten, wurde innerhalb der Arbeitsgruppe standardmäßig jede Probe als Duplikat Seite an Seite gemessen und der Mittelwert der beiden Messungen bestimmt. Darüber hinaus wurde die Abweichung der beiden Messungen zueinander berechnet und, wenn diese mehr als 10% betrug, ein signifikanter Pipettierfehler angenommen,

der zum Verwerfen des Messwertes und einer erneuten Bestimmung führte. Die Messmethoden wurden innerhalb der Arbeitsgruppe in detaillierten, standardisierten Protokollen festgehalten und es bestand stets ein enger Austausch über die exakte Durchführung, sodass systematische Unterschiede in den stattgefundenen Prozessen als so unwahrscheinlich wie möglich gesehen werden, auch wenn sie bei aller Vorsicht nie vollständig ausgeschlossen werden können. Es ist daher bei weiteren Untersuchungen eine maschinelle Automatisierung der Prozesse zu empfehlen, um damit einhergehend eine höhere Präzision der hochsensitiven Methode zu erreichen.

Darüber hinaus könnten weitere, bisher noch nicht bedachte Einflussfaktoren eine Rolle spielen, die nur durch weiteren Austausch, regelmäßige Analysen und ein andauerndes kritisches Hinterfragen des eigenen Tuns erkannt und behoben werden können. Dies hebt außerdem die Wichtigkeit eines effizienten und zuverlässigen Datenmanagements in groß angelegten Projekten, an denen mehrere Menschen gleichzeitig und / oder nacheinander arbeiten, hervor.

In Abbildung 35 wird zusammenfassend dargestellt, welche Einflussfaktoren im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden und ob sich hier ein statistisch signifikanter Einfluss dargestellt hat.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwar signifikante Unterschiede in der mittels TR-FRET in PBMCs gemessenen Ataxin-3-Konzentration zwischen Kontrollprobanden und Mutationsträgern festgestellt; es gelang allerdings nicht, einen klaren Zusammenhang zu klinischen Parametern herzustellen. Einflussfaktoren, die einen möglicherweise doch vorhandenen Zusammenhang suggerieren oder verschleiern könnten, wurden daher diskutiert und teils erstmalig systematisch untersucht. Eindeutige Einflüsse in eine bestimmte Richtung durch den Zeitpunkt der letzten Nahrungsaufnahme oder das biologische Geschlecht der Probanden, sowie genetische Faktoren oder die Tageszeit, zu der die Messung stattfand, konnten allerdings nicht nachgewiesen werden; vielmehr suggerieren Analysen eine Empfindlichkeit der Messergebnisse auf weitere, bisher noch nicht erkannte Faktoren. Hier sollten weitere Analysen und gegebenenfalls systematische

Mehrfachmessungen durchgeführt werden, um mögliche Einflüsse sicher festzustellen und zu validieren.

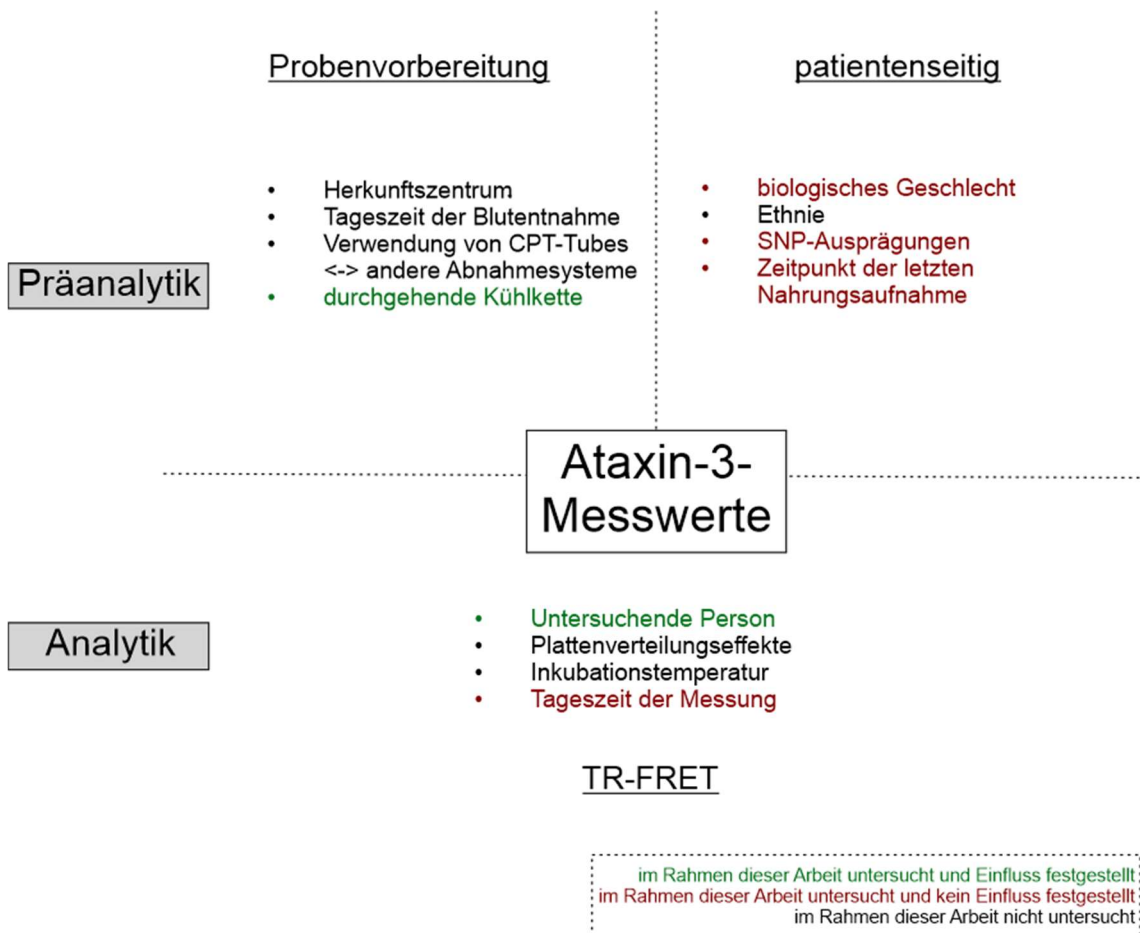


Abbildung 35: Zusammenfassende Darstellung der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Einflussfaktoren auf die TR-FRET-Messwerte. Dargestellt sind darüber hinaus mögliche weitere Einflussfaktoren, die entweder im Rahmen anderer Studien bereits untersucht wurden oder für eine Validierung des Biomarkers weitergehend erforscht werden sollten.

Darüber hinaus sollten weitere Möglichkeiten der Messung oder Alternativen für einen Biomarker diskutiert werden.

Wie bereits erläutert, liegt Ataxin-3 im menschlichen Körper in verschiedenen Isoformen vor, mit jeweils unterschiedlichen physiologischen und pathophysiologischen Eigenschaften (Weishäupl et al., 2019). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass verschiedene Transkripte im Gewebe des Cerebellums in anderen Konzentrationen vorkommen als in Blutzellen oder teils überhaupt nicht oder nur in einem Teil der untersuchten Probanden nachgewiesen werden können (Raposo et al., 2023). Dies wirft die Fragestellung auf, ob die

Bestimmung der Ataxin-3-Konzentration in einem anderen Gewebe als PBMCs möglicherweise aussagekräftiger ist. Dieser Versuch wurde für die TR-FRET-Messung bereits durchgeführt; hierbei konnte in Plasma und Liquor aufgrund zu niedriger Ataxin-3-Konzentrationen kein Protein nachgewiesen werden. In Fibroblasten, induzierten pluripotenten Stammzellen und Hirngewebe gelang mittels des hier durchgeführten TR-FRETs ein Proteinnachweis (Gonsior et al., 2021). Insbesondere letzteres ist dabei aber auf eine Verfügbarkeit *post mortem* beschränkt, sodass es sich für die Diskussion als Biomarker nicht eignet. Für die Messung in Liquor wird eine sensitivere Methode als der TR-FRET benötigt. In dieser Hinsicht hat sich für andere Zwecke zunehmend eine Analyse mittels *Single Molecule Arrays* (Simoa) etabliert; eine Methode, mit der Probenkonzentrationen bis zu 14 fg/ml nachgewiesen werden können (Rissin et al., 2010). Eine weitere Alternative stellt die Singulex-Methode dar, eine Einzelmolekül-Zähltechnologie (single molecule counting, SMC), mit der ebenfalls sehr geringe Proteinmengen nachgewiesen werden können. Hiermit konnte bereits ein quantitativer Nachweis von Ataxin-3 in Liquor und Plasma erzielt, sowie eine Korrelation mit klinischen Parametern festgestellt werden. Eine Schwierigkeit bei Liquor im Vergleich zu Plasma stellt allerdings dennoch die erhöhte Invasivität der Probengewinnung im Vergleich zu einer venösen Blutentnahme dar, was insbesondere bei zunehmend schwer kranken Patienten eine idealerweise zu vermeidende Belastung bedeutet. Allerdings haben die zuvor diskutierten und untersuchten Einflussfaktoren auch für alternative Untersuchungsmethoden eine Relevanz und sollten daher in mögliche Überlegungen mit einbezogen sowie die hier erzielten Ergebnisse auf Übertragbarkeit überprüft werden.

Ein alternativer, viel versprechender Biomarker stellt, wie bereits in Kapitel 1.4 erläutert, NfL dar. Im Falle von axonalen Schäden, zum Beispiel im Rahmen einer neurologischen Erkrankung, kommt es zu einem Anstieg der NfL-Konzentration im Liquor (Gaetani et al., 2019). Eine Korrelation der Liquor- und Serumkonzentration von NfL konnte bereits nachgewiesen werden (Khalil et al., 2018, 2020), was für eine geringere Invasivität der nötigen Untersuchung spricht. Da es sich bei Ataxin-3 um eine neurodegenerative Erkrankung handelt, wird die NfL-

Konzentration im Plasma auch in diesem Rahmen bereits diskutiert und untersucht. Bisher zeigten sich Unterschiede in der gemessenen Konzentration zwischen Mutationsträgern und Kontrollen sowie präataktischen Mutationsträgern und Kontrollen, und darüber hinaus eine Korrelation mit klinischen Parametern wie dem SARA-Score (Faber et al., 2023; Garcia-Moreno et al., 2022; Q.-F. Li et al., 2019). Wie bereits in Kapitel 1.4 dargestellt wurde darüber hinaus eine mögliche Vorhersagekraft für das Ausmaß des Volumenverlusts im Cerebellum und einer Verschlechterung klinischer Scores durch die Plasma-NfL-Konzentration untersucht und festgestellt (Coarelli et al., 2021; Q.-F. Li et al., 2019). Allerdings weist auch dieser, bisher vielversprechende Biomarker bereits bekannte Limitationen auf. Zum einen ist NfL ein Marker axonaler Degeneration und damit nicht krankheitsspezifisch (Yang et al., 2022), was die zunehmende Entdeckung und der Versuch der Nutzbarmachung für eine Vielzahl neurologischer Erkrankungen erklärt. Im Falle von Komorbiditäten käme es hierbei daher zu deutlichen Einschränkungen der Nutzung, und auch zur Stellung von Erstdiagnosen ist NfL damit nicht geeignet. Weitere Einflussfaktoren, zum Beispiel durch den *Body Mass Index* (BMI), das Alter der Probanden und deren Gesamtmenge an Blut ist bereits vorbeschrieben worden (Yang et al., 2022). Die vielfache mögliche Nutzbarkeit ist an dieser Stelle allerdings ein Vorteil und eröffnet ein deutliches größeres Probandenfeld zur Untersuchung weiterer möglicher Einflüsse in der Präanalytik und Analytik; etwas, was für Ataxin-3 durch die Seltenheit der Erkrankung limitiert ist.

Bisher ergibt sich weder im Rahmen dieser Arbeit noch aus den hier zitierten Untersuchungen und Studien genau ein umfassender, allzeit gültiger Biomarker für die SCA3. Bereits länger ist auch beschrieben, dass die Konzentration von löslichem mutiertem Ataxin-3 mit Fortschreiten der Erkrankung abnimmt (Nguyen et al., 2013). Bisherige Untersuchungen suggerieren daher die Notwendigkeit einer Stadien-abhängigen Betrachtung und Analyse möglicher Biomarker (Faber et al., 2023).

Zu guter Letzt muss bei jedem in der Forschung befindlichen Biomarker die Frage gestellt werden, ob es sich hierbei um einen Marker handelt, der tatsächlich eine klinische Relevanz darstellt, oder lediglich ein laborchemisches Phänomen ohne

Einfluss auf das Wohlbefinden eines Patienten. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, in dem sämtliche Parameter mit dem SARA-Score, der die ataktische Symptomatik eines Patienten erfasst (Schmitz-Hübsch et al., 2006), korreliert wurden. Darüber hinaus ist es möglich, dass Patienten unter einzelnen der dort festgestellten Symptome mehr oder weniger leiden können und der Score keine Faktoren der subjektiven Lebensqualität berücksichtigt. So wurde bereits festgestellt, dass in einer nicht zu vernachlässigenden Anzahl der Fälle der objektiv bestimmte SARA-Score nicht mit dem übereinstimmt, was von Patienten als am Hinderlichsten an ihrer Erkrankung empfunden wird (Maas & van de Warrenburg, 2021), sodass hinterfragt werden sollte, ob eine Verbesserung des SARA-Scores beziehungsweise eines dadurch validierten und bestimmten Biomarkers mit einer Verbesserung von patientenseitig relevanten Faktoren einhergeht.

Die Gültigkeit und Validierung eines Biomarkers ergibt sich damit abhängig daraus, wofür er verwendet werden soll. Die Untersuchung einer möglichen Erkrankungsprogression könnte sich auf Marker wie das hier untersuchte Ataxin-3 sowie NfL berufen und klinische Scores mit einbeziehen. Eine Erstdiagnose dagegen kann über den Nachweis der Expansion des *CAG-Repeat*-Trakts erfolgen, wobei diese nur einen Hinweis auf den Erkrankungsbeginn und -verlauf geben kann und nicht über mögliche Zusatzsymptome. Für Eintreten und Verlauf der Erkrankung können möglicherweise NfL oder die diskutierte Bildgebung hinweisgebend sein, sowie genetische Faktoren eine Rolle spielen. Für die Überwachung möglicher Therapien können daher je nach Therapieziel verschiedene Marker eine Rolle spielen – von der Messung von NfL oder bildgebenden Verfahren für die Beurteilung des Absterbens von Neuronen bis hin zur Messung der Ataxin-3-Konzentration, sollte das Ziel darin liegen, die Menge an Ataxin-3 zu reduzieren. Zur Beurteilung der sinnvollen Zielgrößen ist dabei ebenfalls noch weitere Forschung nötig, um eine Signifikanz für den Krankheitsverlauf sowie eine mögliche Vorhersagekraft adäquat zu beurteilen.

5 Zusammenfassung

Bei der Spinocerebellären Ataxie Typ 3 (SCA3) handelt es sich um eine seltene neurodegenerative Erkrankung, die autosomal dominant vererbt wird. Sie wird ausgelöst durch die Expansion eines *CAG-Repeats* im *ATXN3*-Gen, wodurch es zu einer Expansion eines Polyglutamintrakts im korrespondierenden Ataxin-3-Protein kommt. Der genaue Pathomechanismus ist aktuell noch Gegenstand weiterer Forschung. Klinisch geht die SCA3 einher mit einer Varianz an neurologischen Symptomen, insbesondere einer progredienten Ataxie.

Bisher existiert keine kurative Therapieoption für die SCA3; bisherige Therapieansätze konzentrieren sich auf eine Linderung der Symptome und den Versuch, den Krankheitsprogress zu verringern. Aufgrund des progredienten Verlaufs mit einer hohen Einschränkung der Lebensqualität und einer Verkürzung der Lebenserwartung ist eine kurative Therapie weiterhin Ziel der aktuellen Forschung. Hierfür sind adäquate, präzise und objektive Biomarker erforderlich, um eine Überwachung des Krankheitsverlaufs und -fortschreitens und damit eine Beurteilung einer möglichen Therapiewirksamkeit zu ermöglichen. In bisherigen klinischen Forschungsreihen wurden hierfür zum Beispiel klinische Scores wie der SARA-Score verwendet. Dieser ist allerdings tagesformabhängig und benötigt, wenn er als Endpunkt einer Studie verwendet wird, eine hohe Anzahl an Teilnehmern, um ein signifikantes Ergebnis zu erzielen, was aufgrund der Seltenheit der zugrunde liegenden Erkrankung ein Problem im Studiendesign und der -durchführung darstellt.

Es wird daher nach alternativen Biomarkern für die SCA3 gesucht. Hierfür ist bereits seit längerem die in mononukleären Zellen des peripheren Bluts (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) gemessene Ataxin-3-Konzentration im Gespräch. Für diese existiert ein etablierter TR-FRET-Immunoassay, eine hochsensitive Methode zur Bestimmung der Menge spezifischer Proteine mittels Anregung und Messung von Fluoreszenzsignalen, der auch im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde. Verwendet wurden PBMC- und DNA-Proben aus zwei bereits beschriebenen SCA3-Kohorten: Eine wurde im Rahmen des ESMI-Projekts innerhalb von Europa rekrutiert, die zweite im Rahmen der BIGPRO-Studie in Brasilien.

Für die Etablierung eines Biomarkers ist die Kenntnis weiterer beeinflussender Faktoren neben der angestrebten Zielgröße essentiell. Daher wurden im Rahmen der Evaluation der Ataxin-3-Konzentration als Biomarker für die SCA3 in dieser Arbeit verschiedene Einflussfaktoren untersucht. Hierzu gehörten verschiedene für andere Biomarker und laborchemische Größen bereits als relevant identifizierte Einflussfaktoren. Auf Patientenseite betrachtet wurde das biologische Geschlecht, der Zeitpunkt der letzten Nahrungsaufnahme, sowie verschiedene im Zusammenhang mit SCA3 als relevant beschriebene Polymorphismen (SNPs). Da die Proben der BIGPRO-Kohorte aus Brasilien kamen und aufgrund des Zustands, in dem sie in unserem Labor eintrafen, berechnete Zweifel an der Einhaltung der Kühlkette während des Transports bestanden, konnte im Rahmen der Präanalytik auch dieser Einflussfaktor und damit die Wichtigkeit einer einheitlichen Probenverarbeitung und -aufbereitung beurteilt werden. Zu guter Letzt wurden Einflussfaktoren der Analytik, namentlich die Tageszeit, zu der die Messung durchgeführt wurde, sowie ein möglicher Einfluss durch die Person, die die Messung durchführte, untersucht.

Unter diesen Analysen zeigte sich ein signifikanter Einfluss durch die Person, die die Messung durchführte, sowie ein Einfluss durch die nicht eingehaltene Kühlkette im Rahmen des Transports, die zu einer Nicht-Beurteilbarkeit der Proben der BIGPRO-Kohorte führte. Die übrigen untersuchten Faktoren zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die gemessenen Ataxin-3-Konzentrationen. Darüber hinaus zeigten sich in den Analysen die Korrelationen zwischen den Ataxin-3-Messwerten und zur Etablierung herangezogenen klinischen Parametern begrenzt, während es signifikante Unterschiede zwischen erkrankten Mutationsträgern und gesunden Kontrollprobanden gab.

Es empfiehlt sich daher, die Wahl des Biomarkers von der Zielfragestellung abhängig zu machen und die Untersuchung der hier betrachteten möglichen Einflussfaktoren für andere, aktuell im Gespräch befindliche Biomarker wie bildgebende Verfahren oder die Konzentration von Neurofilament-Leichtketten in Blut und Liquor fortzuführen.

Literaturverzeichnis

- 1000 Genomes Project Consortium, Auton, A., Brooks, L. D., Durbin, R. M., Garrison, E. P., Kang, H. M., Korbel, J. O., Marchini, J. L., McCarthy, S., McVean, G. A., & Abecasis, G. R. (2015). A global reference for human genetic variation. *Nature*, *526*(7571), 68–74. <https://doi.org/10.1038/nature15393>
- Aamodt, W. W., Waligorska, T., Shen, J., Tropea, T. F., Siderowf, A., Weintraub, D., Grossman, M., Irwin, D., Wolk, D. A., Xie, S. X., Trojanowski, J. Q., Shaw, L. M., & Chen-Plotkin, A. S. (2021). Neurofilament Light Chain as a Biomarker for Cognitive Decline in Parkinson Disease. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, *36*(12), 2945–2950. <https://doi.org/10.1002/mds.28779>
- Alirezai, M., Kembal, C. C., Flynn, C. T., Wood, M. R., Whitton, J. L., & Kiosses, W. B. (2010). Short-term fasting induces profound neuronal autophagy. *Autophagy*, *6*(6), 702–710. <https://doi.org/10.4161/auto.6.6.12376>
- Al-Massadi, O., Fernø, J., Diéguez, C., Nogueiras, R., & Quiñones, M. (2019). Glucagon Control on Food Intake and Energy Balance. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(16), 3905. <https://doi.org/10.3390/ijms20163905>
- Ashizawa, T., Öz, G., & Paulson, H. L. (2018). Spinocerebellar ataxias: Prospects and challenges for therapy development. *Nature Reviews. Neurology*, *14*(10), 590–605. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0051-6>
- Bagger, J. I. (2017). Physiological and pathophysiological aspects of incretin hormones and glucagon. *Danish Medical Journal*, *64*(1), B5331.
- Bettencourt, C., & Lima, M. (2011). Machado-Joseph Disease: From first descriptions to new perspectives. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *6*, 35. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-6-35>
- Bichelmeier, U., Schmidt, T., Hübener, J., Boy, J., Rüttiger, L., Häbig, K., Poths, S., Bonin, M., Knipper, M., Schmidt, W. J., Wilbertz, J., Wolburg, H., Laccone, F., & Riess, O. (2007). Nuclear localization of ataxin-3 is required for the manifestation of symptoms in SCA3: In vivo evidence. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *27*(28), 7418–7428. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4540-06.2007>
- Bidinosti, M., Shimshek, D. R., Mollenhauer, B., Marcellin, D., Schweizer, T., Lotz, G. P., Schlossmacher, M. G., & Weiss, A. (2012). Novel one-step immunoassays to quantify α -synuclein: Applications for biomarker development and high-throughput screening. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(40), 33691–33705. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.379792>
- Bigpro study. (2024, Februar 21). *Bigpro*. <https://bigpro.webnode.page/>
- Biogen. (2023). *A Phase 1, Blinded, Randomized, Placebo-controlled Study to Investigate the Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of Multiple Ascending Doses of BII132 Administered Intrathecally to Adults With Spinocerebellar Ataxia 3* (Clinical trial registration NCT05160558). [clinicaltrials.gov. https://clinicaltrials.gov/study/NCT05160558](https://clinicaltrials.gov/study/NCT05160558)

- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 248–254.
- Buijsen, R. A. M., Toonen, L. J. A., Gardiner, S. L., & van Roon-Mom, W. M. C. (2019). Genetics, Mechanisms, and Therapeutic Progress in Polyglutamine Spinocerebellar Ataxias. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental Neurotherapeutics*, 16(2), 263–286. <https://doi.org/10.1007/s13311-018-00696-y>
- Bürk, K., & Sival, D. A. (2018). Scales for the clinical evaluation of cerebellar disorders. *Handbook of Clinical Neurology*, 154, 329–339. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63956-1.00020-5>
- Burnette, W. N. (1981). „Western blotting“: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate—Polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*, 112(2), 195–203. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90281-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90281-5)
- Carmo-Silva, S., Nobrega, C., Pereira de Almeida, L., & Cavadas, C. (2017). Unraveling the Role of Ataxin-2 in Metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 28(4), 309–318. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.12.006>
- Chen, H., Schürch, C. M., Noble, K., Kim, K., Krutzik, P. O., O'Donnell, E., Vander Tuig, J., Nolan, G. P., & McIlwain, D. R. (2020). Functional comparison of PBMCs isolated by Cell Preparation Tubes (CPT) vs. Lymphoprep Tubes. *BMC Immunology*, 21(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s12865-020-00345-0>
- Claassen, D. O., Corey-Bloom, J., Dorsey, E. R., Edmondson, M., Kostyk, S. K., LeDoux, M. S., Reilmann, R., Rosas, H. D., Walker, F., Wheelock, V., Svzrikapa, N., Longo, K. A., Goyal, J., Hung, S., & Panzara, M. A. (2020). Genotyping single nucleotide polymorphisms for allele-selective therapy in Huntington disease. *Neurology: Genetics*, 6(3), e430. <https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000430>
- Coarelli, G., Darios, F., Petit, E., Dorgham, K., Adanyeguh, I., Petit, E., Brice, A., Mochel, F., & Durr, A. (2021). Plasma neurofilament light chain predicts cerebellar atrophy and clinical progression in spinocerebellar ataxia. *Neurobiology of Disease*, 153, 105311. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105311>
- Cohn, J. S., McNamara, J. R., Cohn, S. D., Ordovas, J. M., & Schaefer, E. J. (1988). Postprandial plasma lipoprotein changes in human subjects of different ages. *Journal of Lipid Research*, 29(4), 469–479.
- Compton, S. J., & Jones, C. G. (1985). Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical Biochemistry*, 151(2), 369–374. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90190-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90190-3)
- Cooke, P. S., Nanjappa, M. K., Ko, C., Prins, G. S., & Hess, R. A. (2017). Estrogens in Male Physiology. *Physiological Reviews*, 97(3), 995–1043. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2016>
- Costa, I. P. D., Almeida, B. C., Sequeiros, J., Amorim, A., & Martins, S. (2019). A Pipeline to Assess Disease-Associated Haplotypes in Repeat Expansion

Disorders: The Example of MJD/SCA3 Locus. *Frontiers in Genetics*, 10, 38. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00038>

Coutinho, P., & Andrade, C. (1978). Autosomal dominant system degeneration in Portuguese families of the Azores Islands. A new genetic disorder involving cerebellar, pyramidal, extrapyramidal and spinal cord motor functions. *Neurology*, 28(7), 703–709. <https://doi.org/10.1212/wnl.28.7.703>

Cui, X., Liang, Q., Liang, Y., Lu, M., Ding, Y., & Lu, B. (2014). TR-FRET assays of Huntingtin protein fragments reveal temperature and polyQ length-dependent conformational changes. *Scientific Reports*, 4, 5601. <https://doi.org/10.1038/srep05601>

de Mattos, E. P., Kolbe Muskopf, M., Bielefeldt Leotti, V., Saraiva-Pereira, M. L., & Jardim, L. B. (2019). Genetic risk factors for modulation of age at onset in Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 90(2), 203–210. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2018-319200>

Deutscher, M. P. (2009). Maintaining protein stability. *Methods in Enzymology*, 463, 121–127. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63010-X](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63010-X)

Du Le, V. N., Patterson, M. S., Farrell, T. J., Hayward, J. E., & Fang, Q. (2015). Experimental recovery of intrinsic fluorescence and fluorophore concentration in the presence of hemoglobin: Spectral effect of scattering and absorption on fluorescence. *Journal of Biomedical Optics*, 20(12), 127003. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.20.12.127003>

Duarte-Silva, S., & Maciel, P. (2018). Pharmacological Therapies for Machado-Joseph Disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1049, 369–394. https://doi.org/10.1007/978-3-319-71779-1_19

Durcan, T. M., & Fon, E. A. (2011). Mutant ataxin-3 promotes the autophagic degradation of parkin. *Autophagy*, 7(2), 233–234. <https://doi.org/10.4161/auto.7.2.14224>

Durcan, T. M., & Fon, E. A. (2013). Ataxin-3 and its e3 partners: Implications for machado-joseph disease. *Frontiers in Neurology*, 4, 46. <https://doi.org/10.3389/fneur.2013.00046>

Durcan, T. M., Kontogiannea, M., Thorarinsdottir, T., Fallon, L., Williams, A. J., Djarmati, A., Fantaneanu, T., Paulson, H. L., & Fon, E. A. (2011). The Machado-Joseph disease-associated mutant form of ataxin-3 regulates parkin ubiquitination and stability. *Human Molecular Genetics*, 20(1), 141–154. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq452>

DZNE, Ö. (2024, Februar 21). *ESMI*. DZNE. <https://www.dzne.de/forschung/studien/klinische-studien/esmi/>

Faber, J., Berger, M., Carlo, W., Hübener-Schmid, J., Schaprian, T., Santana, M. M., Grobe-Einsler, M., Onder, D., Koyak, B., Giunti, P., Garcia-Moreno, H., Gonzalez-Robles, C., Lima, M., Raposo, M., Melo, A. R. V., de Almeida, L. P., Silva, P., Pinto, M. M., van de Warrenburg, B. P., ... Klockgether, T. (2023). Stage-dependent biomarker changes in spinocerebellar ataxia type 3. *medRxiv: The*

Preprint Server for Health Sciences, 2023.04.21.23287817.
<https://doi.org/10.1101/2023.04.21.23287817>

Förster, Th. (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik*, 437(1–2), 55–75.
<https://doi.org/10.1002/andp.19484370105>

Furtado, G. V., Oliveira, C. M. de, Bolzan, G., Saute, J. A. M., Saraiva-Pereira, M. L., & Jardim, L. B. (2019). State biomarkers for Machado Joseph disease: Validation, feasibility and responsiveness to change. *Genetics and Molecular Biology*, 42(1 suppl 1), 238–251. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2018-0103>

Gaetani, L., Blennow, K., Calabresi, P., Di Filippo, M., Parnetti, L., & Zetterberg, H. (2019). Neurofilament light chain as a biomarker in neurological disorders. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 90(8), 870–881.
<https://doi.org/10.1136/jnnp-2018-320106>

Garcia-Moreno, H., Prudencio, M., Thomas-Black, G., Solanky, N., Jansen-West, K. R., Hanna Al-Shaikh, R., Heslegrave, A., Zetterberg, H., Santana, M. M., Pereira de Almeida, L., Vasconcelos-Ferreira, A., Januário, C., Infante, J., Faber, J., Klockgether, T., Reetz, K., Raposo, M., Ferreira, A. F., Lima, M., ... Giunti, P. (2022). Tau and neurofilament light-chain as fluid biomarkers in spinocerebellar ataxia type 3. *European Journal of Neurology*, 29(8), 2439–2452.
<https://doi.org/10.1111/ene.15373>

Gaspar, C., Lopes-Cendes, I., Hayes, S., Goto, J., Arvidsson, K., Dias, A., Silveira, I., Maciel, P., Coutinho, P., Lima, M., Zhou, Y. X., Soong, B. W., Watanabe, M., Giunti, P., Stevanin, G., Riess, O., Sasaki, H., Hsieh, M., Nicholson, G. A., ... Rouleau, G. A. (2001). Ancestral origins of the Machado-Joseph disease mutation: A worldwide haplotype study. *American Journal of Human Genetics*, 68(2), 523–528. <https://doi.org/10.1086/318184>

Gatchel, J. R., & Zoghbi, H. Y. (2005). Diseases of unstable repeat expansion: Mechanisms and common principles. *Nature Reviews. Genetics*, 6(10), 743–755.
<https://doi.org/10.1038/nrg1691>

Ghione, I., Di Fonzo, A., Saladino, F., Del Bo, R., Bresolin, N., Comi, G. P., & Rango, M. (2007). Parkin polymorphisms and environmental exposure: Decrease in age at onset of Parkinson's disease. *Neurotoxicology*, 28(3), 698–701.
<https://doi.org/10.1016/j.neuro.2007.01.004>

Gonsior, K., Kaucher, G. A., Pelz, P., Schumann, D., Gansel, M., Kuhs, S., Klockgether, T., Forlani, S., Durr, A., Hauser, S., Rattay, T. W., Synofzik, M., Hengel, H., Schöls, L., Rieß, O. H., & Hübener-Schmid, J. (2021). PolyQ-expanded ataxin-3 protein levels in peripheral blood mononuclear cells correlate with clinical parameters in SCA3: A pilot study. *Journal of Neurology*, 268(4), 1304–1315.
<https://doi.org/10.1007/s00415-020-10274-y>

Goto, J., Watanabe, M., Ichikawa, Y., Yee, S. B., Ihara, N., Endo, K., Igarashi, S., Takiyama, Y., Gaspar, C., Maciel, P., Tsuji, S., Rouleau, G. A., & Kanazawa, I. (1997). Machado-Joseph disease gene products carrying different carboxyl

termini. *Neuroscience Research*, 28(4), 373–377. [https://doi.org/10.1016/s0168-0102\(97\)00056-4](https://doi.org/10.1016/s0168-0102(97)00056-4)

Grievink, H. W., Luisman, T., Kluft, C., Moerland, M., & Malone, K. E. (2016). Comparison of Three Isolation Techniques for Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Cell Recovery and Viability, Population Composition, and Cell Functionality. *Biopreservation and Biobanking*, 14(5), 410–415. <https://doi.org/10.1089/bio.2015.0104>

Grobe-Einsler, M., Taheri Amin, A., Faber, J., Schaprian, T., Jacobi, H., Schmitz-Hübsch, T., Diallo, A., Tezenas du Montcel, S., & Klockgether, T. (2021). Development of SARAhome, a New Video-Based Tool for the Assessment of Ataxia at Home. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 36(5), 1242–1246. <https://doi.org/10.1002/mds.28478>

Gu, W., Ma, H., Wang, K., Jin, M., Zhou, Y., Liu, X., Wang, G., & Shen, Y. (2004). The shortest expanded allele of the MJD1 gene in a Chinese MJD kindred with autonomic dysfunction. *European Neurology*, 52(2), 107–111. <https://doi.org/10.1159/000080221>

Harreiter, J., & Roden, M. (2023). [Diabetes mellitus: Definition, classification, diagnosis, screening and prevention (Update 2023)]. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 135(Suppl 1), 7–17. <https://doi.org/10.1007/s00508-022-02122-y>

Hauser, S., Helm, J., Kraft, M., Korneck, M., Hübener-Schmid, J., & Schöls, L. (2022). Allele-specific targeting of mutant ataxin-3 by antisense oligonucleotides in SCA3-iPSC-derived neurons. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, 27, 99–108. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2021.11.015>

Helm, J., Schöls, L., & Hauser, S. (2022). Towards Personalized Allele-Specific Antisense Oligonucleotide Therapies for Toxic Gain-of-Function Neurodegenerative Diseases. *Pharmaceutics*, 14(8), 1708. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081708>

Hengel, H., Martus, P., Faber, J., Garcia-Moreno, H., Solanky, N., Giunti, P., Klockgether, T., Reetz, K., van de Warrenburg, B. P., Pereira de Almeida, L., Santana, M. M., Januário, C., Silva, P., Thieme, A., Infante, J., de Vries, J., Lima, M., Ferreira, A. F., Bushara, K., ... Schöls, L. (2022). Characterization of Lifestyle in Spinocerebellar Ataxia Type 3 and Association with Disease Severity. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 37(2), 405–410. <https://doi.org/10.1002/mds.28844>

Hengel, H., Pellerin, D., Wilke, C., Fleszar, Z., Brais, B., Haack, T., Träschütz, A., Schöls, L., & Synofzik, M. (2023). As Frequent as Polyglutamine Spinocerebellar Ataxias: SCA27B in a Large German Autosomal Dominant Ataxia Cohort. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 38(8), 1557–1558. <https://doi.org/10.1002/mds.29559>

Hoche, F., Seidel, K., Brunt, E. R., Auburger, G., Schöls, L., Bürk, K., de Vos, R. A., den Dunnen, W., Bechmann, I., Egensperger, R., Van Broeckhoven, C., Gierga, K., Deller, T., & Rüb, U. (2008). Involvement of the auditory brainstem system in spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2), type 3 (SCA3) and type 7

(SCA7). *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 34(5), 479–491. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2007.00933.x>

Ialongo, C., & Bernardini, S. (2016). Phlebotomy, a bridge between laboratory and patient. *Biochemia Medica*, 26(1), 17–33. <https://doi.org/10.11613/BM.2016.002>

Imbert, P.-E., Unterreiner, V., Siebert, D., Gubler, H., Parker, C., & Gabriel, D. (2007). Recommendations for the Reduction of Compound Artifacts in Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer Assays. *ASSAY and Drug Development Technologies*, 5(3), 363–372. <https://doi.org/10.1089/adt.2007.073>

Iruzubieta, P., Pellerin, D., Bergareche, A., Albajar, I., Mondragón, E., Vinagre, A., Fernández-Torrón, R., Moreno, F., Equiza, J., Campo-Caballero, D., Poza, J. J., Ruibal, M., Formica, A., Dicaire, M.-J., Danzi, M. C., Zuchner, S., Croitoru, I., Ruiz, M., Schlüter, A., ... Ruiz-Martínez, J. (2023). Frequency and phenotypic spectrum of spinocerebellar ataxia 27B and other genetic ataxias in a Spanish cohort of late-onset cerebellar ataxia. *European Journal of Neurology*, 30(12), 3828–3833. <https://doi.org/10.1111/ene.16039>

Iwuji, K., Almekdash, H., Nugent, K. M., Islam, E., Hyde, B., Kopel, J., Opiogbe, A., & Appiah, D. (2021). Age-Adjusted D-Dimer in the Prediction of Pulmonary Embolism: Systematic Review and Meta-analysis. *Journal of Primary Care & Community Health*, 12, 21501327211054996. <https://doi.org/10.1177/21501327211054996>

Jacobi, H., Rakowicz, M., Rola, R., Fancellu, R., Mariotti, C., Charles, P., Dürr, A., Küper, M., Timmann, D., Linnemann, C., Schöls, L., Kaut, O., Schaub, C., Filla, A., Baliko, L., Melegh, B., Kang, J.-S., Giunti, P., van de Warrenburg, B. P. C., ... Klockgether, T. (2013). Inventory of Non-Ataxia Signs (INAS): Validation of a new clinical assessment instrument. *Cerebellum (London, England)*, 12(3), 418–428. <https://doi.org/10.1007/s12311-012-0421-3>

Joers, J. M., Deelchand, D. K., Lyu, T., Emir, U. E., Hutter, D., Gomez, C. M., Bushara, K. O., Eberly, L. E., & Öz, G. (2018). Neurochemical abnormalities in premanifest and early spinocerebellar ataxias. *Annals of Neurology*, 83(4), 816–829. <https://doi.org/10.1002/ana.25212>

Kawaguchi, Y., Okamoto, T., Taniwaki, M., Aizawa, M., Inoue, M., Katayama, S., Kawakami, H., Nakamura, S., Nishimura, M., & Akiguchi, I. (1994). CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nature Genetics*, 8(3), 221–228. <https://doi.org/10.1038/ng1194-221>

Kelley, K. C., Salen, P., Wojda, T. R., Hasani, A. Z., Luster, J., Seoane, J., Cohen, M. Z., Castillo, R., & Stawicki, S. P. (2021). Impact of blood alcohol concentration on hematologic and serum chemistry parameters in trauma patients: Analysis of data from a high-volume level 1 trauma center. *International Journal of Critical Illness and Injury Science*, 11(1), 18–24. https://doi.org/10.4103/IJCIIS.IJCIIS_112_20

Kemmler, W., Teschler, M., Bebenek, M., & von Stengel, S. (2015). [(Very) high Creatinkinase concentration after exertional whole-body electromyostimulation application: Health risks and longitudinal adaptations]. *Wiener Medizinische*

Wochenschrift (1946), 165(21–22), 427–435. <https://doi.org/10.1007/s10354-015-0394-1>

Kershbaum, A., Bellet, S., Dickstein, E. R., & Feinberg, J. (1961). Effect of cigarette smoking and nicotine on serum free fatty acids based on a study in the human subject and the experimental animal. *Circulation Research*, 9, 631–638. <https://doi.org/10.1161/01.res.9.3.631>

Khalil, M., Pirpamer, L., Hofer, E., Voortman, M. M., Barro, C., Leppert, D., Benkert, P., Ropele, S., Enzinger, C., Fazekas, F., Schmidt, R., & Kuhle, J. (2020). Serum neurofilament light levels in normal aging and their association with morphologic brain changes. *Nature Communications*, 11(1), 812. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14612-6>

Khalil, M., Teunissen, C. E., Otto, M., Piehl, F., Sormani, M. P., Gattringer, T., Barro, C., Kappos, L., Comabella, M., Fazekas, F., Petzold, A., Blennow, K., Zetterberg, H., & Kuhle, J. (2018). Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders. *Nature Reviews. Neurology*, 14(10), 577–589. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0058-z>

Kieling, C., Rieder, C. R. M., Silva, A. C. F., Saute, J. a. M., Cecchin, C. R., Monte, T. L., & Jardim, L. B. (2008). A neurological examination score for the assessment of spinocerebellar ataxia 3 (SCA3). *European Journal of Neurology*, 15(4), 371–376. <https://doi.org/10.1111/j.1468-1331.2008.02078.x>

Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y., & Shimizu, N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, 392(6676), 605–608. <https://doi.org/10.1038/33416>

Klockgether, T., Mariotti, C., & Paulson, H. L. (2019). Spinocerebellar ataxia. *Nature Reviews. Disease Primers*, 5(1), 24. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0074-3>

Ko, J., Ou, S., & Patterson, P. H. (2001). New anti-huntingtin monoclonal antibodies: Implications for huntingtin conformation and its binding proteins. *Brain Research Bulletin*, 56(3–4), 319–329. [https://doi.org/10.1016/s0361-9230\(01\)00599-8](https://doi.org/10.1016/s0361-9230(01)00599-8)

Langsted, A., Freiberg, J. J., & Nordestgaard, B. G. (2008). Fasting and nonfasting lipid levels: Influence of normal food intake on lipids, lipoproteins, apolipoproteins, and cardiovascular risk prediction. *Circulation*, 118(20), 2047–2056. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.804146>

Langsted, A., & Nordestgaard, B. G. (2019). Nonfasting versus fasting lipid profile for cardiovascular risk prediction. *Pathology*, 51(2), 131–141. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2018.09.062>

Lastres-Becker, I., Rüb, U., & Auburger, G. (2008). Spinocerebellar ataxia 2 (SCA2). *Cerebellum (London, England)*, 7(2), 115–124. <https://doi.org/10.1007/s12311-008-0019-y>

Li, J., Li, X.-Y., Feng, D.-F., & Pan, D.-C. (2010). Biomarkers associated with diffuse traumatic axonal injury: Exploring pathogenesis, early diagnosis, and

- prognosis. *The Journal of Trauma*, 69(6), 1610–1618. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e3181f5a9ed>
- Li, Q.-F., Dong, Y., Yang, L., Xie, J.-J., Ma, Y., Du, Y.-C., Cheng, H.-L., Ni, W., & Wu, Z.-Y. (2019). Neurofilament light chain is a promising serum biomarker in spinocerebellar ataxia type 3. *Molecular Neurodegeneration*, 14(1), 39. <https://doi.org/10.1186/s13024-019-0338-0>
- Liew, M., Pryor, R., Palais, R., Meadows, C., Erali, M., Lyon, E., & Wittwer, C. (2004). Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. *Clinical Chemistry*, 50(7), 1156–1164. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2004.032136>
- Linggi, B., Cremer, J., Wang, Z., Van Viegen, T., Vermeire, S., Lefevre, P., Shackelton, L. M., Jairath, V., Teft, W., Vande Casteele, N., & Verstockt, B. (2023). Effect of storage time on peripheral blood mononuclear cell isolation from blood collected in vacutainer CPT™ tubes. *Journal of Immunological Methods*, 519, 113504. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2023.113504>
- Lücking, C.-B., Chesneau, V., Lohmann, E., Verpillat, P., Dulac, C., Bonnet, A.-M., Gasparini, F., Agid, Y., Dürr, A., & Brice, A. (2003). Coding polymorphisms in the parkin gene and susceptibility to Parkinson disease. *Archives of Neurology*, 60(9), 1253–1256. <https://doi.org/10.1001/archneur.60.9.1253>
- Maas, R. P. P. W. M., & van de Warrenburg, B. P. C. (2021). Exploring the clinical meaningfulness of the Scale for the Assessment and Rating of Ataxia: A comparison of patient and physician perspectives at the item level. *Parkinsonism & Related Disorders*, 91, 37–41. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2021.08.014>
- Maciel, P., Gaspar, C., Guimarães, L., Goto, J., Lopes-Cendes, I., Hayes, S., Arvidsson, K., Dias, A., Sequeiros, J., Sousa, A., & Rouleau, G. A. (1999). Study of three intragenic polymorphisms in the Machado-Joseph disease gene (MJD1) in relation to genetic instability of the (CAG)_n tract. *European Journal of Human Genetics: EJHG*, 7(2), 147–156. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5200264>
- Maruyama, H., Nakamura, S., Matsuyama, Z., Sakai, T., Doyu, M., Sobue, G., Seto, M., Tsujihata, M., Oh-i, T., & Nishio, T. (1995). Molecular features of the CAG repeats and clinical manifestation of Machado-Joseph disease. *Human Molecular Genetics*, 4(5), 807–812. <https://doi.org/10.1093/hmg/4.5.807>
- Mathis, G. (1993). Rare earth cryptates and homogeneous fluoroimmunoassays with human sera. *Clinical Chemistry*, 39(9), 1953–1959.
- Matos, C. A., de Macedo-Ribeiro, S., & Carvalho, A. L. (2011). Polyglutamine diseases: The special case of ataxin-3 and Machado-Joseph disease. *Progress in Neurobiology*, 95(1), 26–48. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.06.007>
- McLoughlin, H. S., Moore, L. R., Chopra, R., Komlo, R., McKenzie, M., Blumenstein, K. G., Zhao, H., Kordasiewicz, H. B., Shakkottai, V. G., & Paulson, H. L. (2018). Oligonucleotide therapy mitigates disease in spinocerebellar ataxia type 3 mice. *Annals of Neurology*, 84(1), 64–77. <https://doi.org/10.1002/ana.25264>

- McLoughlin, H. S., Moore, L. R., & Paulson, H. L. (2020). Pathogenesis of SCA3 and implications for other polyglutamine diseases. *Neurobiology of Disease*, *134*, 104635. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104635>
- Medina, A., Mahjoub, Y., Shaver, L., & Pringsheim, T. (2022). Prevalence and Incidence of Huntington's Disease: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, *37*(12), 2327–2335. <https://doi.org/10.1002/mds.29228>
- Mei, F., Yang, P., Lai, C., Ge, M., & Chern, R. (2020). Impact of Excessive Sublimation Cooling on the Internal Temperature of Passive Shippers Cooled by Dry Ice. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, *74*(1), 49–57. <https://doi.org/10.5731/pdajpst.2018.009589>
- Mendonça, N., França, M. C., Gonçalves, A. F., & Januário, C. (2018). Clinical Features of Machado-Joseph Disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *1049*, 255–273. https://doi.org/10.1007/978-3-319-71779-1_13
- Mengel, D., Wellik, I. G., Schuster, K. H., Jarrah, S. I., Wacker, M., Ashraf, N. S., Öz, G., Synofzik, M., Costa, M. do C., & McLoughlin, H. S. (2023). Blood levels of neurofilament light are associated with disease progression in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 3. *Disease Models & Mechanisms*, *16*(9), dmm050144. <https://doi.org/10.1242/dmm.050144>
- Mohd Azmi, N. A. S., Juliana, N., Azmani, S., Mohd Effendy, N., Abu, I. F., Mohd Fahmi Teng, N. I., & Das, S. (2021). Cortisol on Circadian Rhythm and Its Effect on Cardiovascular System. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *18*(2), 676. <https://doi.org/10.3390/ijerph18020676>
- Moore, L. R., Rajpal, G., Dillingham, I. T., Qutob, M., Blumenstein, K. G., Gattis, D., Hung, G., Kordasiewicz, H. B., Paulson, H. L., & McLoughlin, H. S. (2017). Evaluation of Antisense Oligonucleotides Targeting ATXN3 in SCA3 Mouse Models. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, *7*, 200–210. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.04.005>
- Moscovitch-Lopatin, M., Goodman, R. E., Eberly, S., Ritch, J. J., Rosas, H. D., Matson, S., Matson, W., Oakes, D., Young, A. B., Shoulson, I., & Hersch, S. M. (2013). HTRF analysis of soluble huntingtin in PHAROS PBMCs. *Neurology*, *81*(13), 1134–1140. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182a55ede>
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *51 Pt 1*, 263–273. <https://doi.org/10.1101/sqb.1986.051.01.032>
- Myers, R. M., Maniatis, T., & Lerman, L. S. (1987). Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods in Enzymology*, *155*, 501–527. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)55033-9](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)55033-9)
- Nakano, K. K., Dawson, D. M., & Spence, A. (1972). Machado disease. A hereditary ataxia in Portuguese emigrants to Massachusetts. *Neurology*, *22*(1), 49–55. <https://doi.org/10.1212/wnl.22.1.49>

NCBI SNP. (2024, Februar 21). *Home—SNP* - NCBI. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>

Nguyen, H. P., Hübener, J., Weber, J. J., Grueninger, S., Riess, O., & Weiss, A. (2013). Cerebellar soluble mutant ataxin-3 level decreases during disease progression in Spinocerebellar Ataxia Type 3 mice. *PLoS One*, *8*(4), e62043. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062043>

Nicastro, G., Masino, L., Esposito, V., Menon, R. P., De Simone, A., Fraternali, F., & Pastore, A. (2009). Josephin domain of ataxin-3 contains two distinct ubiquitin-binding sites. *Biopolymers*, *91*(12), 1203–1214. <https://doi.org/10.1002/bip.21210>

O'Byrne, N. A., Yuen, F., Butt, W. Z., & Liu, P. Y. (2021). Sleep and Circadian Regulation of Cortisol: A Short Review. *Current opinion in endocrine and metabolic research*, *18*, 178–186. <https://doi.org/10.1016/j.coemr.2021.03.011>

Ostrowski, L. A., Hall, A. C., & Mekhail, K. (2017). Ataxin-2: From RNA Control to Human Health and Disease. *Genes*, *8*(6), 157. <https://doi.org/10.3390/genes8060157>

Paganetti, P., Weiss, A., Trapp, M., Hammerl, I., Bleckmann, D., Bodner, R. A., Coven-Easter, S., Housman, D. E., & Parker, C. N. (2009). Development of a method for the high-throughput quantification of cellular proteins. *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology*, *10*(10), 1678–1688. <https://doi.org/10.1002/cbic.200900131>

Palareti, G., Legnani, C., Antonucci, E., Cosmi, B., Poli, D., Testa, S., Tosetto, A., Ageno, W., Falanga, A., Ferrini, P. M., Pengo, V., Prandoni, P., & DULCIS (D-dimer and ULtrasonography in Combination Italian Study) Investigators. (2020). D-dimer testing, with gender-specific cutoff levels, is of value to assess the individual risk of venous thromboembolic recurrence in non-elderly patients of both genders: A post hoc analysis of the DULCIS study. *Internal and Emergency Medicine*, *15*(3), 453–462. <https://doi.org/10.1007/s11739-019-02216-y>

Paulson, H. (2012). Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3. *Handbook of Clinical Neurology*, *103*, 437–449. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-51892-7.00027-9>

Paulson, H. L., Perez, M. K., Trottier, Y., Trojanowski, J. Q., Subramony, S. H., Das, S. S., Vig, P., Mandel, J.-L., Fischbeck, K. H., & Pittman, R. N. (1997). Intranuclear Inclusions of Expanded Polyglutamine Protein in Spinocerebellar Ataxia Type 3. *Neuron*, *19*(2), 333–344. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80943-5](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80943-5)

Pekny, M., Wilhelmsson, U., Stokowska, A., Tatlisumak, T., Jood, K., & Pekna, M. (2021). Neurofilament Light Chain (NfL) in Blood-A Biomarker Predicting Unfavourable Outcome in the Acute Phase and Improvement in the Late Phase after Stroke. *Cells*, *10*(6), 1537. <https://doi.org/10.3390/cells10061537>

Puleo, A., Carroll, C., Maecker, H. T., & Gupta, R. (2017). Isolation of Peripheral Blood Mononuclear Cells Using Vacutainer® Cellular Preparation Tubes (CPTTM). *Bio-protocol*, *7*(2), e2103. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2103>

Rafehi, H., Read, J., Szmulewicz, D. J., Davies, K. C., Snell, P., Fearnley, L. G., Scott, L., Thomsen, M., Gillies, G., Pope, K., Bennett, M. F., Munro, J. E., Ngo, K. J., Chen, L., Wallis, M. J., Butler, E. G., Kumar, K. R., Wu, K. H., Tomlinson, S. E., ... Lockhart, P. J. (2023). An intronic GAA repeat expansion in FGF14 causes the autosomal-dominant adult-onset ataxia SCA27B/ATX-FGF14. *American Journal of Human Genetics*, 110(6), 1018. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2023.05.005>

Raposo, M., Hübener-Schmid, J., Ferreira, A. F., Vieira Melo, A. R., Vasconcelos, J., Pires, P., Kay, T., Garcia-Moreno, H., Giunti, P., Santana, M. M., Pereira de Almeida, L., Infante, J., van de Warrenburg, B. P., de Vries, J. J., Faber, J., Klockgether, T., Casadei, N., Admard, J., Schöls, L., ... Lima, M. (2023). Blood transcriptome sequencing identifies biomarkers able to track disease stages in spinocerebellar ataxia type 3. *Brain: A Journal of Neurology*, 146(10), 4132–4143. <https://doi.org/10.1093/brain/awad128>

Reches, A. (2019). Fragile X Syndrome: Introduction. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1942, 3–10. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9080-1_1

Reed, G. H., Kent, J. O., & Wittwer, C. T. (2007). High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. *Pharmacogenomics*, 8(6), 597–608. <https://doi.org/10.2217/14622416.8.6.597>

Reetz, K., Costa, A. S., Mirzazade, S., Lehmann, A., Juzek, A., Rakowicz, M., Boguslawska, R., Schöls, L., Linnemann, C., Mariotti, C., Grisoli, M., Dürr, A., van de Warrenburg, B. P., Timmann, D., Pandolfo, M., Bauer, P., Jacobi, H., Hauser, T.-K., Klockgether, T., ... ataxia Study Group Investigators. (2013). Genotype-specific patterns of atrophy progression are more sensitive than clinical decline in SCA1, SCA3 and SCA6. *Brain: A Journal of Neurology*, 136(Pt 3), 905–917. <https://doi.org/10.1093/brain/aws369>

Renart, J., Reiser, J., & Stark, G. R. (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: A method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(7), 3116–3120. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.7.3116>

Riess, O., Rüb, U., Pastore, A., Bauer, P., & Schöls, L. (2008). SCA3: Neurological features, pathogenesis and animal models. *Cerebellum (London, England)*, 7(2), 125–137. <https://doi.org/10.1007/s12311-008-0013-4>

Rissin, D. M., Kan, C. W., Campbell, T. G., Howes, S. C., Fournier, D. R., Song, L., Piech, T., Patel, P. P., Chang, L., Rivnak, A. J., Ferrell, E. P., Randall, J. D., Provuncher, G. K., Walt, D. R., & Duffy, D. C. (2010). Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations. *Nature Biotechnology*, 28(6), 595–599. <https://doi.org/10.1038/nbt.1641>

Rosenberg, R. N., Nyhan, W. L., Bay, C., & Shore, P. (1976). Autosomal dominant striatonigral degeneration. A clinical, pathologic, and biochemical study of a new genetic disorder. *Neurology*, 26(8), 703–714. <https://doi.org/10.1212/wnl.26.8.703>

- Ross, G. M. S., Filippini, D., Nielen, M. W. F., & Salentijn, G. IJ. (2020). Unraveling the Hook Effect: A Comprehensive Study of High Antigen Concentration Effects in Sandwich Lateral Flow Immunoassays. *Analytical Chemistry*, *92*(23), 15587–15595. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c03740>
- Rüb, U., Brunt, E. R., & Deller, T. (2008). New insights into the pathoanatomy of spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease). *Current Opinion in Neurology*, *21*(2), 111–116. <https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e3282f7673d>
- Rüb, U., Schöls, L., Paulson, H., Auburger, G., Kermer, P., Jen, J. C., Seidel, K., Korf, H.-W., & Deller, T. (2013). Clinical features, neurogenetics and neuropathology of the polyglutamine spinocerebellar ataxias type 1, 2, 3, 6 and 7. *Progress in Neurobiology*, *104*, 38–66. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.01.001>
- Russell, G., & Lightman, S. (2019). The human stress response. *Nature Reviews. Endocrinology*, *15*(9), 525–534. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0228-0>
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *74*(12), 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Santana, M. M., Gaspar, L. S., Pinto, M. M., Silva, P., Adão, D., Pereira, D., Ribeiro, J. A., Cunha, I., Huebener-Schmid, J., Raposo, M., Ferreira, A. F., Faber, J., Kuhs, S., Garcia-Moreno, H., Reetz, K., Thieme, A., Infante, J., van de Warrenburg, B. P. C., Giunti, P., ... de Almeida, L. P. (2023). A standardized protocol for blood and cerebrospinal fluid collection and processing for biomarker research in ataxia. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, *n/a*(*n/a*), e12892. <https://doi.org/10.1111/nan.12892>
- Saute, J. A. M., & Jardim, L. B. (2015). Machado Joseph disease: Clinical and genetic aspects, and current treatment. *Expert Opinion on Orphan Drugs*, *3*(5), 517–535. <https://doi.org/10.1517/21678707.2015.1025747>
- Saute, J. A. M., Rieder, C. R. M., Castilhos, R. M., Monte, T. L., Schumacher-Schuh, A. F., Donis, K. C., D'Ávila, R., Souza, G. N., Russo, A. D., Furtado, G. V., Gheno, T. C., Souza, D. O. G., Saraiva-Pereira, M. L., Portela, L. V. C., Camey, S., Torman, V. B. L., & Jardim, L. B. (2015). Planning future clinical trials in Machado Joseph disease: Lessons from a phase 2 trial. *Journal of the Neurological Sciences*, *358*(1–2), 72–76. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2015.08.019>
- Schaefer, E. J., Audelin, M. C., McNamara, J. R., Shah, P. K., Tayler, T., Daly, J. A., Augustin, J. L., Seman, L. J., & Rubenstein, J. J. (2001). Comparison of fasting and postprandial plasma lipoproteins in subjects with and without coronary heart disease. *The American Journal of Cardiology*, *88*(10), 1129–1133. [https://doi.org/10.1016/s0002-9149\(01\)02047-1](https://doi.org/10.1016/s0002-9149(01)02047-1)
- Schmitz-Hübsch, T., du Montcel, S. T., Baliko, L., Berciano, J., Boesch, S., Depondt, C., Giunti, P., Globas, C., Infante, J., Kang, J.-S., Kremer, B., Mariotti, C., Melegh, B., Pandolfo, M., Rakowicz, M., Ribai, P., Rola, R., Schöls, L., Szymaniński, S., ... Fancellu, R. (2006). Scale for the assessment and rating of ataxia:

Development of a new clinical scale. *Neurology*, 66(11), 1717–1720. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000219042.60538.92>

Schöls, L., Bauer, P., Schmidt, T., Schulte, T., & Riess, O. (2004). Autosomal dominant cerebellar ataxias: Clinical features, genetics, and pathogenesis. *The Lancet Neurology*, 3(5), 291–304. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(04\)00737-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(04)00737-9)

Schouten, H. J., Geersing, G. J., Koek, H. L., Zuithoff, N. P. A., Janssen, K. J. M., Douma, R. A., van Delden, J. J. M., Moons, K. G. M., & Reitsma, J. B. (2013). Diagnostic accuracy of conventional or age adjusted D-dimer cut-off values in older patients with suspected venous thromboembolism: Systematic review and meta-analysis. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 346, f2492. <https://doi.org/10.1136/bmj.f2492>

Schuster, K. H., Zalon, A. J., Zhang, H., DiFranco, D. M., Stec, N. R., Haque, Z., Blumenstein, K. G., Pierce, A. M., Guan, Y., Paulson, H. L., & McLoughlin, H. S. (2022). Impaired Oligodendrocyte Maturation Is an Early Feature in SCA3 Disease Pathogenesis. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 42(8), 1604–1617. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1954-20.2021>

Seidel, K., Siswanto, S., Brunt, E. R. P., den Dunnen, W., Korf, H.-W., & Rüb, U. (2012). Brain pathology of spinocerebellar ataxias. *Acta Neuropathologica*, 124(1), 1–21. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1000-x>

Sherwani, S. I., Khan, H. A., Ekhzaimy, A., Masood, A., & Sakharkar, M. K. (2016). Significance of HbA1c Test in Diagnosis and Prognosis of Diabetic Patients. *Biomarker Insights*, 11, 95–104. <https://doi.org/10.4137/BMI.S38440>

Simpson, R. J. (2010). Stabilization of proteins for storage. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010(5), pdb.top79. <https://doi.org/10.1101/pdb.top79>

Subramony, S. H. (2007). SARA--a new clinical scale for the assessment and rating of ataxia. *Nature Clinical Practice. Neurology*, 3(3), 136–137. <https://doi.org/10.1038/ncpneuro0426>

Taylor, S. C. (2002). Skin of color: Biology, structure, function, and implications for dermatologic disease. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 46(2 Suppl Understanding), S41-62. <https://doi.org/10.1067/mjd.2002.120790>

The Huntington's Disease Collaborative Research Group. (1993). A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell*, 72(6), 971–983. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90585-e](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90585-e)

Toonen, L. J. A., Rigo, F., van Attikum, H., & van Roon-Mom, W. M. C. (2017). Antisense Oligonucleotide-Mediated Removal of the Polyglutamine Repeat in Spinocerebellar Ataxia Type 3 Mice. *Molecular Therapy. Nucleic Acids*, 8, 232–242. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.06.019>

Toonen, L. J. A., Schmidt, I., Luijsterburg, M. S., van Attikum, H., & van Roon-Mom, W. M. C. (2016). Antisense oligonucleotide-mediated exon skipping as a

strategy to reduce proteolytic cleavage of ataxin-3. *Scientific Reports*, 6, 35200. <https://doi.org/10.1038/srep35200>

Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9), 4350–4354. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>

Trottier, Y., Lutz, Y., Stevanin, G., Imbert, G., Devys, D., Cancel, G., Saudou, F., Weber, C., David, G., & Tora, L. (1995). Polyglutamine expansion as a pathological epitope in Huntington's disease and four dominant cerebellar ataxias. *Nature*, 378(6555), 403–406. <https://doi.org/10.1038/378403a0>

Vemana, H. P., & Dukhande, V. V. (2023). The effect of hormones insulin and glucagon on ubiquitin modifications elucidated by proteomics in liver cells. *Life Sciences*, 329, 121935. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.121935>

Vico Therapeutics B. V. (2023). *A Phase 1/2a, Open-label Trial to Investigate the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Multiple Ascending Doses of Intrathecally Administered VO659 in Participants With Spinocerebellar Ataxia Types 1, 3 and Huntington's Disease* (Clinical trial registration NCT05822908). clinicaltrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/study/NCT05822908>

Weber, J. J., Golla, M., Guaitoli, G., Wanichawan, P., Hayer, S. N., Hauser, S., Krahl, A.-C., Nagel, M., Samer, S., Aronica, E., Carlson, C. R., Schöls, L., Riess, O., Gloeckner, C. J., Nguyen, H. P., & Hübener-Schmid, J. (2017). A combinatorial approach to identify calpain cleavage sites in the Machado-Joseph disease protein ataxin-3. *Brain: A Journal of Neurology*, 140(5), 1280–1299. <https://doi.org/10.1093/brain/awx039>

Weishäupl, D., Schneider, J., Peixoto Pinheiro, B., Ruess, C., Dold, S. M., von Zweydford, F., Gloeckner, C. J., Schmidt, J., Riess, O., & Schmidt, T. (2019). Physiological and pathophysiological characteristics of ataxin-3 isoforms. *The Journal of Biological Chemistry*, 294(2), 644–661. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005801>

Wilke, C., Pellerin, D., Mengel, D., Träschütz, A., Danzi, M. C., Dicaire, M.-J., Neumann, M., Lerche, H., Bender, B., Houlden, H., RFC1 study group, Züchner, S., Schöls, L., Brais, B., & Synofzik, M. (2023). GAA-FGF14 ataxia (SCA27B): Phenotypic profile, natural history progression and 4-aminopyridine treatment response. *Brain: A Journal of Neurology*, 146(10), 4144–4157. <https://doi.org/10.1093/brain/awad157>

Wittwer, C. T., Reed, G. H., Gundry, C. N., Vandersteen, J. G., & Pryor, R. J. (2003). High-Resolution Genotyping by Amplicon Melting Analysis Using LCGreen. *Clinical Chemistry*, 49(6), 853–860. <https://doi.org/10.1373/49.6.853>

Wright, A. F. (2005). Genetic Variation: Polymorphisms and Mutations. In *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0005005>

Yang, J., Hamade, M., Wu, Q., Wang, Q., Axtell, R., Giri, S., & Mao-Draayer, Y. (2022). Current and Future Biomarkers in Multiple Sclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11), 5877. <https://doi.org/10.3390/ijms23115877>

Yap, E., Pryszyzhnyuk, Y., Ouyang, J., Puri, I., Boutin-Foster, C., & Salifu, M. (2021). The Implication of Dropping Race from the MDRD Equation to Estimate GFR in an African American-Only Cohort. *International Journal of Nephrology*, 2021, 1880499. <https://doi.org/10.1155/2021/1880499>

Yuan, A., Rao, M. V., Veeranna, null, & Nixon, R. A. (2012). Neurofilaments at a glance. *Journal of Cell Science*, 125(Pt 14), 3257–3263. <https://doi.org/10.1242/jcs.104729>

Zoghbi, H. Y., & Orr, H. T. (2000). Glutamine repeats and neurodegeneration. *Annual Review of Neuroscience*, 23, 217–247. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.23.1.217>

Erklärung zum Eigenanteil

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Medizinische Genetik und angewandte Genomik des Universitätsklinikum Tübingen unter Betreuung von Herr Prof. Dr. med. Olaf Rieß durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch PD Dr. rer. nat. Jeannette Hübener-Schmid und die Durchführung im Rahmen des ESMI-Projekts sowie in Kooperation mit den Initiatoren der BIGPRO-Studie. Die Organisation des Zusammentragens der Proben und der Erhebung der anamnestischen und klinischen Daten erfolgte dabei jeweils vor Ort durch die Koordinatoren in den Zentren in Tübingen, Coimbra, London, Bonn, Nijmegen, Groningen und Ponta Delgada (Azoren).

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch mich eigenständig durchgeführt. Hierbei erfolgte die Einarbeitung in die Arbeit in der Zellkultur und die Methodik des Western Blot durch Chrisovalantou Huridou und in alle weiteren Methoden durch Melanie Gansel und PD Dr. rer. nat. Jeannette Hübener-Schmid.

Die Etablierung der Multiplex-PCR nach Costa et. al wurde nach dem im Paper beschriebenen Protokoll im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Die Etablierung der Fragmentlängenanalyse / Duplex-PCR zur Bestimmung des *ATXN3*-SNPs Bp 987 wurde nach einem von Dr. rer. nat. Thorsten Schmidt erhaltenen, auf die Nutzung in dieser Arbeit angepassten Protokoll durchgeführt.

Ein Teil der laborchemischen Analysen erfolgte aus bereits vorbereiteten, bearbeiteten Proben. In diesem Fall erfolgte die Probenverarbeitung durch andere Mitglieder der Arbeitsgruppe; ebenso lagen bereits von anderen Arbeitsgruppenmitgliedern gewonnene Messdaten vor. Die Anzahl der von mir selbst analysierten PBMC-Proben (Bradford-Assay sowie TR-FRET-Analysen) betrug 63 Proben der ESMI-Kohorte sowie sämtliche beschriebenen Proben der Kohorte aus Brasilien. Davon wurden 63 Proben der ESMI-Kohorte und sämtliche Proben der Kohorte aus Brasilien durch mich selbst verarbeitet. Die Daten der in Kapitel 3.2.4.5 zur Untersuchung des Einflusses der Lagerungszeit wurden durch mich gewonnen. Darüber hinaus wurden 45 DNA-Proben von mir isoliert. Von 47 Proben wurde die Anzahl der CAG-Wiederholungen durch mich in Zusammenarbeit mit den Mitarbeiter*innen des Instituts für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik der Universitätsklinik Tübingen bestimmt. Für die SNPs betrug die

Anzahl der von mir bestimmten Proben für den *ATXN3*-SNP Bp 669 16 Proben, für den *ATXN3*-SNP Bp 987 94 Proben, für den *ATXN3*-SNP Bp 1118 135 Proben, für den *PARK2*-SNP Exon 4 105 Proben und für den *PARK2*-SNP Exon 10 90 Proben.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

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

Rosdorf, den _____

Dorothea Schumann

Veröffentlichungen

Publikation:

Gonsior, K., Kaucher, G. A., Pelz, P., **Schumann, D.**, Gansel, M., Kuhs, S., Klockgether, T., Forlani, S., Durr, A., Hauser, S., Rattay, T. W., Synofzik, M., Hengel, H., Schöls, L., Rieß, O. H., & Hübener-Schmid, J. (2021). PolyQ-expanded ataxin-3 protein levels in peripheral blood mononuclear cells correlate with clinical parameters in SCA3: A pilot study. *Journal of Neurology*, 268(4), 1304–1315. <https://doi.org/10.1007/s00415-020-10274-y>

- Die hier in Kapitel 3.2.4.5 dargestellten Daten zur Untersuchung des Einflusses der Lagerungszeit wurden durch mich erhoben. Datenpunkt 0 – 72h der Messung mit N-term aus Abbildung 17a wurden ebenfalls im Rahmen der Publikation verwendet.

Poster:

DGN-Kongress, 25.09. – 28.09.2019, Stuttgart

Posterpräsentation 27.09.2019: Ataxin-3 as a potential biomarker for disease progression in SCA3

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Herr Prof. Dr. med. Olaf Rieß für die Möglichkeit, unter seiner Betreuung am Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik meine Promotion durchzuführen. Ich durfte Einblicke in ein lebendiges und miteinander gelebtes fundiertes wissenschaftliches Arbeiten mit gegenseitiger Unterstützung und beständigem Austausch erfahren.

Meinem Zweitgutachter danke ich für die Übernahme der Begutachtung meiner Arbeit!

Im Rahmen meiner Laborarbeit durfte ich Teil eines engagierten Teams werden. Mein Dank gilt daher auch allen Mitarbeiter*innen des Labors, insbesondere der Arbeitsgruppe SCA3 aber auch darüber hinaus, die mich stets willkommen heißen und mit Rat, Tat und Antworten auf immer neue Fragen unterstützt haben. Ich danke allen gesunden Proband*innen und SCA3-Patient*innen, die im Rahmen der ESMI-Kohorte und der BIGPRO-Studie weltweit Proben bereitgestellt, Fragen beantwortet und Tests mitgemacht haben und ohne deren Bereitschaft keine Forschung möglich wäre.

Ganz besonders danke ich Frau PD Dr. rer. nat. Jeannette Hübener-Schmid für die hervorragende, intensive und geduldige Betreuung meiner Arbeit mit stets zeitnahe Feedback und beständiger Ermutigung bis zur Abgabe hin.

Abschließend danke ich herzlich meinen Eltern, meiner Schwester und meiner Freund*in für die andauernde intensive, liebevolle und bestätigende Unterstützung – im Rahmen der Erstellung meiner Arbeit und darüber hinaus.